

**Univerzita Karlova**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program:

Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor:

Molekulární biologie a biochemie organismů



**Daniela Hrdličková**

Komunikace mezi signálními systémy opioidních a TLR4 receptorů

*The cross-talk between opioid and TLR4 receptor signaling systems*

Bakalářská práce

Vedoucí práce:

RNDr. Zdeňka Drastichová, Ph.D.

Praha, 2024

## **Prohlášení**

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

V Praze dne 27. 4. 2024

Podpis: .....

## **Poděkování**

Mé poděkování patří RNDr. Zdeňce Drastichové, Ph.D., za odborné vedení, její čas a podnětné poznámky k mé bakalářské práci. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za podporu, kterou mi poskytovali během studia.

## Obsah

1	ÚVOD .....	1
2	OPIOIDNÍ RECEPTORY .....	2
2.1	Klasifikace a charakteristika .....	2
2.1.1	μ opioidní receptory .....	2
2.1.2	δ opioidní receptory.....	3
2.1.3	κ opioidní receptory .....	3
2.2	Ligandy.....	4
2.3	Struktura a aktivace .....	5
2.4	Signalizační dráhy .....	6
2.4.1	Signalizace přes G-protein .....	6
2.4.2	Desenzitizace, internalizace a recyklace receptoru .....	7
2.4.3	Signalizace přes β-arrestin .....	8
3	TOLL-LIKE RECEPTOR 4.....	9
3.1	Klasifikace a charakteristika .....	9
3.2	Exprese .....	10
3.3	Ligandy.....	11
3.4	Struktura a aktivace .....	12
3.5	Signalizace .....	13
3.5.1	MyD88 dependentní dráha .....	13
3.5.2	TRIF dependentní dráha.....	15
4	KOMUNIKACE MEZI SIGNÁLNÍMI SYSTÉMY OR A TLR4 .....	17
4.1	Nestereoselektivní působení opioidů na TLR4 v nepřítomnosti LPS.....	17
4.1.1	Stereoselektivita OR a TLR4 vůči opioidům .....	17
4.1.2	Vazba na MD-2 .....	18
4.1.3	Opioidy indukovaná TLR4 signalizace.....	19
4.1.4	Opioidy navozená regulace hladiny extracelulárního HMGB1 .....	20
4.2	Opioidy navozená regulace zánětlivé odpovědi po aktivaci TLR4 lipopolysacharidem .....	21
4.3	Epigenetická regulace TLR4 zprostředkovaná opioidy .....	23
4.4	Opioidy indukovaná regulace exprese TLR4.....	24
4.5	Fyziologické důsledky komunikace OR a TLR4 .....	25
5	ZÁVĚR.....	28
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....	29

## **Abstrakt**

Opioidy se v klinické praxi využívají k léčbě akutní a chronické bolesti. Stereoselektivně se váží na opioidní receptory (OR) a aktivují signální kaskádu přes inhibiční  $G_{i/o}$ -proteiny, zprostředkující analgetický efekt. Jejich užívání ale provází mnoho nežádoucích účinků, jako je rozvoj závislosti, analgetické tolerance, alodynies, hyperalgezie, zácpa a periferní imunosuprese. Nedávné studie odhalily, že opioidy mohou také nestereoselektivně působit na receptor vrozené imunity pro rozpoznávání lipopolysacharidu (LPS), receptor 4 podobný Toll (TLR4). Ukazuje se, že některé z těchto účinků mohou být následkem právě této interakce. Ta indukuje expresi prozánětlivých mediátorů v centrální nervové soustavě (NS), za přítomnosti infekčního agens však může zánět naopak tlumit. Komunikace mezi receptorovými systémy OR a TLR4 probíhá na několika úrovních. Pochopení jednotlivých mechanismů by znamenalo velký přínos pro vývoj nových terapeutických strategií v opioidní analgetické léčbě, které by minimalizovaly její nežádoucí účinky, dále by mohlo dojít k využití protizánětlivého potenciálu opioidů.

**Klíčová slova:** Opioidy, receptor 4 podobný Toll, buněčná signalizace, zánět, lipopolysacharid, cytokiny

## **Abstract**

Opioids are commonly used in clinical practice to treat acute and chronic pain. They stereoselectively bind to opioid receptors and trigger a signal cascade through inhibitory  $G_{i/o}$ -proteins, resulting in analgetic effects. However, their use can lead to various adverse effects, such as the development of addiction, analgetic tolerance, allodynia, hyperalgesia, constipation, and peripheral immunosuppression. Recent studies have found that opioids also bind non- stereoselectively to Toll-like receptor which belongs to innate immune system receptors recognizing lipopolysaccharide. Findings suggest that some of these adverse effects may be a result of this interaction. It induces the expression of proinflammatory mediators in the central nervous system, but under certain conditions, it may also suppress inflammation. Communication between these different receptor systems occurs at multiple levels. Understanding these mechanisms could greatly benefit the development of new therapeutic approaches in opioid analgetic treatment, aiming to minimize their adverse effects, it could also lead to the therapeutic use of the antiinflammatory potential of opioids.

**Keywords:** Opioids, Toll-like receptor 4, cellular signaling, inflammation, lipopolysaccharide, cytokine

## Seznam použitých zkratek

AA	aminokyselina, amino acid
AC	adenylyl cykláza
AP-1	aktivátorový protein 1
ATP	adenosin-5'-trifosfát
cAMP	adenosin-3', 5'-monofosfát
CCI	chronická konstriktce sedacího nervu, chronic constriction of the sciatic nerve
CD	diferenční klastr, cluster of differentiation
COX-2	cyklooxygenáza 2
CREB	vazebný protein pro cAMP responzivní element, cAMP response element-binding protein
DAG	diacylglycerol
DAMGO	[D-Ala(2), N-MePhe(4), Gly-ol]-enkefalin
DAMPs	molekulární vzory spojené s poškozením, danger-associated molecular pattern
DD	doména smrti, death domain
ERK	kináza regulovaná mimobuněčným signálem, extracellular signal-regulated kinase
ECL	extracelulární smyčka, extracellular loop
ER	endoplazmatické retikulum
GDP	guanosindifosfát
GIRK	G-proteinem řízený dovnitř usměřující K <sup>+</sup> kanál, G-protein-coupled inwardly rectifying K <sup>+</sup> channel
GPCR	receptor spřažený s G-proteinem, G protein-coupled receptor
GRK	kinázy receptorů spřažených s G-proteinem
GTP	guanosintrifosfát

G $\alpha$	$\alpha$ -podjednotka G-proteinu
G $\beta\gamma$	$\beta\gamma$ -komplex G-proteinu
HEK293	buněčná linie 293 odvozená z lidských embryonálních ledvinových buněk
HMGB1	protein high mobility group box 1
HSP	proteiny tepelného šoku, heat shock proteins
ICL	intracelulární smyčka, intracellular loop
IFN- $\beta$	interferon- $\beta$
IKK	kináza inhibitoru jaderného faktoru $\kappa$ B
IL	interleukin
iNOS	inducibilní syntáza oxidu dusnatého
IP3	inositol-1,4,5-trisfosfát
IRAK	kináza asociovaná s interleukin-1 receptorem, interleukin-1 receptor associated kinase
IRF	faktor regulující interferon, interferon regulatory factor
IS	imunitní systém
I $\kappa$ B	inhibitor jaderného faktoru $\kappa$ B
JNK	c-Jun N-terminální kinázy, c-Jun N-terminal kinase
KO	knockout
LBP	protein vázající lipopolysacharid, lipopolysaccharide binding protein
LPS	lipopolysacharid
LPS-RS	lipopolysacharid <i>Rhodobacter sphaeroides</i>
LRR	strukturní motivy repetice bohaté na leucin, leucin-rich repeats
M3G	morfin-3-glukuronid
M6G	morfin-6-glukuronid

MAPK	mitogenem aktivovaná proteinová kináza, mitogen-activated protein kinase
MD-2	protein myeloidní diferenciace 2, myeloid differentiation factor 2
mRNA	messengerová RNA
miRNA	mikroRNA
MyD88	myeloidní diferenciační faktor 88, myeloid-differentiation factor 88
NAc	nucleus accumbens
NEMO	esenciální modulátor NF- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B essential modulator
NF- $\kappa$ B	jaderný faktor $\kappa$ B, nuclear factor $\kappa$ -light-chain-enhancer of activated B cells
NK buňky	přirození zabijáci, „natural killer“ buňky
NLRP3	NOD-, LRR- a pyrin doménu obsahujícího proteinu 3
NMDAR	N-metyl-D-aspartátový receptor
NS	nervová soustava
OR	opioidní receptor
Phe	fenylalanin
PIP2	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát
PKA	cAMP-dependentní proteinkináza A
PK	proteinkináza
PL	fosfolipáza
PM	plazmatická membrána
Sig1R	sigma receptor 1
Syk	tyrosinkináza sleziny, spleen tyrosine kinase
TAB	vazebný protein kinázy aktivované transformujícím růstovým faktorem $\beta$ , transforming growth factor $\beta$ -activated kinase binding protein



TAK	transformujícím růstovým faktorem $\beta$ aktivovaná kináza, transforming growth factor $\beta$ -activated kinase
TANK	aktivátor NF- $\kappa$ B přidružený k rodině TRAF TRAF family member associated NF- $\kappa$ B activator
TBK1	TANK-vázající kináza 1, TANK-binding kinase 1
TIR doména	toll-like /interleukin-1 receptorová homologická doména, toll-like/interleukin-1 receptor homology domain
TIRAP	adaptorový protein obsahující TIR doménu, TIR adaptor protein
TLR	receptor podobný Toll, toll-like receptor
TMD	transmembránová doména
TNF- $\alpha$	tumor nekrotizující faktor $\alpha$ , tumor necrosis factor $\alpha$
TRAF	faktor asociovaný s receptorem pro TNF, TNF receptor-associated factor
TRAM	adaptorová doména související s TRIF proteinem, TRIF-related adaptor molecule
TRIF	adaptorový protein obsahující TIR doménu a indukující IFN- $\beta$ , TIR-domain-containing adapter-inducing interferon IFN- $\beta$
VTA	ventrální tegmentální oblast
WT	divoký typ, wild type

# 1 ÚVOD

OR a TLR4 receptorové systémy se primárně podílí na značně odlišných fyziologických procesech. OR jsou aktivovány endogenními i exogenně podávanými opioidy a následně regulují nociceptivní signály v odpovídajících strukturách centrální NS<sup>1,2</sup>. Tato jejich schopnost je v medicíně využívána již po staletí. Přes značný pokrok ve vědě je však dodnes opioidní analgetická léčba spojena s mnoha nežádoucími účinky. Po určité době užívání opioidů přechází analgetický efekt do antinociceptivní tolerance, projevují se stavy hyperalgie, zvýšené citlivosti vůči bolestivým podnětům, až alodynii, bolest je vyvolána i jinak nebolestivými podněty<sup>3,4</sup>. Také dochází k rozvoji závislosti<sup>5</sup>. Mimo centrální NS opioidy působí na neurony myenterického a submukózního plexu a indukují depresi peristaltické motility střev, na periférii zas inhibují obranyschopnost imunitního systému<sup>6-9</sup>.

O tom, že tyto účinky jsou opioidy modulovány i přes jiné receptory, se diskutovalo již dříve, avšak až Hutchinson a spol.<sup>10</sup> v roce 2010 předkládají jasné důkazy o vazbě opioidů na TLR4. TLR4 jsou receptory vrozeného imunitního systému (IS), jež hrají klíčovou roli v rozeznání LPS, hlavní složky vnějších membrán gramnegativních bakterií, a některých molekulárních vzorů spojených s poškozením (DAMPs) a zprostředkování zánětlivé odpovědi na ně<sup>11</sup>.

Cílem této práce je představit signalizaci jednotlivých systémů OR a TLR4, hlavní část se pak zabývá právě jejich vzájemnou komunikací. Ta probíhá hned na několika úrovních. Působením opioidů přímo na extracelulární část TLR4, ale také ovlivnění TLR4 signální kaskády intracelulárními efekty OR. Pochopení této interakce komplikuje velká různorodost výsledných účinků, jež jsou tkáňově specifické, a závislé na řadě dalších faktorů, jako např. současná přítomnosti agonisty TLR4, LPS. V závěru práce jsou shrnuty fyziologické důsledky komunikace mezi OR a TLR4. Ta se převážně podílí na již zmíněných nežádoucích účincích, doprovázející užívání opioidů, za určitých podmínek ale může působit i protizánětlivě, v některých orgánech dokonce protektivně. Výzkum těchto interakcí je tudíž zásadní pro vývoj nových léčebných přístupů, které by mohly efektivně využívat synergii mezi OR a TLR4.

## 2 OPIOIDNÍ RECEPTORY

### 2.1 Klasifikace a charakteristika

OR jsou řazeny do nadrodiny receptorů spřažených s G-proteiny (GPCR). Lidský genom obsahuje přes 800 genů kódujících GPCR, což z nich dělá nejpočetnější skupinu membránových receptorů<sup>12,13</sup>. Mají zásadní význam při zprostředkování široké škály endogenních i exogenních signálů<sup>14</sup>. Přes rozmanitost jejich struktur, ligandů a efektorů je lze na základě fylogenetického původu rozdělit do 5 rodin – rhodopsinové, sekretinové, adhezní, glutamátové a „frizzled/taste2“ (také A, B1, B2, C, F). OR jsou klasifikovány do GPCR A<sup>13</sup>.

Aktivací OR je primárně spuštěna signální kaskáda přes inhibiční  $G_{i/o}$ -proteiny zapříčiňující analgetický efekt opioidů<sup>15,16</sup>. OR lokalizovány presynapticky v oblasti terminálního zakončení axonu inhibují výlev neurotransmiteru, postsynaptické OR hyperpolarizují neuron a snižují tak míru vzniku akčního potenciálu<sup>17,18</sup>. Zároveň jsou spuštěny mechanismy regulující desenzitizaci a internalizaci receptoru, které ovlivňují analgetickou účinnost a hrají důležitou roli při vzniku tolerance a závislosti na opioidech<sup>19,20</sup>.

Na základě výsledných dat experimentů Martina a spol.<sup>21</sup>, popisujících působení vybraných opioidních analgetik na modelu chronicky spinalizovaných psů, byly již v roce 1976 definovány 3 typy OR –  $\mu$ -OR (morfin<sup>a</sup>),  $\kappa$ -OR (ketocyclazocin<sup>a</sup>) a  $\sigma$ -OR (SKF-10,047<sup>a</sup>). Rok poté, byl díky analýze aktivity endogenních opioidních peptidů v ileu morčete a chámovodech (*vas deferens*) myši, objeven  $\delta$ -OR<sup>22</sup>.

Velkým průlomem bylo získání kódující sekvence genů OR na začátku 90. let. Mezi 3 typy klasických OR byly zjištěny sekvenční homologie na úrovni proteinu ze 60 %<sup>23–25</sup>. Tato znalost umožnila identifikaci posledního doposud známého člena rodiny OR skrze klonovací strategie – N/OFQ receptor (dle jeho endogenního agonisty nociceptin/orphanin FQ)<sup>26,27</sup>.

Vzhledem k interakcím signálních kaskád jednotlivých OR a receptoru TLR4 se tato práce dále zabývá pouze  $\mu$ -OR,  $\delta$ -OR a  $\kappa$ -OR. Rozdíly mezi těmito zástupci se týkají jejich distribuce a strukturních vlastností (viz Obr. 1), které se odráží v interakcích s rozličnými ligandy (viz Tab. 1), a následných fyziologických reakcích<sup>28</sup>.

#### 2.1.1 $\mu$ opioidní receptory

Většina analgetických účinků podávaných opioidů je zprostředkována skrze  $\mu$ -OR vyskytujících se v klíčových strukturách pro transmisí a modulaci nociceptivních signálů – thalamu, periakvaduktální šedé hmotě, rostrální ventromediální medule a dorzálních

---

<sup>a</sup> Tato pojmenování pochází od jejich nejvíce afinního agonisty, jenž byl ve studii použit.

rozích míchy<sup>1,29</sup>. Dále jsou ve vysokých koncentracích lokalizovány v hypothalamu, neokortexu, limbickém systému a v mozkovém kmeni v oblasti tecta a na respiračních neuronech prodloužené míchy<sup>30,31</sup>. Tato distribuce funkčně koreluje s vedlejšími a nežádoucími účinky opioidních analgetik omezující jejich klinickou použitelnost, jako je euforie, nevolnost, rychlý rozvoj tolerance až závislosti a respirační deprese<sup>32,33</sup>. V tkáních mimo centrální NS jsou exprimovány také ve slezině, plicích, játrech, ledvinách, nadledvinách, tenkém střevě, pohlavních žlázách<sup>34</sup> a v buňkách imunitního systému (IS) – lidských monocytech, makrofázích, granulocytech, přirozených zabijácích (NK buňky), T-lymfocytech a B-lymfocytech<sup>35</sup>.

### 2.1.2 $\delta$ opioidní receptory

Distribuce OR je i na buněčné úrovni mírně rozdílná. Zatímco  $\mu$ -OR se převážně nachází na plazmatické membráně (PM),  $\delta$ -OR a  $\kappa$ -OR jsou také skladovány v intracelulárních kompartmentech nebo jsou v presynaptických terminálech inkorporovány do membrán vezikul s denzním jádrem<sup>36–38</sup>. Konkrétně v gangliích dorzálních rohů míchy jsou  $\delta$ -OR součástí membrán sekretorických váčků obsahujících substanci P a kalcitoninu příbuzný peptid. Depolarizace nociceptoru vede k exocytóze obsahu váčku a expozici  $\delta$ -OR na PM, kde mohou reagovat na zvýšenou koncentraci některých endogenních opioidů<sup>38</sup>.  $\delta$ -OR na rozdíl od  $\mu$ -OR moduluje nocicepci spíše při chronické a zánětlivé bolesti, než té akutní<sup>39</sup>.

V rámci NS jsou lokalizovány podobně jako  $\mu$ -OR, s menší koncentrací v mezimozkových strukturách a mozkovém kmeni, více v oblasti čichovém bulbu<sup>31,40</sup>, mimo NS byly navíc detekovány v myokardu a tkáních žaludku<sup>34</sup>, na lidských NK buňkách, T-lymfocytech a B-lymfocytech<sup>35</sup>.

### 2.1.3 $\kappa$ opioidní receptory

Také  $\kappa$ -OR se nachází v nocicepčních neuronech v NS a zprostředkovává analgezi<sup>41</sup>. Bylo ale zjištěno, že selektivní agonisté  $\kappa$ -OR svým působením v nucleus raphe magnus rostrální ventromediální meduly antagonizují analgezi zprostředkovanou  $\mu$ -OR<sup>42</sup>. Dalším specifickým vedlejším účinkem  $\kappa$ -OR je vyvolání dysforie. Zatímco selektivní agonisté  $\mu$ -OR a  $\delta$ -OR snižují aktivitu inhibičních GABAergních interneuronů ventrální tegmentální oblasti (VTA), čímž dochází k zvýšenému uvolňování dopaminu v nucleus accumbens (NAc), aktivací  $\kappa$ -OR v mezolimbické projekci dochází ke snížené sekreci dopaminu<sup>43,44</sup>.

Distribuce  $\kappa$ -OR se v NS překrývá spíše s  $\mu$ -OR, v ostatních tkáních naopak s  $\delta$ -OR, krom exprese v hepatocytech<sup>31,34</sup>. V rámci IS se nachází na lidských monocytech, makrofázích, NK buňkách, T-lymfocytech a B-lymfocytech<sup>35</sup>.

## 2.2 Ligandy

Dle vnitřní aktivity na receptorech jsou ligandy obecně rozděleny na agonisty a antagonisty, z hlediska původu na agonisty endogenní, přirozené alkaloidy, polosyntetické a syntetické.

Endogenní opioidy jsou v těle se přirozeně vyskytující látky peptidické povahy, syntetizovány na hrubém endoplazmatickém retikulu (ER) buněk většiny tkání. Účastní se regulace mnohých fyziologických procesů, včetně bolesti, i její emocionální složky<sup>45</sup>. Mezi klasické endogenní opioidy jsou klasifikovány endomorfiny, enkefaliny, dynorfiny a  $\beta$ -endorfiny. Lze je charakterizovat specifickou N-terminální sekvencí – tyrosin-glycin-glycin-fenylalanin, tzv. opioidním motivem, který je klíčový pro interakci s ortosterickou vazebnou kapsou OR a jeho aktivaci. C-terminální fragment je naopak pro každý specifický a určuje selektivitu vůči typům OR<sup>2</sup> (viz Tab. 1).

Mezi nejznámější exogenní agonisty OR patří morfin, fenantrenový alkaloid přírodního původu, získávaný z vysušené šťávy z nezralých makovic máku setého, opia. Jeho struktura je na první pohled velmi odlišná od endogenních opioidů, obsahuje však funkční skupiny, jež vazbu a aktivitu na OR umožňují. Mezi ty klíčové patří fenolová hydroxylová skupina na 3. uhlíku, hydroxylová skupina na 6. uhlíku a terciární dusík v heterocyklu<sup>46</sup>. V játrech podstupují hydroxylové skupiny glukuronidaci a vzniká na OR neaktivní morfin-3-glukuronid (M3G) a morfin-6-glukuronid (M6G), který po úpravě naopak vykazuje vyšší lipofilitu a afinitu k OR<sup>47,48</sup>. Morfin je přes své nežádoucí účinky dodnes jedno z nejpoužívanějších opioidních analgetik. Ve snaze těmto účinkům předejít a docílit efektivnější účinnosti léčiva jsou opiáty modifikovány, vzniká např. oxykodon, či jsou syntetizovány a následně modifikovány plně syntetické opioidy, vzniká např. fentanyl<sup>47</sup>. Pro vývoj těchto alternativ je však zásadní pochopit farmakodynamiku daného léčiva ve vztahu nejen k OR, ale také k dalším receptorovým systémům.

Interakce receptoru s antagonisty naopak vede k zaujetí neaktivní konformace a jeho blokádě. Např. naloxon, syntetický analog morfinu, s nímž sdílí podobnou molekulární kostru, kvůli rigiditě své struktury a sterickým překážkám receptoru není schopen dosáhnout efektivní vazby s klíčovými aminokyselinovými (AA) zbytky hlouběji v ortosterické vazebné kapse. Interakce s jinými AA zbytky tak navodí onen neaktivní stav<sup>46</sup>.

	$\mu$ -OR	$\delta$ -OR	$\kappa$ -OR
DAMGO <sup>b</sup>	+++	-	-
Dynorfin A	++	-	+++
Endomorfin	+++	-	-
Enkefaliny	++	+++	-
Fentanyl	+++	-	-
Morfin	+++	-	+
$\beta$ -endorfiny	+++	+++	-
Naloxon	xxx	×	xx
Naltrexon	xxx	×	xxx

**Tab. 1: Vybrané ligandy OR a jejich vazebná afinita k  $\mu$ -OR,  $\delta$ -OR a  $\kappa$ -OR.** +++ silný agonista, ++ středně silný agonista, + slabý agonista, xxx silný antagonist, xx středně silný antagonist, × slabý antagonist, - bez účinku <sup>49</sup>.

## 2.3 Struktura a aktivace

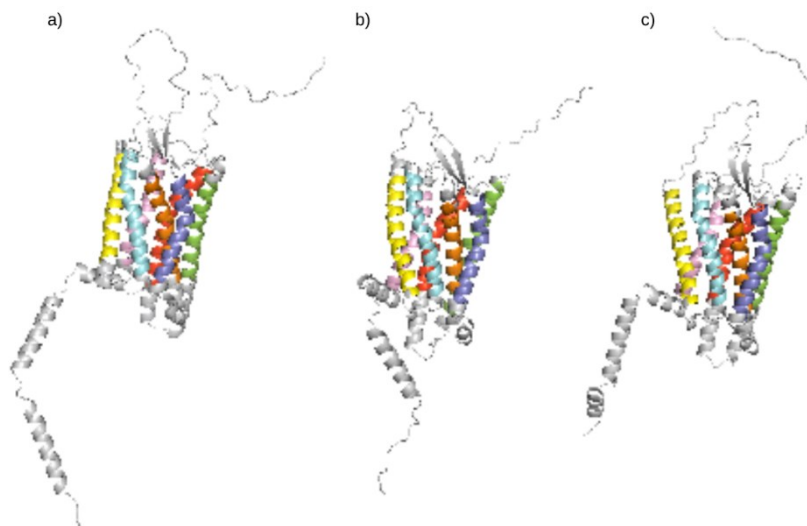
OR jsou tvořeny 372–398 AA. Vysoký stupeň homologie vykazuje transmembránová doména tvořena sedmi hydrofobními  $\alpha$ -helixy (TMH) (32–91 %), které jsou spojeny třemi extracelulárními (ECL) (14–72 %) a třemi intracelulárními smyčkami (ICL) (83–100 %). Naopak úseky extracelulárního N-konce (9–10 %) a intracelulárního C-konce (14–20 %) jsou napříč OR značně odlišné (viz Obr. 1) <sup>23–25,50</sup>.

Protein během maturace prochází mnohými posttranslačními modifikacemi. Na extracelulární straně jsou tvořeny disulfidické vazby zprostředkované konzervovanými cysteinovými zbytky v ECL2–TMH3 a ECL1–ECL2 <sup>51,52</sup>. Dále jsou glykosylovány asparaginy konzervovaných motivů obsaženy v sekvencích N-konce <sup>23,25</sup>. Naopak z intracelulární strany může docházet k palmitoylaci cysteinového zbytku na C-konci. Tato palmitoylace je klíčová pro interakci s G-proteinem a homodimerizaci receptoru <sup>53</sup>.

Úplný agonista přichází do ortosterického vazebného místa, které je tvořeno uvnitř jádra receptoru. Následně, dle svého charakteru, interaguje s AA zbytky TMH, především v TMH3, TMH6 a TMH 7. Některé ligandy však i s AA N-konce a ELC <sup>54</sup>. Jejich vazbou jsou spuštěny konformační změny receptoru, který, dle specifických interakcí ligand–receptor, může zaujímat

<sup>b</sup> [D-Ala(2), N-MePhe(4), Gly-ol]-enkefalin

více aktivních konformací. Struktura ligandu je tedy stěžejní pro následující aktivaci specifických intracelulárních transdukčních molekul, což vede k upřednostnění jedné signalizační dráhy a rozlišným fyziologickým účinkům<sup>55</sup>.



**Obr. 1: Krystalová struktura lidského a)  $\mu$ -OR (ID: 4988) b)  $\delta$ -OR (ID: 4985) c)  $\kappa$ -OR (ID: 4986).** Barevně jsou označeny transmembránové oblasti proteinu: TMH1 – žlutá, TMH2 – cyanová, TMH3 – oranžová, TMH4 – tmavě modrá, TMH5 – zelená, TMH6 – červená, TMH7 – růžová. V horní části obrázku se nachází extracelulární N-konec, v dolní intracelulární C-konec receptoru. Rozdíly v těchto oblastech jsou sekvenčně i strukturně značné, modulují interakce s ligandy a intracelulárními transdukčními proteiny, což se odráží v jejich funkční diverzitě. Převzato<sup>56</sup> a upraveno v PyMOLu a Canvě.

## 2.4 Signalizační dráhy

### 2.4.1 Signalizace přes G-protein

Klasické OR, v případě kanonické signální dráhy, typicky transdukuje signál inhibičními heterotrimerními  $G_{i/o}$ -proteiny, patřících do rodiny G-proteinů s  $\alpha$ -podjednotkou ( $G\alpha$ ) citlivou na *pertusis toxin*<sup>15</sup>. V neaktivním stavu je  $G\alpha$  s GTPázovou aktivitou ve vazbě s guanosindifosfátem (GDP) a asociována s  $\beta\gamma$ -komplexe (G $\beta\gamma$ ). Interakce aktivovaného GPCR s G-proteinem stimuluje disociaci GDP, jeho výměnu za guanosintrifosfát (GTP), konformační změny  $G\alpha$ -GTP a snížení její afinity vůči G $\beta\gamma$ . To vede k rozdělení heterotrimeru na dvě samostatné jednotky modulující další efektorové proteiny<sup>57</sup>.

Při akutním podání agonisty dochází v interakci s  $G\alpha$  k inhibici adenylyl cyklázy (AC)<sup>58</sup>. Důležitou roli v analgezii zprostředkované morfinem hraje zejména striatální AC typu V, jejíž aktivace je primárně řízena  $\mu$ -OR a  $\delta$ -OR<sup>59</sup>. Tento membránově vázaný enzym katalyzuje přeměnu adenosin-5'-trifosfátu (ATP) na cyklický adenosin-3', 5'-monofosfát (cAMP).

Chronická stimulace receptorů má však na aktivitu AC efekt opačný. Mechanismy tohoto procesu nebyly doposud zcela charakterizovány, ale např. experimenty, rekonstruující tuto situaci na buňkách linie COS-7 transfekovaných  $\mu$ -OR a AC typem V, potvrdily zapojení  $G\beta\gamma$ <sup>60</sup>. Zvýšená koncentrace intracelulárního cAMP vede k zesílení aktivity cAMP-dependentní proteinkinázy A (PKA), která následně fosforyluje vazebný protein pro cAMP responzivní element (CREB). Aktivita tohoto transkripčního faktoru v kontextu stimulace přes PKA následně reguluje expresi několika genů související s rozvojem fyzické závislosti na opioidech<sup>61</sup>.

Další role  $G\beta\gamma$  spočívá v modulaci funkce iontových kanálů. V útlumu uvolňování neurotransmiterů z presynaptického zakončení neuronu má význam hlavně inhibice napěťově řízených N- a P/Q- $Ca^{2+}$  kanálů<sup>17</sup>. Ke snížení neurální excitability vede únik  $K^+$  iontů z buňky taktéž  $G\beta\gamma$  aktivovanými G-proteinem řízenými dovnitř usměrňující  $K^+$  kanály (GIRK)<sup>16,18,57</sup>.

Krom toho může  $G\beta\gamma$  aktivovat fosfolipázu (PL) C- $\beta$ , která katalyzuje hydrolýzu fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu (PIP2) na inositol-1,4,5-trisfosfát (IP3) a diacylglycerol (DAG). Působení IP3 na ligandem řízené iontové kanály ER vede k vypuštění  $Ca^{2+}$  a zvýšení jeho intracelulární koncentrace, DAG aktivuje proteinkinázu (PK) C<sup>62</sup>. Studie ukazují významnou roli PKC v regulaci OR, rozvoji tolerance a závislosti na opioidech. Po chronické léčbě morfinem dochází k vzestupu aktivity PKC  $\alpha$  a  $\gamma$  v dorzálních rozích míchy. To vede ke zvýšené desenzitizaci samotných OR a modulaci plasticity N-metyl-D-aspartátových receptorů (NMDAR). Aplikace inhibitoru PKC reverzuje morfinovou toleranci, prodlužuje termální latenci u potkanů v behaviorálních testech a snižuje aktivitu a expresi enzymu<sup>63</sup>. Také antagonisté NMDAR posilují antinociceptivní účinek morfinu<sup>64</sup>.

Signalizací přes G-protein dále také dochází prostřednictvím různých indukčních kaskád k aktivaci mitogenem aktivovaných proteinkináz (MAPK), konkrétně extracelulárními signály regulovaných proteinkináz 1/2 (ERK), c-Jun N-terminálních kináz (JNK) a p38. Do širokého repertoáru buněčných procesů, jež regulují, patří taktéž aktivace CREB<sup>65</sup>.

## 2.4.2 Desenzitizace, internalizace a recyklace receptoru

Každý komplex ligand-receptor vykazuje určitou RAVE hodnotu („relative activity versus endocytosis“). Ta odráží schopnost individuálních ligandů stabilizovat aktivní stav receptoru nebo vyvolat jejich desenzitizaci a endocytózu<sup>66</sup>.

K homologní desenzitizaci OR primárně dochází prostřednictvím fosforylace threoninových a serinových zbytků na C-konci, popřípadě v dalších intracelulárních doménách, aktivovaného receptoru pomocí kináz receptorů spřažených s G-proteinem (GRK), ale i dalších

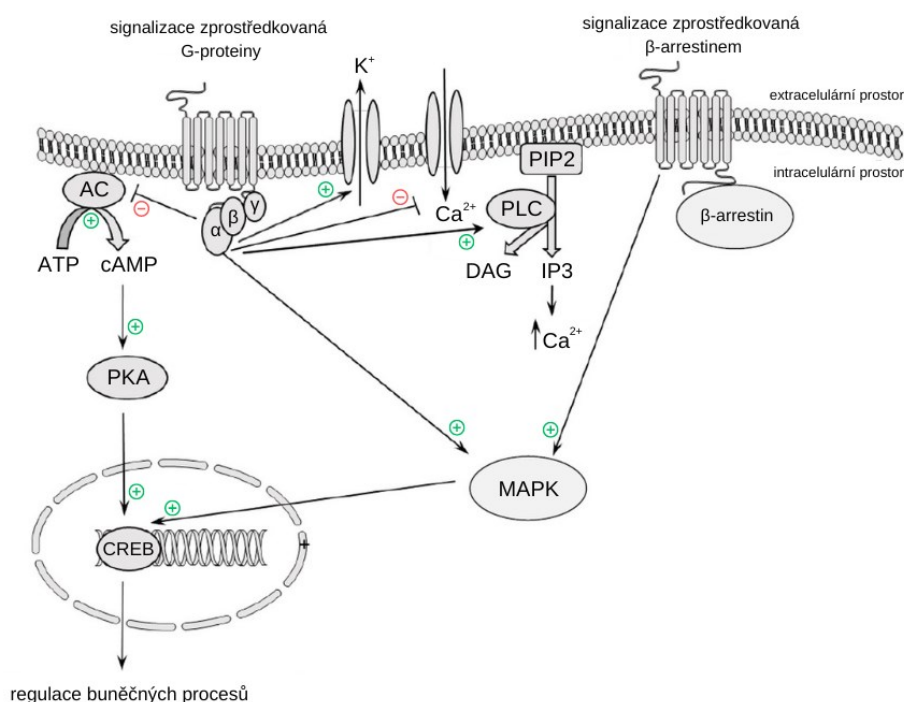


kináz, např. již zmíněnou PKC. Tím je zvýšena afinita těchto segmentů pro vazbu adaptorového proteinu  $\beta$ -arrestinu, interakce GPCR–G-protein již není možná a systém je desenzitivován<sup>19,20,67,68</sup>.  $\beta$ -arrestin je dále důležitým prostředníkem v procesu internalizace, kdy je přes vazbu adaptorového proteinu 2 k desenzitizovanému receptoru rekrutován klatrinový proteinový komplex, který jej za pomoci dynaminu internalizuje<sup>69</sup>. Receptor může být za určitých podmínek defosforylován a znovu vystaven na PM či adresován k degradaci v lysozomu<sup>70</sup>.

Regulace desenzitizace OR je ovlivněna chronickým působením opioidů a podílí se na rozvoji tolerance. Při akutním působení na  $\mu$ -OR vykazuje morfin vyšší hodnotu RAVE než DAMGO, selektivní agonista  $\mu$ -OR, nebo opioidní peptidy, a vyznačuje se sníženou schopností fosforylace receptoru<sup>66,71</sup>. Jeho chronické užívání však vede ke zvýšené expresi GRK2 a  $\beta$ -arrestinu, zvýšené fosforylaci a internalizaci  $\mu$ -OR<sup>20</sup>. Toto působení se na potkaních modelech ukázalo být jako tkáňově specifické, v mozku byly zvýšené hodnoty exprese GRK2 a  $\beta$ -arrestinu pozorovány pouze v locus coeruleus<sup>72</sup>.

### 2.4.3 Signalizace přes $\beta$ -arrestin

Fosforylace receptoru a vznik komplexu OR– $\beta$ -arrestin může vést také k aktivaci MAPK nezávisle na G-proteinu. Tato signalizace je obecně spojována s negativními vedlejšími účinky opioidů při jejich chronickém užívání, souvislosti molekulárních událostí a fyziologických výsledků však nejsou uspokojivě charakterizovány<sup>65</sup>. K dysforickým stavům navozených opioidy přispívá aktivace  $\kappa$ -OR na dopaminergních neuronech VTA. Neuronová excitabilita je modulována fosforylací specifických tyrosinových zbytků GIRK zprostředkovaně přes  $\beta$ -arrestin–p38 $\alpha$  MAPK dráhu. Důsledkem je snížená vodivost GIRK, hyperpolarizace a pokles aktivovatelnosti neuronu. K této specifické regulaci  $\kappa$ -OR signalizace může dojít při působení chronického stresu na organismus, jež mimo jiné indukuje také sekreci dynorfinu. Právě jeho agonistické působení na  $\kappa$ -OR vede ve VTA k výše popsanému efektu<sup>73</sup>. Signalizaci přes  $\beta$ -arrestin však nejsou připisovány jen emočně negativní účinky. Myši, kterým byl podáván SNC80, selektivní agonista  $\delta$ -OR, vykazovaly v behaviorálních testech snížené úzkostné a se strachem spojené chování. Anxiolytický efekt koreloval s aktivací ERK1/2, která nebyla pozorována v limbických strukturách mozku právě u  $\beta$ -arrestin<sup>2</sup><sup>-/-</sup> KO myši<sup>74</sup>.



**Obr. 2: Molekulární mechanismus působení morfinu na OR.** Po vazbě morfinu na OR je spuštěna signalizace přes G-protein.  $G\alpha$  inhibuje AC. Snížená koncentrace cAMP vede k zeslabení aktivace PKA, nedochází k fosforylaci CREB.  $G\beta\gamma$  inhibuje N- a P/Q- $Ca^{2+}$  kanály a aktivuje GIRK. Také aktivuje PLC, která katalyzuje hydrolýzu PIP<sub>2</sub>. IP<sub>3</sub> zvyšuje intracelulární koncentraci  $Ca^{2+}$  působením na ligandem řízené iontové kanály ER. Různé indukční mechanismy zahrnující také  $G\alpha$  a  $G\beta\gamma$  aktivují MAPK. Chronické užívání morfinu zvyšuje fosforylaci intracelulární části GPCR a po vazbě  $\beta$ -arrestinu dochází k  $\beta$ -arrestin-dependentní aktivaci MAPK. Převzato <sup>5</sup>, upraveno v Canvě.

### 3 TOLL-LIKE RECEPTOR 4

#### 3.1 Klasifikace a charakteristika

TLR4 patří do skupiny receptorů rozpoznávající molekulární vzory. Tyto receptory vrozeného IS rozeznávají konzervované strukturní motivy asociované s patogeny nebo DAMPs <sup>75</sup>.

Mechanismus detekce těchto motivů buňkami vrozeného IS nebyl do poloviny 90. let znám. Výzkum byl nasměrován studiem receptoru Toll u *Drosophily melanogaster*, který hraje roli při vývoji dorzo-ventrální polarity octomilčího embrya. Roku 1996 byl ale potvrzen jeho přesah i do IS zprostředkováním indukce exprese antifungálního peptidu Drosomycinu. Již dříve byl na základě podobnosti určitých domén u savců objeven homolog receptoru Toll, ale až rok po tomto zjištění byl naklonován, podrobněji studován a experimentálně dokázána jeho role v aktivaci nukleárního faktoru  $\kappa B$  (NF- $\kappa B$ ). Jednalo se o TLR4, předtím nesl obecné pojmenování hToll <sup>75-77</sup>. Během následujících let bylo charakterizováno několik dalších členů

TLR rodiny, specializované pro určité antigeny. Doposud je u člověka znám TLR1–TLR10, u myši TLR1–TLR13 (myši TLR10 je pouze pseudogen) <sup>78,79</sup>.

Jak je již zmíněno, TLR4 hraje důležitou roli ve zprostředkování adekvátní reakce imunitního systému na LPS, hlavní složku vnějších membrán gramnegativních bakterií <sup>11</sup>. Intracelulární odpověď je zprostředkována dvěma signálními drahami – dependentní na myeloidním diferenciačním faktoru 88 (MyD88) <sup>80</sup>, vedoucí k aktivaci NF- $\kappa$ B a MAPK <sup>81,82</sup>, nebo na adaptorovém proteinu obsahující TIR doménu a indukující IFN- $\beta$  (TRIF) <sup>83,84</sup>, jenž aktivuje IFN regulační faktor 3 (IRF3) <sup>85</sup>. Dráhy na sebe na úrovni různých efektorů vzájemně působí. Výsledkem je exprese mediátorů regulujících zánětlivou odpověď IS <sup>86–91</sup>.

Zánět představuje přirozenou ochranu organismu, jeho dysregulace však může přispívat k mnohým patologickým stavům. TLR4 signalizace je konkrétně sledována např. při invazivitě a tvorbě metastáz některých typů nádorů <sup>92</sup>, neurodegenerativních chorobách spojených s vyšším věkem <sup>93,94</sup>, autoimunitních chorobách <sup>82,88,95</sup> a neuropatické bolesti <sup>95–97</sup>.

### 3.2 Exprese

TLR lze klasifikovat dle jejich buněčné lokalizace, odrážející, jaké typy ligandu daný receptor rozpoznává. Lidské TLR3, TLR7, TLR8 a TLR9 jsou distribuovány intracelulárně na endozomech a mezi jejich antigeny patří především nukleové kyseliny, nebo jejich deriváty, zatímco zbytek receptorů je prezentován na PM <sup>75</sup>. Do této skupiny patří i TLR4, avšak jak je uvedeno dále, pro jejich signalizaci je důležitá taktéž endocytóza a transpozice receptorového komplexu do endozomu.

Co se týče buněčných typů, jejich klíčová úloha se projevuje v IS a NS. V rámci IS jsou TLR4 exprimovány především na leukocytech myeloidního větve, jež se podílejí na odpovědi vrozené imunity, jako jsou monocyty a z nich vzniklé makrofágy a dendritické buňky <sup>96</sup>. Výskyt TLR4 na buňkách adaptivní imunity je naopak asociován s patologickými stavy, často se jedná o následek zvýšené exprese dalších receptorů či zánětlivých mediátorů, tento stav doprovázející <sup>95</sup>. Pro tuto práci je stěžejním tématem exprese TLR4 v centrální NS. Zde jsou lokalizovány jak na neuronech, tak na gliích, které se významně podílí na modulaci nociceptivních vjemů <sup>98</sup>.

TLR4 se dále minoritně nachází i ve tkáních mimo IS a NS <sup>96</sup>. Velkou pozornost si v posledních letech získal díky své expresi v nádorových buňkách rozsáhlého spektra typů rakoviny, jejichž aktivace podporuje tumorigenezi a je asociována s rezistencí k terapii <sup>99–101</sup>.

### 3.3 Ligandy

Právě v aktivaci TLR4 během různých patologických stavů hrají roli ligandy z kategorie DAMPs. Jsou to endogenní molekuly, které jsou za těchto podmínek aktivně či pasivně secernovány zasaženými buňkami, nebo nadměrně exprimované komponenty extracelulární matrix, a vazbou na receptory buněk IS indukují imunitní odpověď<sup>75</sup>.

Za podmínek buněčného stresu dochází k nestandardní lokalizaci proteinů tepelného šoku (HSP), klíčových aktérů v zachování buněčné proteostázy, mimo buňku, kde jsou rozeznány některými receptory IS, včetně TLR4. Vliv interakce TLR4 a HSP90 byl objeven v rámci studií, zabývajících se významem míšních TLR4 v indukci a udržování neuropatické bolesti, jež popisují důležitou kostimulační roli HSP90 v souvislosti modulace nocicepce závislé na TLR4<sup>102</sup>.

Agonistické působení na TLR4 vykazují i některé komponenty extracelulární matrix, které jsou během zánětu zvýšeně exprimovány, jedná se např. o biglykan, fibronectin, hyaluronan a tenascin-C<sup>103</sup>. Dalším příkladem je  $\beta$ -amyloid, peptid, jehož abnormální akumulace v mozku je asociována se vznikem a rozvojem Alzheimerovy choroby. Již v pikomolární koncentraci iniciuje v BV2 mikroglíích a astrocytech zánětlivé mechanismy, přispívající k patofyziologii tohoto onemocnění<sup>104</sup>.

Velmi rozmanité následky má stimulace TLR4 proteinem high mobility group box 1 (HMGB1). Za fyziologických podmínek se tento protein nachází v jádře, ve vazbě na chromatin a podílí se na organizaci genomu, opravách DNA a expresi genů<sup>105</sup>. V důsledku některých stimulů, jako např. aktivace cytokinových receptorů či probíhající nekróza, je HMGB1 translokován do extracelulárních prostor, kde působí jako induktor signalizace receptoru pro konečné produkty pokročilé glykace a TLR4. Interakce TLR4 a HMGB1 představuje pozitivní zpětnovazebnou smyčku posilující zánětlivou odpověď. HMGB1 působením na TLR4 indukuje aktivaci NF- $\kappa$ B a sekreci prozánětlivých cytokinů, což následně amplifikuje uvolňování HMGB1<sup>106</sup>. Hyperaktivita této dráhy se významně podílí také na patogenezi bolesti<sup>106–109</sup> a regulaci tumorigeneze<sup>99</sup>.

Mezi agonisty TLR4 exogenního původu, patří již zmiňovaný LPS<sup>11</sup>. Pro vazbu na TLR4 je nejdůležitější hexaacylovaný a bisfosforylovaný lipid A, známý také jako endotoxin, jenž slouží k ukotvení LPS<sup>110</sup>. Struktura LPS determinuje charakter odpovědi IS. Např. LPS *Rhodobacter sphaeroides* (LPS-RS), který obsahuje pouze 5 acylových řetězců, působí jako kompetitivní inhibitor LPS–TLR4<sup>111</sup>. Antagonistický potenciál struktury LPS-RS byl využit ve

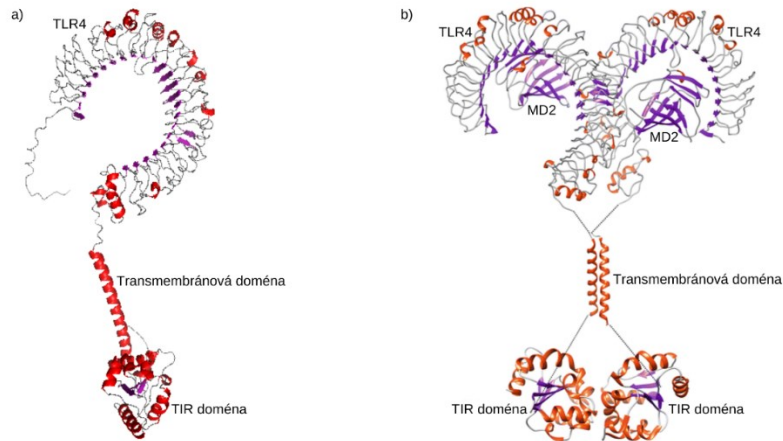
vývoji léčiv proti septickému šoku, neuropatické bolesti či v léčbě rakoviny. Do klinické fáze testování se dostal např. Eritoran a TAK-242 (Resatorvid) <sup>112–115</sup>.

Působení opioidů jako ligandů TLR4 je podrobněji rozebráno v kapitole 4.

### 3.4 Struktura a aktivace

TLR4 jsou transmembránové glykoproteiny typu I, jejichž délka proteinové sekvence se pohybuje okolo 835–840 AA. Lze je rozdělit na 3 domény – extracelulární, transmembránovou a intracelulární <sup>76</sup>. Největší extracelulární N-koncová doména obsahuje 21 tandemově se opakujících motivů repetitivních bohatých na leucin (LRR). LRR motivy, dlouhé 20–30 AA, jsou charakterizovány konsenzuální sekvencí LxxLxLxxNxL s leucinem na klíčových pozicích, umožňující proteinu zaujmout podkovovitý tvar. Povrch receptoru okolo hydrofobního jádra, tvořeného z leucinových zbytků a dalších hydrofobních AA, představují  $\beta$ -listy z konkávní strany a  $\alpha$ -helixy z konvexní. Pro stabilitu a samotnou funkci extracelulární části jsou důležité hydrofobní interakce v jádru, intramolekulární vodíkové můstky a disulfidické vazby na N- a C-konci extracelulární části <sup>116,117</sup>. TLR4 dále obsahuje helikální transmembránovou doménu s navazující C-terminální intracelulární toll-like/IL-1 receptorovou homologickou doménou (TIR) <sup>76</sup>. Jádro TIR tvoří 5 paralelních  $\beta$ -listů, jež je obklopeno 5  $\alpha$ -helixy, sekvenčně obsahuje 3 společné motivy – box 1, 2 a 3 <sup>118,119</sup>. Specifické AA boxu 1 a 2 jsou klíčové pro vazbu adaptorových proteinů <sup>118</sup>. Krystalovou strukturu receptoru ilustruje Obr. 3.

Zahájení intracelulární signalizace TLR4, v odpovědi na LPS, vyžaduje několik dalších aktérů. Již pro translokaci TLR4 z Golgiho aparátu na PM je důležitá interakce s proteinem myeloidní diference 2 (MD-2) přes disulfidické můstky zprostředkované cysteinovými zbytky v N-terminální a centrální části extracelulární konkávní oblasti TLR4 <sup>120,121</sup>. Monomer LPS je k heterodimeru dopraven přes glykofosfatidylinositem ukotvený diferenciační klastr (CD) 14. Jeho zapojení je nezbytné pro indukci TRIF dependentní dráhy, spuštění MyD88 dependentní dráhy jež vyžaduje pouze za nižších koncentrací LPS <sup>83</sup>. CD14 přebírá monomery LPS z LPS-vázacího proteinu (LBP). Následně interagují acylové řetězce lipidu A z LPS s AA zbytky hydrofobní kapsy MD-2. K dimerizaci TLR4 jsou klíčové hydrofobní vazby s AA v Phe126 (fenylalanin) smyčce MD-2. Ta zaujímá tzv. uzavřenou aktivační konformaci, jež přispívá k vytvoření dimerizačního rozhraní umožňující vazby s dalším TLR4–MD2–LPS komplexem <sup>110</sup>. Povrch 2 interagujících TIR domén TLR4 umožňuje vazbu adaptorových proteinů <sup>122</sup>.



Obr. 3: Krystalová struktura a) monomerní forma TLR4 (ID: 7099), b) dimerní formy TLR4–MD2.

Převzato <sup>56,123</sup>, upraveno v PyMOLu a Canvě.

## 3.5 Signalizace

### 3.5.1 MyD88 dependentní dráha

Signalizace závislá na MyD88 je po stimulaci receptoru iniciována interakcí TIR domén TLR4 a adaptorového proteinu obsahující TIR doménu (TIRAP). Pro přenos signálu TLR4 je také důležitá vazba PIP2 vazebné domény TIRAP s PIP2 plazmatické membrány. Již samotné složení PM má tedy vliv na zahájení signalizace <sup>124</sup>. MyD88 je následně navázán k TLR4–TIRAP komplexu. Jeho N-terminální doména obsahuje další typ specifické interakční domény, tzv. doménu smrti (DD), která tvoří vazbu s DD efektorů (kináz asociovaných s receptorem pro IL-1, IRAK) a je nezbytná i pro tvorbu oligomerů proteinů obsahujících DD <sup>80,125</sup>. DD MyD88 podléhá po vazbě k TLR4–TIRAP komplexu konformačním změnám a tvoří hexamery, jež poskytují interakční povrch pro DD IRAK4. Rekrutovány jsou konkrétně 4 molekuly IRAK4 <sup>126</sup>. Pro IRAK je vzhledem k dalšímu šíření signálu důležitá nejen N-terminální DD, ale i jejich centrální Ser/Thr kinázová a 3 TRAF-vazebné domény na C-konci IRAK1 <sup>127</sup>. Právě C-koncová doména IRAK1 nebo IRAK2 jsou důležité pro vazbu k MyD88–IRAK4 <sup>126</sup>. Takto vytvořený komplex, skládající se ze 6 MyD88, 4 IRAK4 a 4 IRAK1/2, je označován jako myddozom <sup>126</sup> a jeho správné sestavení je nezbytnou podmínkou pro další regulaci zánětlivé odpovědi. Deficience proteinů myddozomu či mutace v interakčních doménách jsou asociovány s některými patologickými stavy <sup>128</sup>.

Řádně sestavený myddozom poskytuje podmínky k aktivaci kinázové domény proteinu IRAK4, ta následně fosforyluje a aktivuje IRAK1/2, které podléhají autofosforylaci a dále konformačním změnám <sup>129,130</sup>. Ty v TRAF6 vazebných motivech umožňují interakci s faktorem 6 asociovaným s receptorem TNF (TRAF6), představující E3 ubikvitin ligázu ubikvitinující

různé substráty, včetně IRAK1<sup>130,131</sup>. Interakce indukuje dimerizaci N-terminálních RING domén TRAF6. Tato doména je vyžadována k napojení heterodimerního konjugačního E2 enzymu Ubc13/Uev1, potřebného k ubikvitinační aktivitě ligázy<sup>132</sup>. Poté je komplex schopen ubikvitinylace lyzinových zbytků na pozicích 63 v TRAF6 a IRAK1. Tento typ ubikvitinylace nesměruje označený protein k degradaci ve 26S proteasomu, nýbrž katalyzuje syntézu polyubikvitinylovaných řetězců, které poté slouží jako strukturální lešení pro selektivní vazbu dalších proteinů signální kaskády<sup>133</sup>.

V dalším kroku dochází k aktivaci TGF- $\beta$  aktivované kinázy 1 (TAK1), Ser/Thr kinázy, patřící do rodiny kináz kinázy proteinkinázy aktivované mitogenem<sup>134,135</sup>. Při indukci TAK1 aktivace hrají roli její vazebné proteiny 1 a 2 (TAB1, TAB2). TAB2 interaguje s C-koncem TAK1 v návaznosti na vazbu na polyubikvitinylovaný řetězec TRAF6<sup>136</sup>, zatímco TAB1 asociuje s N-terminální katalytickou doménou této kinázy<sup>135</sup>. Aktivovaná TAK1 translokuje do cytoplazmy (mechanismus translokace – viz kapitola 3.5.2), v tomto kroku se dráha může ubírat dvěma směry.

První vede k aktivaci dimerních transkripčních faktorů NF- $\kappa$ B. Interakce inhibičního proteinu NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B) s aminokyselinovými zbytky umístěných na rozhraní jaderné lokalizační sekvence Rel homologické domény, typické pro N-konec členů skupiny NF- $\kappa$ B, brání v translokaci NF- $\kappa$ B do jádra a vazbě na tzv.  $\kappa$ B sekvence, obsažené v promotorech a dalších cis-regulačních elementech cílových genů<sup>137–139</sup>. Při stimulaci receptoru dochází k výše zmíněným signalizačním událostem. Aktivovaná TAK1 fosforyluje kinázu  $\beta$  I $\kappa$ B (IKK $\beta$ ), která spolu s IKK $\alpha$  a adaptorovým proteinem NEMO (esenciální modulátor NF- $\kappa$ B) tvoří komplex kinázy I $\kappa$ B (IKK)<sup>140</sup>. K aktivaci IKK je krom fosforylace kinázové podjednotky důležitá také vazba NEMO na polyubikvitinylovaný řetězec IRAK1<sup>133</sup>. Aktivovaná IKK katalyzuje fosforylaci určitých serinových zbytků I $\kappa$ B, jež je vyžadována pro ubikvitinylacii lysinových zbytků na pozici 48, předurčující degradaci inhibitoru. Poté je jaderná lokalizační sekvence NF- $\kappa$ B uvolněna<sup>81</sup>. Jaké geny bude následně NF- $\kappa$ B regulovat závisí na charakteru ligandu a buněčném typu. Obecně však TLR4 signalizace přes NF- $\kappa$ B vede k indukci exprese prozánětlivých cytokinů, včetně chemokinů (např. interleukin – IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, tumor nekrotizující faktor  $\alpha$  – TNF- $\alpha$ , CXCL1, CXCL2, CXCL3, CCL2) a adhezních molekul (např. intracelulární adhezní molekula 1 či vaskulární buněčný adhezní protein 1)<sup>88,90,91</sup>. Dále zvyšuje také expresi cyklooxygenázy 2 (COX-2), inducibilní NO-syntázy (iNOS) a prostaglandinu E2<sup>75,89</sup>. NF- $\kappa$ B zvyšuje expresi i samotného TLR4. Experimenty na buněčné linii THP-1 popisují zvýšení množství TLR4 při vyšší koncentraci a dlouhodobějším působení LPS<sup>141</sup>.

Druhá větev dráhy směřuje k aktivaci MAPK – ERK1/2, JNK a p38 fosforylací TAK1. Mezi cíle aktivovaných MAPK patří také podjednotky aktivátorového proteinu 1 (AP-1), transkripčního faktoru regulujícího expresi genů kontrolujících diferenciaci, proliferaci a apoptózu. MAPK reguluje jejich aktivitu již od transkripční úrovně, fosforylace samotných proteinů má pak vliv na dimerizaci a stabilitu komplexního AP-1. Ta je nezbytná pro vazbu na AP-1 motivy v sekvenci promotorů genů dalších prozánětlivých mediátorů <sup>142</sup>. Např. v peritoneálních makrofázích a dendritických buňkách ovlivněných LPS je indukovaná na TLR4–MAPK závislá dimerizace c-Jun–ATF2. Ty aktivují promotor genu *p19*, kódující podjednotku prozánětlivého IL-23, jenž se podílí na modulaci odpovědi IS v průběhu rozvoje autoimunitních onemocnění <sup>82</sup>. Dalším zajímavým příkladem je regulace dráhy TLR4-TAK1-p38 v mikroglíích ve vztahu k míře exprese sigma-1 receptoru (Sig1R). Sig1R je chaperon ER, usměrňující rovnováhu hladiny intracelulárního Ca<sup>2+</sup>, s významnou rolí v neuroprotekcii. Aktivací této dráhy působením LPS na kultivované mikroglie došlo ke snížené expresi Sig1R, což vede k narušení Ca<sup>2+</sup> homeostázy, indukující neurozáněť a neurodegeneraci. Jako prostředník mezi p38 a regulací transkripce Sig1R byla navržena histon deacetyláza 6 <sup>94</sup>. MAPK p38 může také aktivovat CREB, který je aktivován taktéž zvýšenou hladinou cAMP, což vede k indukci exprese antiapoptotických faktorů v aktivních makrofázích. Tím zabraňuje předčasnému ukončení vrozené imunitní odpovědi. Mnohé patogeny totiž produkují toxiny, jež tuto dráhu inhibují a makrofágy jsou tak náchylnější k apoptóze <sup>143</sup>.

### 3.5.2 TRIF dependentní dráha

Jak je již zmíněno, pro aktivaci TRIF dependentní dráhy je nezbytný CD14 <sup>83</sup>. Po dimerizaci 2 TLR4–MD2–LPS komplexů by bez jeho přítomnosti nebyla možná efektivní endocytóza komplexu a indukce TRIF dependentní dráhy. Specifická koexprese TLR4 a CD14, jež je rozdílná skrze buněčné typy i jejich vývojová stádia, tudíž částečně předurčuje typ dráhy v odpovědi na LPS. Endocytóza je zprostředkována tyrosinkinázou sleziny (Syk) a PLCγ2, do dalších kroků je zapojen klatrin a dynamin <sup>83</sup>.

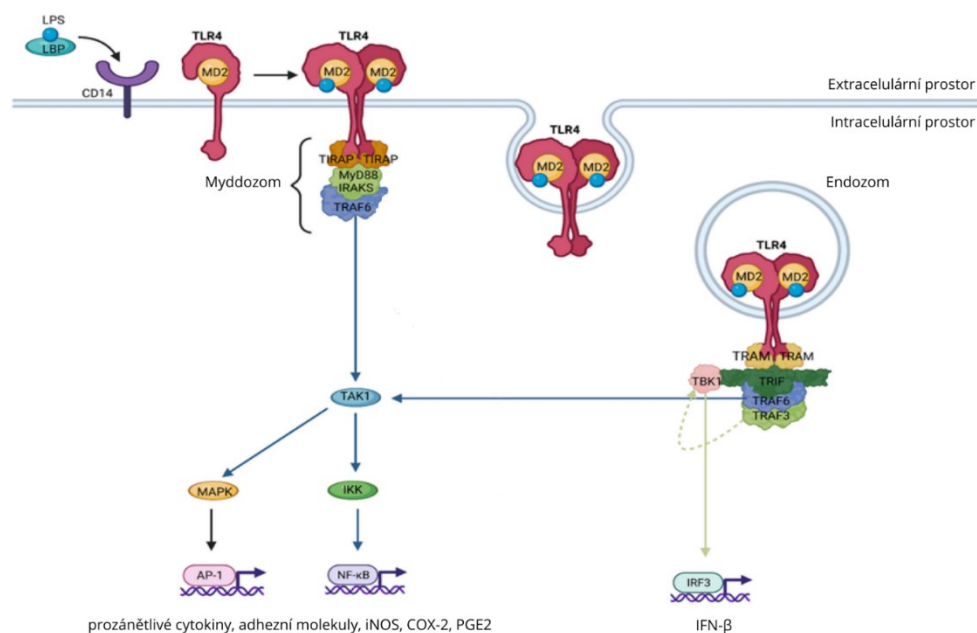
Na začátku samotné signalizace hraje opět roli interakce TIR domén. TRIF je k TLR4 rekrutován přes adaptorový protein podobný TRIF (TRAM), obsahující TIR doménu. TRAM na svém N-konci obsahuje specifickou myristoylační konsenzuální sekvenci, jež je zodpovědná za ukotvení proteinu k PM. Po stimulaci buněčné linie Ba/F3 ovlivněné LPS (1 g/ml) dochází s časovým odstupem 30 minut k internalizaci TRAM–TRIF do endozomu a kolokalizaci s receptorovým komplexem <sup>84</sup>.



Následně interagují N-terminální TRAF vazebné domény TRIF s TRAF6 a TRAF3. Asociace s TRAF6 probíhá za podmínek, kdy je ještě TRAM–TRIF lokalizován na PM a nebyla indukovaná endocytóza komplexu. Signalizační role TRAF6 je stejná, jako za stimulace efektorů MyD88 dependentní dráhy – podporuje aktivaci NF- $\kappa$ B a MAPK<sup>84,144</sup>. Naopak spojení s TRAF3 je detekováno až z internalizovaného receptorového komplexu<sup>84</sup>, její ubikvitinylační aktivita je indukovaná analogickým způsobem jako u TRAF6 a dále podporuje expresi interferonu- $\beta$  (IFN- $\beta$ ). TRAF3 je rekrutován taktéž pomocí IRAK1, v kontextu MyD88 dependentní dráhy však slouží jako inhibitor aktivace NF- $\kappa$ B a MAPK. Všechny mechanismy zapojené do této inhibice nejsou dosud zcela objasněny. Je ale známo, že ubikvitinylace na lyzinových zbytcích TRAF3 na pozicích 48 (jež je zprostředkována E3 ubikvitin ligázami reagující na polyubikvitinylované řetězce na lyzinových zbytcích TRAF6 na pozicích 63), a její degradace umožňuje disociaci vzniklého signalizačního komplexu, včetně TAK1, od receptoru při PM do cytoplazmy, kde může ovlivňovat další efektorů. Zároveň je degradací TRAF3 znemožněna indukce produkce IFN- $\beta$ <sup>145,146</sup>. Roli v regulaci ubikvitinylace TRAF hrají roli také interakce se Syk<sup>147</sup>. Buňky se sníženým množstvím Syk kinázy či ligázy, zodpovědné za ubikvitinylacii lyzinových zbytků TRAF3 na pozicích 48, nebo ovlivněné inhibitorem proteazomu MG132 vykazují nižší intenzitu aktivace MAPK po stimulaci LPS, exprese IFN- $\beta$  není ovlivněna<sup>145,147</sup>. Tato modulace signalizačního potenciálu TRAF3 v závislosti na okolních stimulech z ní dělá klíčového regulátora zánětlivé odpovědi TLR4.

Vzniklé polyubikvitinylované řetězce TRAF3 na lyzinových zbytcích na pozicích 63 rekrutují přes adaptorové proteiny TANK-vázající kinázu 1 (TBK1) a IKK $\epsilon$ . TBK1 je pro expresi IFN- $\beta$  nezbytný, zatímco IKK $\epsilon$  se podílí až na aktivaci IFN- $\beta$  indukovaných genů. N-terminální kinázová doména TBK1 je aktivovaná formací dimeru a trans-autofosforylací specifického serinového zbytku v aktivační doméně kinázy<sup>148</sup>.

Následně je aktivován IRF3. TBK1 fosforyluje klastr serinových zbytků C-terminální domény IRF3, což způsobuje konformační změny a dimerizaci<sup>149</sup>. Ta není podmínkou pro samotnou translokaci IRF3 do jádra, nýbrž je stěžejní pro utvoření nukleoproteinového komplexu s koaktivátory IRF3 a vazbu N-terminální DNA-vazebné domény na promotor regulujících genů<sup>85</sup>. TRIF dráha vyúsťuje indukci exprese IFN- $\beta$ , který může působením na IFN receptory I. typu stimulovat sekreci protizánětlivého IL-10<sup>86</sup>. Ve druhé větvi dráhy může TBK1 aktivovat taktéž MAPK a NF- $\kappa$ B<sup>87</sup>. Signalizace TLR4 (celé schéma viz Obr. 4) tudíž vede k produkci pro i protizánětlivých efektorů, což představuje rafinovaný regulační systém schopný efektivní koordinace imunitní homeostázy.



**Obr. 4: Schématické znázornění TLR4 signalizace.** Po stimulaci receptoru TLR4 na PM dochází k aktivaci MyD88 dependentní signalizační dráhy. Sestavený myddozom indukuje aktivaci TAK1, jež dále aktivuje MAPK, nebo fosforyluje IκB. Výsledkem je translokace transkripčních faktorů, důležitých pro indukcii produkce prozánětlivých cytokinů, do jádra a stimulace exprese jejich cílových genů. Nebo dochází k indukci TRIF dependentní dráhy, pro níž je nezbytná internalizace receptoru do endozomu. Následkem je aktivace IRF3, který reguluje expresi IFN-β. Převzato <sup>150</sup>, upraveno v Canvě.

## 4 KOMUNIKACE MEZI SIGNÁLNÍMI SYSTÉMY OR A TLR4

### 4.1 Nestereoselektivní působení opioidů na TLR4 v nepřítomnosti LPS

Následující část již popisuje vzájemnou interakci složek receptorových systémů OR a TLR4.

Tato podkapitola se konkrétně zaměřuje na působení opioidních ligandů na TLR4 signalizaci za nepřítomnosti LPS. Působení může být přímé, vazbou opioidu na TLR4 <sup>10</sup>, či nepřímé, indukci produkce a extracelulární translokace HMGB1, endogenního ligandu TLR4 <sup>106</sup>. *In vivo*, se tato interakce projevuje specificky v centrální NS, kde aktivuje mediátory zprostředkující neurozáněť. Ten snižuje analgetické účinky opioidů, paradoxně zvyšuje senzibilitu vůči bolesti a přispívá k udržení tohoto stavu <sup>108,151</sup>. Také podporuje rozvoj závislosti <sup>152</sup>. Působení opioidů na TLR4 je tudíž detekovatelné behaviorálním testováním, kde sledované objekty vykazují sníženou latenci vůči bolestivým podnětům a adiktivní chování.

#### 4.1.1 Stereoselektivita OR a TLR4 vůči opioidům

Pro pochopení modulace signalizace TLR4 opioidy je nejdříve nutné vysvětlit stereoselektivitu OR a TLR4.

Valná většina receptorů, včetně OR, je stereoselektivní, což znamená, že preferují vazbu určitého enantiomeru. Konkrétně OR vykazují vazebnou afinitu pouze k (-)-opioidním enantiomerům. Struktura (+)-opioidních enantiomerů nevyhovuje požadavkům pro interakce s určitými aminokyselinovými zbytky OR a stabilizace receptoru v jeho aktivovaném stavu není možná<sup>153</sup>. (+)-opioidy tudíž nepřispívají k analgezii zprostředkované OR.

Jejich působení na TLR4 je naopak nestereoselektivní. Obě enantiomerní formy mají vazebnou afinitu k receptoru a indukují, či blokují, aktivaci signální dráhy<sup>10</sup>. Existenci nestereospecifických vazebných míst opioidů zmiňuje již studie Goldsteina a kol.<sup>154</sup> z roku 1971, ale až Hutchinson a spol.<sup>10</sup> v roce 2010 předkládají jasné důkazy, že ona nestereospecifická vazebná místa poskytují TLR4. Existují však určité výjimky, např. (+)-norbinaltorfimin, selektivní antagonist  $\kappa$ -OR, inhibuje TLR4 jen v této enantiomerní formě<sup>155</sup>. Dále M3G vykazuje afinitu pouze k TLR4 a M6G, naopak jen k  $\mu$ -OR<sup>10,156</sup>.

#### 4.1.2 Vazba na MD-2

Studie Hutchinsona a spol.<sup>10</sup> dále obsahuje experimenty, které konkretizují lokalizaci působení opioidních ligandů na extracelulární oblast TLR4. To, že jedná o MD-2 hydrofobní vazebnou kapsu, bylo teoreticky demonstrováno až *in silico* dokovacími experimenty. Studie také poskytuje přehled opioidních agonistů, seřazených dle jejich schopnosti indukovat TLR4 signalizaci. Data byla získána stimulací buněčné linie HEK293-hTLR4 (buněčná linie 293 odvozená z lidských embryonálních ledvinových buněk, transfekována TLR4, CD14 a MD-2). Nejefektivnějším agonistou TLR4, po LPS, je M3G, zbylé testované opioidy vykazují podobnou úroveň účinnosti, i co se týká porovnání rozdílných enantiomerů morfinu a metadonu. Aktivace stimulace TLR4 opioidy je však oproti LPS daleko nižší, ani 10  $\mu$ M koncentrace M3G nestačí na vyrovnání intenzity odpovědi vyvolanou 0,5 ng/ml LPS. Dále byla pozorována inhibice (-)-morfinem a M3G indukované TLR4 signalizace (+)-naloxonem, intenzita inhibice je závislá na dávce.

Efektivitu indukce TLR4 signalizace M3G lze připsat hydrofilní glukuronidové skupině. Opioidní agonisté, stejně jako LPS, interagují hydrofobně s AA zbytky MD-2 vazebné kapsy a indukují uzavřenou aktivační konformaci smyčky Phe126. Zatímco komplex MD-2–morfin pro svou stabilitu během simulace molekulární dynamiky vyžaduje přítomnost TLR4, glukuronidová skupina M3G umožňuje interakce i s AA zbytky hlouběji v MD-2 vazebné kapse, což vede ke specifické konformaci MD-2. Během simulace tak TLR4 nevyžaduje. Naloxon, stejně jako morfin, stabilizuje až komplex MD-2–TLR4, a i když se vazby, jež s MD-2 tvoří, kryjí s agonisty TLR4, Phe126 je za jeho působení přepnuta do stavu neaktivního<sup>10,156</sup>.

### 4.1.3 Opioidy indukovaná TLR4 signalizace

V *in vivo*, či *in vitro* (za použití buněčné linie, která hojně exprimuje také OR) experimentech, je ale nutné potvrdit, že se na výsledném účinku opravdu podílí stimulace opioidů skrze TLR4, nikoliv pouze přes OR. K zjištění příspěvku signalizace opioidů přes jednotlivé receptory se proto využívají genetické modifikace, např. vyřazení genů pro TLR4, MyD88,  $\mu$ -,  $\delta$ - a  $\kappa$ -OR, či selektivní ligandy pro určitý typ receptoru.

Nepřímé důkazy o interakci opioidů a TLR4, poskytují již experimenty provedené před rokem 2010, i když autoři studií tehdy neměli tušení o této souvislosti. U myší, s trojnásobným vyřazením genů kódujících  $\mu$ -,  $\delta$ - a  $\kappa$ -OR, po akutní aplikaci (–)morfinu nebyl sledován analgetický efekt, přesto po několikadenním užívání přešel účinek v hyperalgezií <sup>157</sup>. Myši, předlěčené (+)morfinem před aplikací (–)morfinu, vykazovaly v testu švihnutí ocasem sníženou latenci, než při podání samotného (–)morfinu. Aplikace inhibitoru glií, propentofylinu, latenci prodlužovala i v případě, kdy byla antianalgezie vyvolaná předlěčením (–)morfinem. Také obě enantiomerní formy naloxonu byly schopny blokovat antianalgezií způsobenou (+) i (–)morfinem <sup>158</sup>.

Aktuální studie, již s vědomím o zapojení TLR4, dále definují intracelulární efekty indukované vazbou opioidů a produkty této signalizace. Wang a spol. <sup>151</sup> nejprve popisují, že morfinem indukovaná aktivace NF- $\kappa$ B v imunokompetentních buňkách centrální NS je blokována kompetitivními inhibitory LPS, kurkuminem a LPS-RS, v závislosti na jejich dávce. Také transfekce BV2 mikroglií protisměrným TLR4 nebo MD-2 oligonukleotidem, snižuje expresi produktů NF- $\kappa$ B aktivace, NO, IL-1 $\beta$  a TNF- $\alpha$ . Další experimenty *in vivo* charakterizovaly, že indukce zánětu probíhá přes MyD88 dependentní dráhu. *Tlr4*<sup>-/-</sup> či *MyD88*<sup>-/-</sup>KO myši, po akutní intratekální aplikaci morfinu (0,1–50 mg/kg), vykazovaly výrazně zvýšenou latenci v testu na termální citlivost, oproti myším divokého typu (WT). Vzorky míchy *Tlr4*<sup>-/-</sup> KO myši také obsahovaly sníženou hladinu fosforylovaných p38, JNK a ERK, které byly v celém rozmezí použitých dávek morfinu zvýšeny ve vzorcích z WT myši. Stejná výzkumná skupina dále popisuje, že po chronickém 7-denním intratekálním podávání morfinu (0,75 mg/kg) myším, se u WT rozvíjí antinociceptivní tolerance korelující se zvýšenou expresí TLR4, TAK1 a NOD-, LRR- a pyrin doménu obsahujícího proteinu 3 (NLRP3) a fosforylací TAK1 v mikrogliích v dorzálních rozích míchy. To následně vede k amplifikaci produkce IL-1 $\beta$  a IL-18. Znaky antinociceptivní tolerance *Tlr4*<sup>-/-</sup> KO myši nevykazují a nedochází u nich k aktivaci TAK1 a NLRP3 <sup>3</sup>. Jak již bylo zmíněno, indukovaný TLR4 zánět opioidy se také podílí na vzniku závislosti, což dokazuje další studie Hutchinsona a spol. <sup>152</sup>.

Aplikace (+)-naloxonu potkanům u nich blokuje indukovanou preferenci místa morfinem a potlačuje samo-aplikaci remifentanylu, syntetického agonisty  $\mu$ -OR. Dále (+)-naloxon (1 mg/kg) také inhibuje zvýšení hladin extracelulárního dopaminu v NAc, důležité oblasti mezolimbické dráhy odměny, indukované aplikací morfinu (6 mg/kg). *Tlr4*<sup>-/-</sup> či *MyD88*<sup>-/-</sup> KO myši v testu preference místa neupřednostňují oxykodonem podmíněné místo, zároveň u nich v porovnání s WT dochází k silnějšímu analgetickému efektu a snížené fosforylaci p38 a JNK, jež je také závislá na TLR4 signalizaci.

Tyto experimenty tedy jasně dokazují, že stimulace TLR4 opioidy spouští MyD88-dependentní signální kaskádu, zahrnující stejné efektoři a výsledné produkty, jako při stimulaci LPS–TLR4, vedoucí k indukci neurozánětu.

#### 4.1.4 Opioidy navozená regulace hladiny extracelulárního HMGB1

Jako další možný způsob komunikace mezi těmito dvěma receptorovými systémy je regulace uvolňování HMGB1 působením opioidů. Extracelulární HMGB1 se váže na TLR4 a indukuje aktivaci NF- $\kappa$ B<sup>106</sup>. Tento typ signalizace se podílí hlavně na prolongaci bolestivých stavů a udržování neurozánětu i za nepřítomnosti drogy<sup>106–108</sup>.

Studie Qiana a spol.<sup>106</sup> popisuje, že po chronické 6-denní intratekální aplikaci morfinu potkanům dochází ke zvýšené expresi HMGB1 a TLR4 v neuronech a gliích dorzálních rohů míchy. Paralelně s tím se rozvíjí analgetická tolerance a hyperalgezie. Ty jsou potlačeny inhibicí aktivity HMGB1, a to za podmínek, kdy je HMGB1 blokován od prvního dne podání opiátu, i za stavu vyvinuté morfinové antinociceptivní tolerance. Efekt morfinu je plně zprostředkován skrze TLR4, jenž přes aktivaci NF- $\kappa$ B indukuje produkci IL-1 $\beta$ , IL-6 a TNF- $\alpha$ , podporující uvolňování HMGB1. Specifický antagonist  $\mu$ -OR nemá na jeho účinky vliv. Mo a spol.<sup>109</sup> stejný fenomén zkoumají v periakvaduktální šedé hmotě, oblasti mezencefala, modulující nociceptivní informaci vedoucí z mozku do dorzálních rohů míchy. Pozorováním vlivu morfinu na oddělenou a společnou kultivaci Neuro-2a a BV2 mikroglíí bylo zjištěno, že produkce HMGB1 a prozánětlivých cytokinů je závislá na přítomnosti mikroglíí. Těmito mediátory je následně zprostředkována fosforylace podjednotek NMDAR neuronů, zvyšující jejich Ca<sup>2+</sup> permeabilitu a neuronální excitabilitu, indukující hyperalgezi.

Grace a spol.<sup>107,108</sup> zas přisuzují HMGB1 klíčovou roli v prolongaci alodynie po chronické konstrikci sedacího nervu (CCI) u potkanů, kteří po zákroku absolvovali léčbu morfinem. U kontrolní skupiny přecitlivělost odezněla do 5 týdnů po CCI. Pětidenní léčba morfinem, aplikovaná 10 dní po zákroku tuto dobu prodlužuje o 6 týdnů. Ukázalo se, že trvalá senzibilizace a neustávající neuropatická bolest je důsledkem přímé aktivace a zvýšené exprese

NLRP3 v míšních mikrogliích, kdy zprostředkující mechanismus je závislý na stimulaci TLR4 a P2X7 receptorů. Dochází k uvolňování IL-1 $\beta$  a DAMPs, včetně HMGB1. IL-1 $\beta$  následně zvyšuje extracelulární hladiny glutamátu zesílením endocytózy jeho transportéru<sup>159</sup>, což vede k narušení homeostázy neurotransmiteru. Uvolňování DAMPs je posíleno. Patří mezi ně i ATP, který stimuluje P2X7 receptory. Prvotní impulz, morfin, amplifikoval efekty dráhy. Ta je však i za jeho nepřítomnosti v dlouhodobém časovém horizontu udržována právě touto pozitivní zpětnovazebnou smyčkou, zahrnující HMGB1<sup>107,108</sup>.

## **4.2 Opioidy navozená regulace zánětlivé odpovědi po aktivaci TLR4 lipopolysacharidem**

I když je TLR4 signalizace, v buněčné linii HEK293-hTLR4 v experimentech Hutchinsona a spol.<sup>10</sup>, opioidními agonisty aktivována, za přítomnosti LPS je tomu jinak. Stevens a spol.<sup>160</sup> popsali, že současné ovlivnění těchto buněk LPS (100 ng/ml) a morfinem (3–100  $\mu$ M), nebo LPS (30 ng/ml) a fentanylem (1–100  $\mu$ M), TLR4 signalizaci, v porovnání s působením samotného LPS, tlumí. Přidání opioidního antagonisty, naloxonu, ani selektivního  $\mu$ -OR antagonisty  $\beta$ -funaltrexaminu, potlačení TLR4 signalizace nezvrátilo, naopak jej posílilo. Tyto výsledky naznačují, že opioidní ligandy inhibují LPS indukovanou TLR4 signalizaci nekompetitivním způsobem.

Imunosupresivní účinek opioidů může být tedy zprostředkován tímto způsobem, přes vazbu opioidního ligandu na TLR4, ale také indukci signalizace OR, jejíž efekty mohou inhibovat intracelulární signalizaci TLR4. Vysvětlení molekulárního mechanismu, jímž k této regulaci dochází, jako první poskytuje studie Madera-Salcedo a spol.<sup>161</sup> z roku 2013. Experimenty byly provedeny na žírných buňkách derivovaných z kostní dřeně myši. Po preinkubaci buněk s morfinem (1 mM), došlo po jejich ovlivnění LPS (500 ng/ml), až ke 40% poklesu sekrece TNF. Dále byla za pomoci farmakologických blokátorů definována dráha, již samotná stimulace LPS exocytózu TNF řídí. Bylo zjištěno, že zahrnuje membránové proteiny spojené s vezikulami citlivými na tetanový toxin, aktivované MAPK, fosfatidylinositol-3-kinázu, IKK, podstatná je také přítomnost Ca<sup>2+</sup>. IKK dále v komplexu fosforyluje synaptozomálně asociovaný protein 23, důležitou součást membránového fúzního aparátu. Dalšími pokusy se podařilo identifikovat nejzazší místo účinku morfinu v rámci TLR4 signalizační kaskády, TRAF6. Již dřívější publikace<sup>162</sup> zjistily, že na negativní regulaci TRAF6 se podílí sestavení komplexu TRAF6/ $\beta$ -arrestin 2, jímž je znemožněna další signalizace. Působení morfinu opravdu zvyšovalo množství těchto komplexů v buňce. Jejich tvorbu zvrátil naloxon (10  $\mu$ M) nebo specifictí  $\mu$ - a  $\delta$ -OR antagonisté. Jiná výzkumná skupina<sup>163</sup>

charakterizuje další možný cíl působení  $\beta$ -arrestinu 2 na LPS indukovaných peritoneálních makrofázích z myši a HEK293-hTLR4. Morfin stimuluje sestavení komplexu  $\beta$ -arrestinu 2 s proteinkinázou p38, jejíž aktivace je na tomto kroku závislá, a dále vede k produkci protizánětlivého IL-10.

V centrální NS má spolupůsobení opioidů a LPS duální charakter. Na jednu stranu existují důkazy, že opioidní agonisté mohou za přítomnosti zánětlivého agens regulovat imunitní odpověď a působit neuroprotektivně. Např. nízké dávky dynorfinu A<sub>1-8</sub> (0,1 fM–1 pM) inhibují nadměrnou LPS indukovanou (20  $\mu$ g/ml) produkci neurotoxického NO, v kultuře primárních myších kortikálních neuronů a gliích. Zároveň je detekováno snížení hladiny laktátdehydrogenázy v kultivačním médiu, která je uvolňována z buněk s narušenou PM<sup>164</sup>. Skupina vědců z Univerzity Karlovy<sup>165</sup> zaznamenala stejný efekt na mikrogliální buněčné linii C8-B4. Doplňuje další mechanismy, jimiž preinkubace s opioidními agonisty, DAMGO, [D-Ala<sup>2</sup>, D-Leu<sup>5</sup>]-enkefalinem a U-50488 (0,01–1  $\mu$ M), předchází LPS (1  $\mu$ g/ml) indukované cytotoxicitě. Oproti samotnému LPS, stimulace buněk opioidy snížila expresi glukózového transportéru 1, akumulaci kyslíkových radikálů a superoxidových aniontů v buňkách, produkci nikotinamidadenindinukleotidfosfátu. Naopak byl sledován nárůst hladiny enzymů superoxidodismutázy, katalázy, glutationperoxidázy a tripeptidu glutationu. Zdá se, že regulaci těchto antioxidačních a protizánětlivých účinků opioidy zprostředkovávají skrze aktivaci transkripčního faktoru „nuclear transcription factor erythroid 2-related factor-2“, jenž udržuje redoxní homeostázu zvýšením exprese cytoprotektivních enzymů.

Na druhou stranu mohou opioidy v centrální NS také amplifikovat prozánětlivý účinek LPS, což popisuje studie Merighiho a spol.<sup>166</sup> Fosforylace PKC $\epsilon$ , následně stimuluje dráhu PKB–ERK1/2–NF- $\kappa$ B, jež v LPS (1 mg/ $\mu$ l) indukovaných primárních myších mikrogliích vede k produkci NO, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  a IL-6, je za přítomnosti morfinu (100 nM) posílena. Navíc, při transfekci buněk pomocí protisměrného oligonukleotidu  $\mu$ -OR je tento příspěvek morfinu za stejných podmínek zcela potlačen. Vyšší koncentrace drogy (10  $\mu$ M) již intenzitu prozánětlivého příspěvku morfinu pouze snižuje<sup>167</sup>. To naznačuje, že nižší dávky morfinu vedou ke kostimulaci LPS zánětlivých procesů skrze  $\mu$ -OR, ale za vyšších dávek dochází k indukci téže dráhy přes TLR4.

Opioidy tedy modulují LPS-indukovanou TLR4 signalizaci různými způsoby, přímo, vazbou na TLR4, ale i přes OR. Zůstává však otázkou, jakou mírou se *in vivo* jednotlivé receptorové systémy na imunosupresi podílejí, a také, co určuje charakter odpovědi současného působení agonisty TLR4, LPS, a opioidních ligandů v rámci periferie těla versus centrální NS.

### 4.3 Epigenetická regulace TLR4 zprostředkovaná opioidy

Nejnovější publikace představují úlohu epigenetických mechanismů, především RNA interferencí, v regulaci TLR4 signalizace zprostředkované opioidy. V souvislosti s tímto jevem je nejčastěji zmiňována miRNA-146a. Jejím významem v rámci vrozeného IS se poprvé zabývá studie Taganova a spol.<sup>168</sup> z roku 2006. Popisuje, že, po působení LPS, TNF- $\alpha$  a IL-1 $\beta$  je indukce exprese miRNA-146a v lidské monocytární buněčné linii THP-1 závislá na vazbě NF- $\kappa$ B v promotorové oblasti genu. Za použití 3' nepřekládané oblasti luciferázových reportérů byla identifikována cílová místa pro miRNA-146a, která představují 3' nepřekládané oblasti transkriptů IRAK1 a TRAF6. Další studie potvrdily, že miRNA-146a je příčinou posttranslační represe i samotného TLR4, a že se na zahájení miRNA-146a exprese mimo NF- $\kappa$ B podílí také MAPK a AP-1<sup>169,170</sup>. Jako součást negativní zpětnovazebné smyčky tak regulací esenciálních složek TLR4 signalizační dráhy tlumí zánětlivou odpověď a napomáhá předejít sepsi.

Již ve spojitosti s opioidy bylo zjištěno, že chronická léčba morfinem snižuje schopnost miRNA-146a modulovat zánět indukovaný pomocí LPS. Tento mechanismus je zprostředkován inhibicí exprese miRNA-146a. Za fyziologického stavu dochází po určité době působení LPS ke snížení počátečního nárůstu hladiny prozánětlivých cytokinů, k tzv. endotoxinové toleranci. Ta je právě po chronické aplikaci drogy potlačena. Efekt je pozorován jako zvýšená hladina sérového IL-6 jak *in vivo*, u myši, tak *in vitro*, na myši makrofágové buněčné linií J774.1. Tato inhibice probíhá přes  $\mu$ -OR, u  $\mu$ -OR<sup>-/-</sup> KO myši s aplikovaným morfinem a LPS je hladina miRNA-146a stále zvýšena, samotný morfin na hladinu miRNA-146a ve sledovaných buňkách IS nemá žádný vliv. U *Tlr4*<sup>-/-</sup> KO myši zůstává hladina IL-6 po podání morfinu a/nebo LPS nezměněna. To naznačuje, že snížení tolerance zprostředkované morfinem je způsobeno současnou činností OR a TLR4<sup>171</sup>.

Grace a spol.<sup>172</sup> tento typ regulace zkoumali v kontextu modulace neuropatické bolesti, kdy stavěli na datech ze svých předchozích studií, jež dokazují, že léčba morfinem po CCI u potkanů významně prodlužuje trvání alodynii v důsledku aktivní signalizace TLR4 (podrobněji viz kapitola 4.1.4)<sup>107,108</sup>. Čtyřdenní intratekální aplikace mimetika miRNA-146a 5 týdnů po zákroku, kdy kontrolní skupina potkanů již vykazuje prahové hodnoty pro mechanickou alodynii jako před CCI, opravdu jinak přetrvávající hypersenzitivitu snižuje. V testech však potkani nedosahují takových hodnot latence jako před zákrokem, účinek navíc po 72 hodinách téměř vymizel. Studie Wang a spol.<sup>173</sup> doplňuje, že nástup morfinové tolerance je potlačen intratekální aplikací lentivirového vektoru, podporující expresi miRNA-146a. S tím je sledován pokles exprese míšních TLR4, IRAK1 a TRAF6.



Ukazuje se, že exprese dalších miRNA může být opioidy modulována i pozitivně. Např. Remifentanyl snižuje následky ischemicko-reperfučního poškození myokardu zvýšením hladiny miR-206-3p<sup>174</sup>. Review Chena a spol.<sup>175</sup> zas shrnuje dosavadní poznatky o roli  $\delta$ -OR při reakci na neurozánět vyvolaný hypoxií či ischemií mozku, který řídí maturaci široké škály miRNA, přispívající k neuroprotekcii. Mezi cílové molekuly těchto miRNA patří také některé efekторы TLR4 signální kaskády. Terapeutickému využití však brání hluboká neznalost mechanismů, jimiž opioidy specificky řídí jejich aktivitu.

#### 4.4 Opioidy indukovaná regulace exprese TLR4

Také mechanismy, jakými je exprese TLR4 modulována působením opioidů, nejsou dosud zcela objasněny. K samotné regulaci může docházet na úrovni transkripce genu, vazbou NF  $\kappa$ B do promotorové oblasti *TLR4*<sup>141</sup>, či posttranskripčně, miRNA<sup>169,173</sup>. Povrchová exprese receptoru je pak závislá na mnoha dalších faktorech, např. interakci TLR4 v ER s chaperonem glykoproteinem 96, ko-chaperonem proteinem asociovaným s TLR4 a v Golgiho aparátu na tvorbě disulfidických můstků s MD-2. Dále je proces translokace na PM řízen také samotnými posttranslačními úpravami proteinu<sup>120,176</sup>.

Obecně lze konstatovat, že zvýšená exprese TLR4 doprovází prozánětlivé a pronociceptivní stavy vyvolané opioidy, a dále tyto stavy posiluje<sup>3,106,151,177</sup>. Jsou však případy, kdy ji mohou naopak tlumit. Např. bylo zaznamenáno, že ovlivnění buněk RAW 264.7 samotným morfinem (0,1 mM) vede ke snížení hladiny proteinu TLR4 a až do koncentrace 1  $\mu$ M je vidět pokles i na úrovni mRNA TLR4. Naltrexon (0,1 mM) pokles exprese antagonizuje. Stejný efekt lze pozorovat na periferních makrofázích myši, jimž byl po dobu 24 hodin 3 $\times$  denně subkutánně aplikován morfin (20 mg/kg). Tento účinek je zprostředkován skrze  $\mu$ -OR, u  $\mu$ -OR<sup>-/-</sup> KO myši se neprojevuje. Mechanismus je zprostředkován konkrétně přes signalizaci G<sub>i</sub>-proteinem, inhibovat jej lze i ovlivněním buněk *pertusis toxinem* (1  $\mu$ g/ml)<sup>178</sup>. Studie Lina a spol.<sup>179</sup> zas popisuje snížení exprese TLR4 a NF- $\kappa$ B skrze  $\kappa$ -OR v kardiomyocytech na modelu ischemicko-reperfučního poškození srdce potkana. Podání  $\kappa$ -OR selektivního agonisty, U50,488H (1,5 mg/kg), 10 minut před ischemií, snížilo hladinu obou zmíněných proteinů v zasažené tkáni. S tím koreluje pokles jejich signalizace, produkce TNF- $\alpha$  a akumulace neutrofilů v okolí nekrózy. Tyto procesy u kontrolní skupiny, nebo skupiny s aplikovaným norbinaltorfiminem, selektivním  $\kappa$ -OR antagonistou, přispívají k zánětu a extenzi infarktového ložiska.

Zajímavou kapitolou je pak modulace exprese TLR4 působením opioidů během raného vývoje, která může mít závažné následky na vývoj synaptické plasticity. Jantzie a spol.<sup>180</sup> tuto

problematiku zkoumají na mláďatech potkanů, jež byla od 16. dne prenatalního vývoje exponována metadonem. Samicím byla tou dobou implantována osmotická pumpa s drogou, denně jim byly aplikovány dávky 8–16 mg/kg, po porodu 12 mg/kg. Metadon snadno proniká placentární a hematoencefalitickou bariérou a hromadí se v mozku plodu. Po narození byla mláďata dále vystavena droze prostřednictvím mateřského mléka. Desátý den postnatalního vývoje proběhla analýza exprese prozánětlivých genů v kortikálních oblastech mozku mláďat ovlivněných drogou. Oproti kontrolní skupině, měla zvýšené hladiny mRNA TLR4 o 42 % a MyD88 až o 87 %. To doprovází nárůst IL-1 $\beta$  a CXCL1 a změny v morfologii mikroglie. Ty postrádají klasické rozvětvení, jež je klíčové pro aktivní regulaci homeostázy ve vyvíjející se mozkové tkáni. Důsledkem je pak pokles kognitivních funkcí v úlohách učení a paměti. Další studie<sup>181</sup> zjistila, že potkani, exponováni morfinu během dospívání, vykazují zvýšenou a dlouhotrvající expresi TLR4 v mikroglie v NAc. To hraje důležitou roli v chování souvisejícím se závislostí i v dospělosti, kdy opakovaná aplikace drogy nadměrně stimuluje tato předem zmnožená vazebná místa (TLR4), a jedinci tak vykazují vyšší riziko relapsu při vyhledávání drogy. Pokud jsou však potkani poprvé vystaveni působení drogy až v dospělosti, k nadměrné expresi TLR4 a tomuto vzorci chování nedochází.

I tento typ regulace je tedy velmi komplexní a závislý na několika faktorech. Stále hraje roli mnoho neznámých v jednotlivých krocích exprese, od samotné iniciace transkripce proteinu, až po jeho vystavení na PM. Pochopení těchto mechanismů je klíčové pro identifikaci cílených efektorů, jimiž opioidy expresi TLR4 modulují.

#### **4.5 Fyziologické důsledky komunikace OR a TLR4**

Poslední kapitola shrnuje důsledky komunikace mezi signálními systémy OR a TLR4.

V této souvislosti je nejvíce probíranou oblastí rozvoj analgetické tolerance, hyperalgie, alodynie, a dále prolongace a udržování těchto bolestivých stavů. Tyto jevy jsou modulovány hned několika mechanismy, přičemž za všemi stojí indukce neurozánětu. Nestereoselektivní stimulací TLR4, na imunokompetentních nebo endoteliálních buňkách centrální NS, opioidními agonisty dochází k sekreci prozánětlivých cytokinů, IL-1 $\beta$ , IL-6 a TNF- $\alpha$ <sup>151</sup>. Ty mohou dále působit na povrchové neurony II. vrstvy dorzálních míšních rohů a různými mechanismy modulovat synaptický přenos – zvyšovat frekvenci spontánních excitačních postsynaptických potenciálů, a naopak snižovat frekvenci inhibičních postsynaptických potenciálů. Výsledkem je zvýšená neuronální aktivita indukující centrální senzibilizaci a hypersenzitivitu vůči bolesti. V neuronech působením prozánětlivých cytokinů může docházet k fosforylaci a aktivaci CREB, jenž se váže do promotoru genů podporující

chronicitu bolesti, jako např. neurokinin-1 nebo cyklogenoxygenázy-2 (COX-2)<sup>97</sup>. Nocicepce může být modulována i TLR4 lokalizovanými přímo na senzoryckých neuronech, taktéž zvýšením jejich excitability<sup>98</sup>. Dále dochází k sekreci DAMPs. Ty modulují permeabilitu NMDAR v periakvaduktální šedé hmotě, P2X7 receptorů v dorzálních rozích míchy a narušují homeostázu glutamátu, což je asociováno s patofyziologickými mechanismy odpovědnými za rozvoj a udržování chronické bolesti<sup>106,109</sup>.

Neurozánět indukovaný stimulací TLR4 opioidy se také podílí na rozvoji závislosti na nich. Toť je již demonstrováno ve studii Hutchinsona a spol.<sup>152</sup>, kdy se tato stimulace jasně podílela na zvýšení hladin extracelulárního dopaminu v NAc, také zvýšená exprese TLR4 v mikroglíích v této oblasti činí jedince náchylnější k relapsu k užívání morfinu<sup>181</sup>. Liu a kol.<sup>182</sup> zas popisují zapojení dráhy TLR4–MyD88 do zvýšení hladin hipokampálního IL-1 $\beta$ , které koreluje s horším průběhem abstinenciho syndromu. Mechanismy, jimiž produkty dráhy opioidní agonista–TLR4, systém odměny modulují, však nejsou zcela objasněny. Ale např. Stellwagena a spol.<sup>183</sup> popisují roli TNF- $\alpha$  v regulaci synaptického přenosu v kultuře hipokampálních neuronů. TNF- $\alpha$  zprostředkovává změnu podjednotkového složení povrchového receptoru  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionové kyseliny, výsledkem je zvýšená propustnost Ca<sup>2+</sup>, a současně snižuje množství GABA<sub>A</sub> na PM, což vede ke snížení inhibičního synaptického přenosu. Zajímavou myšlenku předkládá také souborný článek Jacobsena a spol.<sup>184</sup>, kteří hypotetizují o zapojení prozánětlivých cytokinů do stimulace dopaminergních neuronů v NAc a VTA, jež pohání odměnu vyvolanou opioidy. Zánět však zároveň posiluje pocity stresu a úzkosti, které jsou výrazně zhoršeny při odvykání od drogy.

Dalším diskutovaným tématem je, zda-li TLR4 hraje roli v morfinem indukované depresi peristaltické motility. Opět není zcela jasné, jakými mechanismy se na modulaci gastrointestinální funkce tato inter-receptorová komunikace podílí, následující studie však poskytují důkazy, že k tomu určitým způsobem přispívá. Např. Farzi a spol.<sup>185</sup> popisují inhibiční účinky TAK-242 na morfinem indukovanou sníženou motilitu střev, zjišťují však, že efekt inhibitoru TLR4 se projevuje pouze v distální části tlustého střeva, nikoliv v horní části gastrointestinálního traktu. *In vitro*, v izolovaném tračníku morčete, předběžná léčba TAK-242 (0,1  $\mu$ M) oslabuje inhibiční účinky morfinu (v koncentraci 0,1 i 1  $\mu$ M). *In vivo* je v distální části tlustého střeva myši efekt předběžné léčby TAK-242 (4 mg/kg) sledován pouze za následné subkutánní injekce morfinu v dávce 3 mg/kg, nikoliv 0,5 mg/kg. Dalším důkazem zapojení TLR4 do tohoto jevu jsou experimenty s *Tlr2/4*<sup>-/-</sup>, *Tlr4*<sup>-/-</sup> a *MyD88*<sup>-/-</sup> KO myšmi, jež oproti WT nevykazují po subkutánní injekci morfinu (10 mg/kg) zvýšení střevního tranzitního času<sup>6</sup>.

Za přítomnosti LPS je sledován další nežádoucí účinek, rozvoj imunosuprese. Předléčení opioidním agonistou v odpovědi na LPS snižuje hladinu fosforylovaných MAPK, aktivaci NF- $\kappa$ B a produkci prozánětlivých cytokinů v leukocytech periferní krve<sup>7-9</sup>. Imunosuprese představuje závažný problém pro pacienty, dlouhodobě podstupující opioidní analgetickou terapii, nebo i uživatele drog mimo klinickou praxi, kteří jsou kvůli oslabené imunitě více náchylní k infekci. Aktuální studie naznačují, že tato léčba v perioperační fázi během chirurgického odstranění nádoru by také mohla souviset se zvýšenou recidivou některých malignit. Zatím pouze studie *in vitro* potvrzují, že stimulace TLR4 i OR přirozených zabijáků izolovaných z lidské krve morfinem, snižuje jejich schopnost indukovat apoptózu buněk K562 (imortalizovaná buněčná linie myeloidní leukémie)<sup>186,187</sup>.

Nakonec působení opioidů může také inhibovat zvýšenou expresi a aktivaci TLR4. Potlačení stimulace složek imunitního systému může být někdy naopak prospěšné a zabraňuje tak poškození tkáně, v níž působí infekční agens, nebo DAMPs indukované jejím poranění. Tento účinek se často připisuje endogenním opioidním peptidům, jež jsou součástí přirozených endogenních ochranných mechanismů organismu<sup>164</sup>, jak ale ukazují výše zmíněné studie, tentýž vliv mohou vykazovat taktéž velmi nízké dávky exogenně podávaných opioidů<sup>165,179</sup>.

## 5 ZÁVĚR

Tato práce poskytuje přehled o komplexním působení mezi signálními systémy OR a TLR4. Práce potvrzuje počáteční hypotézu, že hlubší pochopení těchto interakcí může přinést nové možnosti pro vývoj terapeutických strategií, které by efektivně využívaly této vzájemné komunikace. Jak spolupůsobení signálních drah podporovat, či jejich kontaktu zamezit.

Výzvou pro budoucí výzkum představuje vysoká specifita molekulárních mechanismů, které tyto interakce umožňují, a jak ovlivňují různé signální dráhy v odlišných typech buněk. Po tomto objasnění bude zajímavé, testovat účinnost různých typů regulace OR a TLR4. Jak např. Grace a spol., kteří ve svých experimentech pro zabránění perzistentní senzibilizace vyvolané morfinem využili inhibitory TLR4, dále také inhibitory prozánětlivých cytokinů či P2X7 receptorů<sup>107,108</sup>, ale po zjištění možné role miRNA-146a vyzkoušeli i tento typ modulace TLR4 signalizace. Ten byl sice v potlačení morfinem indukované alodynie méně efektivní, ale i přesto se ukázal jeho klinický potenciál<sup>172</sup>. Další cílená místa pro modulaci této vzájemné komunikace, krom samotných inhibitorů TLR4 a jednotlivých OR, mohou představovat např. proteiny zprostředkující expresi TLR4, jak samotnou proteosyntézu, tak jeho vystavení na PM, dále adaptorové domény efektorů TLR4 signální kaskády.

## 6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

\* sekundární citace – 4, 5, 14, 28, 35, 41, 45, 47, 49, 65, 75, 77, 96, 103, 110, 137, 142, 150, 175, 176, 184, 187

1. Morgan, M. M., Heinricher, M. M. & Fields, H. L. Circuitry linking opioid-sensitive nociceptive modulatory systems in periaqueductal gray and spinal cord with rostral ventromedial medulla. *Neuroscience* **47**, 863–871 (1992).
2. Wang, Y. *et al.* Structures of the entire human opioid receptor family. *Cell* **186**, 413–427.e17 (2023).
3. Wang, H. *et al.* Microglial TLR4-induced TAK1 phosphorylation and NLRP3 activation mediates neuroinflammation and contributes to chronic morphine-induced antinociceptive tolerance. *Pharmacol Res* **165**, (2021).
- \* 4. Angst, M. S. & Clark, J. D. Opioid-induced Hyperalgesia. *Anesthesiology* **104**, 570–587 (2006).
- \* 5. Listos, J. *et al.* The Mechanisms Involved in Morphine Addiction: An Overview. *Int J Mol Sci* **20**, 4302 (2019).
6. Beckett, E. A. H., Staikopoulos, V. & Hutchinson, M. R. Differential effect of morphine on gastrointestinal transit, colonic contractions and nerve-evoked relaxations in Toll-Like Receptor deficient mice. *Sci Rep* **8**, 5923 (2018).
7. Welters, I. D. *et al.* Morphine Inhibits NF- $\kappa$ B Nuclear Binding in Human Neutrophils and Monocytes by a Nitric Oxide-dependent Mechanism. *Anesthesiology* **92**, 1677–1684 (2000).
8. Peng, H.-B., Libby, P. & Liao, J. K. Induction and Stabilization of I $\kappa$ B $\alpha$  by Nitric Oxide Mediates Inhibition of NF- $\kappa$ B. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 14214–14219 (1995).
9. Hyejin, J. *et al.* Remifentanyl attenuates human neutrophils activation induced by lipopolysaccharide. *Immunopharmacol Immunotoxicol* **35**, 264–271 (2013).
10. Hutchinson, M. R. *et al.* Evidence that opioids may have toll-like receptor 4 and MD-2 effects. *Brain Behav Immun* **24**, 83–95 (2010).
11. Poltorak, A. *et al.* Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: Mutations in Tlr4 gene. *Science (1979)* **282**, (1998).
12. Craig Venter, J. *et al.* The sequence of the human genome. *Science (1979)* **291**, (2001).
13. Fredriksson, R., Lagerström, M. C., Lundin, L.-G. & Schiöth, H. B. The G-Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families. Phylogenetic Analysis, Paralogon Groups, and Fingerprints. *Mol Pharmacol* **63**, 1256–1272 (2003).
- \* 14. Rosenbaum, D. M., Rasmussen, S. G. F. & Kobilka, B. K. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* **459**, 356–363 (2009).
15. Offermanns, S., Schultz, G. & Rosenthal, W. Evidence for opioid receptor-mediated activation of the G-proteins, Go and Gi2, in membranes of neuroblastoma x glioma (NG108-15) hybrid cells. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 3365–3368 (1991).
16. González-Rodríguez, S., Hidalgo, A., Baamonde, A. & Menéndez, L. Involvement of Gi/o proteins and GIRK channels in the potentiation of morphine-induced spinal

- analgesia in acutely inflamed mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **381**, 59–71 (2010).
17. Rhim, H. & Miller, R. Opioid receptors modulate diverse types of calcium channels in the nucleus tractus solitarius of the rat. *The Journal of Neuroscience* **14**, 7608–7615 (1994).
  18. North, R. A. Drug receptors and the inhibition of nerve cells. *Br J Pharmacol* **98**, 13–28 (1989).
  19. Xu, J. *et al.* Alternatively spliced mu opioid receptor C termini impact the diverse actions of morphine. *Journal of Clinical Investigation* **127**, 1561–1573 (2017).
  20. Zhang, J. *et al.* Role for G protein-coupled receptor kinase in agonist-specific regulation of  $\mu$ -opioid receptor responsiveness. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**, 7157–7162 (1998).
  21. Martin, W. R., Eades, C. G., Thompson, J. A., Huppler, R. E. & Gilbert, P. E. The effects of morphine- and nalorphine- like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **197**, 517 (1976).
  22. Lord, J. A. H., Waterfield, A. A., Hughes, J. & Kosterlitz, H. W. Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature* **267**, 495–499 (1977).
  23. Yasuda, K. *et al.* Cloning and functional comparison of kappa and delta opioid receptors from mouse brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **90**, 6736–6740 (1993).
  24. Chen, Y., Mestek, A., Liu, J., Hurley, A. & Yu, L. Molecular cloning and functional expression of a mu opioid receptor from rat brain. *Regul Pept* **53**, S7–S8 (1994).
  25. Evans, C. J., Keith, D. E., Morrison, H., Magendzo, K. & Edwards, R. H. Cloning of a Delta Opioid Receptor by Functional Expression. *Science (1979)* **258**, 1952–1955 (1992).
  26. Meunier, J.-C. *et al.* Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. *Nature* **377**, 532–535 (1995).
  27. Mollereau, C. *et al.* ORL1, a novel member of the opioid receptor family. *FEBS Lett* **341**, 33–38 (1994).
  - \* 28. Loh, H. H. & Smith, A. P. Molecular Characterization of Opioid Receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **30**, 123–147 (1990).
  29. Matthes, H. W. D. *et al.* Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the  $\mu$ -opioid-receptor gene. *Nature* **383**, 819–823 (1996).
  30. Ding, Y.-Q., Kaneko, T., Nomura, S. & Mizuno, N. Immunohistochemical localization of  $\mu$ -opioid receptors in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol* **367**, 375–402 (1996).
  31. Mansour, A. *et al.* Mu, delta, and kappa opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: An in situ hybridization study. *Journal of Comparative Neurology* **350**, 412–438 (1994).
  32. McGovern, D. J. *et al.* Ventral tegmental area glutamate neurons establish a mu-opioid receptor gated circuit to mesolimbic dopamine neurons and regulate opioid-seeking behavior. *Neuropsychopharmacology* **48**, 1889–1900 (2023).

33. Pattinson, K. T. S. Opioids and the control of respiration. *Br J Anaesth* **100**, 747–758 (2008).
34. Wittert, G., Hope, P. & Pyle, D. Tissue Distribution of Opioid Receptor Gene Expression in the Rat. *Biochem Biophys Res Commun* **218**, 877–881 (1996).
- \* 35. Brejchova, J., Holan, V. & Svoboda, P. Expression of Opioid Receptors in Cells of the Immune System. *Int J Mol Sci* **22**, 315 (2020).
36. St-Louis, É. *et al.* Involvement of the coatamer protein complex I in the intracellular traffic of the delta opioid receptor. *Molecular and Cellular Neuroscience* **79**, 53–63 (2017).
37. Drake, C. T., Patterson, T. A., Simmons, M. L., Chavkin, C. & Milner, T. A. Kappa opioid receptor-like immunoreactivity in guinea pig brain: Ultrastructural localization in presynaptic terminals in hippocampal formation. *J Comp Neurol* **370**, 377–395 (1996).
38. Zhang, X., Bao, L., Arvidsson, U., Elde, R. & Hökfelt, T. Localization and regulation of the delta-opioid receptor in dorsal root ganglia and spinal cord of the rat and monkey: evidence for association with the membrane of large dense-core vesicles. *Neuroscience* **82**, 1225–1242 (1997).
39. Gaveriaux-Ruff, C. *et al.* Genetic ablation of delta opioid receptors in nociceptive sensory neurons increases chronic pain and abolishes opioid analgesia. *Pain* **152**, 1238–1248 (2011).
40. Ding, Y.-Q., Kaneko, T., Nomura, S. & Mizuno, N. Immunohistochemical localization of  $\delta$ -opioid receptors in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol* **367**, 375–402 (1996).
- \* 41. Millan, M. J.  $\kappa$ -Opioid receptors and analgesia. *Trends Pharmacol Sci* **11**, 70–76 (1990).
42. Pan, Z. Z., Tershner, S. A. & Fields, H. L. Cellular mechanism for anti-analgesic action of agonists of the  $\kappa$ -opioid receptor. *Nature* **389**, 382–385 (1997).
43. Britt, J. P. & McGehee, D. S. Presynaptic Opioid and Nicotinic Receptor Modulation of Dopamine Overflow in the Nucleus Accumbens. *The Journal of Neuroscience* **28**, 1672–1681 (2008).
44. Johnson, S. & North, R. Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *The Journal of Neuroscience* **12**, 483–488 (1992).
- \* 45. Nakamoto, K. & Tokuyama, S. Stress-Induced Changes in the Endogenous Opioid System Cause Dysfunction of Pain and Emotion Regulation. *Int J Mol Sci* **24**, 11713 (2023).
46. Zhang, X. *et al.* Dynamic recognition of naloxone, morphine and endomorphin1 in the same pocket of  $\mu$ -opioid receptors. *Front Mol Biosci* **9**, (2022).
- \* 47. Trescot, A. M. Opioid Pharmacology. *Pain Physician* **2s;11**, S133–S153 (2008).
48. Löser, S. V. *et al.* Morphine-6-O- $\beta$ -D-glucuronide but not morphine-3-O- $\beta$ -D-glucuronide binds to  $\mu$ -,  $\delta$ - and  $\kappa$ -specific opioid binding sites in cerebral membranes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **354**, (1996).
- \* 49. Raynor, K. *et al.* Pharmacological characterization of the cloned kappa-, delta-, and mu-opioid receptors. *Mol Pharmacol* **45**, (1994).



50. Chen, Y., Mestek, A., Liu, J. & Yu, L. Molecular cloning of a rat  $\kappa$  opioid receptor reveals sequence similarities to the  $\mu$  and  $\delta$  opioid receptors. *Biochemical Journal* **295**, (1993).
51. Zhang, P. *et al.* Mutation of human  $\mu$  opioid receptor extracellular “disulfide cysteine” residues alters ligand binding but does not prevent receptor targeting to the cell plasma membrane. *Molecular Brain Research* **72**, 195–204 (1999).
52. Pogozheva, I. D., Lomize, A. L. & Mosberg, H. I. Opioid Receptor Three-Dimensional Structures from Distance Geometry Calculations with Hydrogen Bonding Constraints. *Biophys J* **75**, 612–634 (1998).
53. Zheng, H. *et al.* Palmitoylation and membrane cholesterol stabilize  $\mu$ -opioid receptor homodimerization and G protein coupling. *BMC Cell Biol* **13**, (2012).
54. Shang, Y. *et al.* Proposed Mode of Binding and Action of Positive Allosteric Modulators at Opioid Receptors. *ACS Chem Biol* **11**, 1220–1229 (2016).
55. Cong, X. *et al.* Molecular insights into the biased signaling mechanism of the  $\mu$ -opioid receptor. *Mol Cell* **81**, 4165-4175.e6 (2021).
56. AlphaFold Protein Structure Database.
57. Bondar, A. & Lazar, J. Dissociated  $G\alpha$ GTP and  $G\beta\gamma$  Protein Subunits Are the Major Activated Form of Heterotrimeric Gi/o Proteins. *Journal of Biological Chemistry* **289**, 1271–1281 (2014).
58. Sharma, S. K., Klee, W. A. & Nirenberg, M. Opiate-dependent modulation of adenylate cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **74**, 3365–3369 (1977).
59. Kim, K.-S. *et al.* Adenylyl cyclase type 5 (AC5) is an essential mediator of morphine action. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 3908–3913 (2006).
60. Avidor-Reiss, T., Nevo, I., Levy, R., Pfeuffer, T. & Vogel, Z. Chronic Opioid Treatment Induces Adenylyl Cyclase V Superactivation. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 21309–21315 (1996).
61. Lane-Ladd, S. B. *et al.* CREB (cAMP Response Element-Binding Protein) in the Locus Coeruleus: Biochemical, Physiological, and Behavioral Evidence for a Role in Opiate Dependence. *The Journal of Neuroscience* **17**, 7890–7901 (1997).
62. Smrcka, A. V. & Sternweis, P. C. Regulation of purified subtypes of phosphatidylinositol-specific phospholipase C beta by G protein alpha and beta gamma subunits. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 9667–9674 (1993).
63. Granados-Soto, V., Kalcheva, I., Hua, X.-Y., Newton, A. & Yaksh, T. L. Spinal PKC activity and expression: role in tolerance produced by continuous spinal morphine infusion. *Pain* **85**, 395–404 (2000).
64. Wong, C.-S., Cherng, C.-H., Luk, H.-N., Ho, S.-T. & Tung, C.-S. Effects of NMDA receptor antagonists on inhibition of morphine tolerance in rats: binding at  $\mu$ -opioid receptors. *Eur J Pharmacol* **297**, 27–33 (1996).
- \* 65. Al-Hasani, R. & Bruchas, M. R. Molecular Mechanisms of Opioid Receptor-dependent Signaling and Behavior. *Anesthesiology* **115**, 1363–1381 (2011).
66. Whistler, J. L., Chuang, H., Chu, P., Jan, L. Y. & von Zastrow, M. Functional Dissociation of  $\mu$  Opioid Receptor Signaling and Endocytosis. *Neuron* **23**, 737–746 (1999).

67. Deng, H. B. *et al.* Role for the C-Terminus in Agonist-Induced  $\mu$  Opioid Receptor Phosphorylation and Desensitization. *Biochemistry* **39**, 5492–5499 (2000).
68. Whistler, J. L. & von Zastrow, M. Morphine-activated opioid receptors elude desensitization by  $\beta$ -arrestin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**, 9914–9919 (1998).
69. Laporte, S. A., Oakley, R. H., Holt, J. A., Barak, L. S. & Caron, M. G. The Interaction of  $\beta$ -Arrestin with the AP-2 Adaptor Is Required for the Clustering of  $\beta$ 2-Adrenergic Receptor into Clathrin-coated Pits. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 23120–23126 (2000).
70. Tanowitz, M. & von Zastrow, M. A Novel Endocytic Recycling Signal That Distinguishes the Membrane Trafficking of Naturally Occurring Opioid Receptors. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 45978–45986 (2003).
71. Kooor, A., Celver, J. P., Wu, A. & Chavkin, C. Agonist induced homologous desensitization of  $\mu$ -opioid receptors mediated by G protein-coupled receptor kinases is dependent on agonist efficacy. *Mol Pharmacol* **54**, (1998).
72. Terwilliger, R. Z., Ortiz, J., Guitart, X. & Nestler, E. J. Chronic Morphine Administration Increases  $\beta$ -Adrenergic Receptor Kinase ( $\beta$ ARK) Levels in the Rat Locus Coeruleus. *J Neurochem* **63**, 1983–1986 (1994).
73. Ehrich, J. M. *et al.* Kappa Opioid Receptor-Induced Aversion Requires p38 MAPK Activation in VTA Dopamine Neurons. *The Journal of Neuroscience* **35**, 12917–12931 (2015).
74. Ko, M. J. *et al.*  $\beta$ -Arrestin-dependent ERK signaling reduces anxiety-like and conditioned fear-related behaviors in mice. *Sci Signal* **14**, (2021).
- \* 75. Li, D. & Wu, M. Pattern recognition receptors in health and diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy* vol. 6 Preprint at <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00687-0> (2021).
76. Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. & Janeway, C. A. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**, 394–397 (1997).
- \* 77. O’Neill, L. A. J., Golenbock, D. & Bowie, A. G. The history of Toll-like receptors — redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol* **13**, 453–460 (2013).
78. Li, X.-D. & Chen, Z. J. Sequence specific detection of bacterial 23S ribosomal RNA by TLR13. *Elife* **1**, (2012).
79. Chuang, T.-H. & Ulevitch, R. J. Identification of hTLR10: a novel human Toll-like receptor preferentially expressed in immune cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* **1518**, 157–161 (2001).
80. Loiarro, M. *et al.* Identification of Critical Residues of the MyD88 Death Domain Involved in the Recruitment of Downstream Kinases. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 28093–28103 (2009).
81. Chen, Z. *et al.* Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev* **9**, 1586–1597 (1995).
82. Liu, W. *et al.* AP-1 Activated by Toll-like Receptors Regulates Expression of IL-23 p19. *Journal of Biological Chemistry* **284**, 24006–24016 (2009).

83. Zandoni, I. *et al.* CD14 Controls the LPS-Induced Endocytosis of Toll-like Receptor 4. *Cell* **147**, 868–880 (2011).
84. Tanimura, N., Saitoh, S., Matsumoto, F., Akashi-Takamura, S. & Miyake, K. Roles for LPS-dependent interaction and relocation of TLR4 and TRAM in TRIF-signaling. *Biochem Biophys Res Commun* **368**, 94–99 (2008).
85. Zhu, M., Fang, T., Li, S., Meng, K. & Guo, D. Bipartite Nuclear Localization Signal Controls Nuclear Import and DNA-Binding Activity of IFN Regulatory Factor 3. *The Journal of Immunology* **195**, 289–297 (2015).
86. Alexander, A. F., Kelsey, I., Forbes, H. & Miller-Jensen, K. Single-cell secretion analysis reveals a dual role for IL-10 in restraining and resolving the TLR4-induced inflammatory response. *Cell Rep* **36**, 109728 (2021).
87. Möser, C. V. *et al.* TANK-binding kinase 1 (TBK1) modulates inflammatory hyperalgesia by regulating MAP kinases and NF- $\kappa$ B dependent genes. *J Neuroinflammation* **12**, 100 (2015).
88. Chu, Y. *et al.* Modulation of the HMGB1/TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway in the CNS by matrine in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* **352**, 577480 (2021).
89. Deng, S. *et al.* Toll-Like Receptor 4 Promotes NO Synthesis by Upregulating GCHI Expression under Oxidative Stress Conditions in Sheep Monocytes/Macrophages. *Oxid Med Cell Longev* **2015**, 1–11 (2015).
90. Zhu, L., Huang, Y., Hu, Y., Tang, Q. & Zhong, Y. Toll-like receptor 4/nuclear factor-kappa B pathway is involved in radicular pain by encouraging spinal microglia activation and inflammatory response in a rat model of lumbar disc herniation. *Korean J Pain* **34**, 47–57 (2021).
91. Guijarro-Muñoz, I., Compte, M., Álvarez-Cienfuegos, A., Álvarez-Vallina, L. & Sanz, L. Lipopolysaccharide Activates Toll-like Receptor 4 (TLR4)-mediated NF- $\kappa$ B Signaling Pathway and Proinflammatory Response in Human Pericytes. *Journal of Biological Chemistry* **289**, 2457–2468 (2014).
92. Zhou, W. *et al.* Galectin-3 activates TLR4/NF-KB signaling to promote lung adenocarcinoma cell proliferation through activating lncRNA-NEAT1 expression. *BMC Cancer* **18**, (2018).
93. Calvo-Rodríguez, M. *et al.* Aging and amyloid  $\beta$  oligomers enhance TLR4 expression, LPS-induced Ca<sup>2+</sup> responses, and neuron cell death in cultured rat hippocampal neurons. *J Neuroinflammation* **14**, 24 (2017).
94. Iwamoto, M., Nakamura, Y., Takemura, M., Hisaoka-Nakashima, K. & Morioka, N. TLR4-TAK1-p38 MAPK pathway and HDAC6 regulate the expression of sigma-1 receptors in rat primary cultured microglia. *J Pharmacol Sci* **144**, 23–29 (2020).
95. Ganley-Leal, L. M., Liang, Y., Jagannathan-Bogdan, M., Farraye, F. A. & Nikolajczyk, B. S. Differential regulation of TLR4 expression in human B cells and monocytes. *Mol Immunol* **48**, 82–88 (2010).
- \* 96. Vaure, C. & Liu, Y. A Comparative Review of Toll-Like Receptor 4 Expression and Functionality in Different Animal Species. *Front Immunol* **5**, (2014).
97. Kawasaki, Y., Zhang, L., Cheng, J.-K. & Ji, R.-R. Cytokine Mechanisms of Central Sensitization: Distinct and Overlapping Role of Interleukin-1 $\beta$ , Interleukin-6, and

- Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  in Regulating Synaptic and Neuronal Activity in the Superficial Spinal Cord. *The Journal of Neuroscience* **28**, 5189–5194 (2008).
98. Allette, Y. M. *et al.* Decoy peptide targeted to Toll-IL-1R domain inhibits LPS and TLR4-active metabolite morphine-3 glucuronide sensitization of sensory neurons. *Sci Rep* **7**, 3741 (2017).
  99. Feng, W. *et al.* HMGB1-mediated elevation of KLF7 facilitates hepatocellular carcinoma progression and metastasis through upregulating TLR4 and PTK2. *Theranostics* **13**, 4042–4058 (2023).
  100. Teo Hansen Selnø, A. *et al.* High Mobility Group Box 1 (HMGB1) Induces Toll-Like Receptor 4-Mediated Production of the Immunosuppressive Protein Galectin-9 in Human Cancer Cells. *Front Immunol* **12**, (2021).
  101. Jiang, C. *et al.* Association between the HMGB1/TLR4 signaling pathway and the clinicopathological features of ovarian cancer. *Mol Med Rep* (2018) doi:10.3892/mmr.2018.9271.
  102. Hutchinson, M. R. *et al.* Evidence for a role of heat shock protein-90 in toll like receptor 4 mediated pain enhancement in rats. *Neuroscience* **164**, 1821–1832 (2009).
  - \* 103. Trotta, T., Porro, C., Calvello, R. & Panaro, M. A. Biological role of Toll-like receptor-4 in the brain. *J Neuroimmunol* **268**, 1–12 (2014).
  104. Hughes, C. *et al.* Beta amyloid aggregates induce sensitised TLR4 signalling causing long-term potentiation deficit and rat neuronal cell death. *Commun Biol* **3**, (2020).
  105. Paull, T. T., Haykinson, M. J. & Johnson, R. C. The nonspecific DNA-binding and -bending proteins HMG1 and HMG2 promote the assembly of complex nucleoprotein structures. *Genes Dev* **7**, (1993).
  106. Qian, J. *et al.* Chronic morphine-mediated upregulation of high mobility group box 1 in the spinal cord contributes to analgesic tolerance and hyperalgesia in rats. *Neurotherapeutics* **17**, 722–742 (2020).
  107. Grace, P. M. *et al.* Morphine paradoxically prolongs neuropathic pain in rats by amplifying spinal NLRP3 inflammasome activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **113**, (2016).
  108. Grace, P. M. *et al.* Protraction of neuropathic pain by morphine is mediated by spinal damage associated molecular patterns (DAMPs) in male rats. *Brain Behav Immun* **72**, 45–50 (2018).
  109. Mo, J. *et al.* PAG neuronal NMDARs activation mediated morphine-induced hyperalgesia by HMGB1-TLR4 dependent microglial inflammation. *J Psychiatr Res* **164**, 150–161 (2023).
  - \* 110. Park, B. S. *et al.* The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4–MD-2 complex. *Nature* **458**, 1191–1195 (2009).
  111. Kirikae, T. *et al.* Diphosphoryl lipid A derived from the lipopolysaccharide (LPS) of *Rhodobacter sphaeroides* ATCC 17023 is a potent competitive LPS inhibitor in murine macrophage-like J774.1 cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* **9**, (1994).
  112. Raja. Eritoran: the evidence of its therapeutic potential in sepsis. *Core Evid* **0** (2007) doi:10.2147/CE.S7430.

113. Mullarkey, M. *et al.* Inhibition of Endotoxin Response by E5564, a Novel Toll-Like Receptor 4-Directed Endotoxin Antagonist. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **304**, 1093–1102 (2003).
114. Zandi, Z. *et al.* The anticancer effect of the TLR4 inhibition using TAK-242 (resatorvid) either as a single agent or in combination with chemotherapy: A novel therapeutic potential for breast cancer. *J Cell Biochem* **121**, 1623–1634 (2020).
115. Zandi, Z. *et al.* The anticancer effect of the TLR4 inhibition using TAK-242 (resatorvid) either as a single agent or in combination with chemotherapy: A novel therapeutic potential for breast cancer. *J Cell Biochem* **121**, 1623–1634 (2020).
116. Nishitani, C. *et al.* Toll-like Receptor 4 Region Glu24–Lys47 Is a Site for MD-2 Binding. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 38322–38329 (2006).
117. Matsushima, N. *et al.* Comparative sequence analysis of leucine-rich repeats (LRRs) within vertebrate toll-like receptors. *BMC Genomics* **8**, 124 (2007).
118. Slack, J. L. *et al.* Identification of Two Major Sites in the Type I Interleukin-1 Receptor Cytoplasmic Region Responsible for Coupling to Pro-inflammatory Signaling Pathways. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 4670–4678 (2000).
119. Xu, Y. *et al.* Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. *Nature* **408**, 111–115 (2000).
120. Nagai, Y. *et al.* Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat Immunol* **3**, 667–672 (2002).
121. Kim, H. M. *et al.* Crystal Structure of the TLR4-MD-2 Complex with Bound Endotoxin Antagonist Eritoran. *Cell* **130**, 906–917 (2007).
122. Núñez Miguel, R. *et al.* A Dimer of the Toll-Like Receptor 4 Cytoplasmic Domain Provides a Specific Scaffold for the Recruitment of Signalling Adaptor Proteins. *PLoS One* **2**, e788 (2007).
123. Krishnan, J., Anwar, M. A. & Choi, S. TLR4 (Toll-Like Receptor 4). in *Encyclopedia of Signaling Molecules* 1–13 (Springer New York, New York, NY, 2016). doi:10.1007/978-1-4614-6438-9\_592-1.
124. Kagan, J. C. & Medzhitov, R. Phosphoinositide-Mediated Adaptor Recruitment Controls Toll-like Receptor Signaling. *Cell* **125**, 943–955 (2006).
125. Park, H. H. *et al.* Death Domain Assembly Mechanism Revealed by Crystal Structure of the Oligomeric PIDDosome Core Complex. *Cell* **128**, 533–546 (2007).
126. Lin, S.-C., Lo, Y.-C. & Wu, H. Helical assembly in the MyD88–IRAK4–IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. *Nature* **465**, 885–890 (2010).
127. Wang, L. *et al.* Crystal structure of human IRAK1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **114**, 13507–13512 (2017).
128. Ku, C. L. *et al.* Selective predisposition to bacterial infections in IRAK-4-deficient children: IRAK-4-dependent TLRs are otherwise redundant in protective immunity. *Journal of Experimental Medicine* **204**, (2007).
129. Ferrao, R. *et al.* IRAK4 Dimerization and trans -Autophosphorylation Are Induced by Myddosome Assembly. *Mol Cell* **55**, 891–903 (2014).
130. Pereira, M. *et al.* The IRAK4 scaffold integrates TLR4-driven TRIF and MYD88 signaling pathways. *Cell Rep* **40**, 111225 (2022).

131. Nguyen, T., De Nardo, D., Masendycz, P., Hamilton, J. A. & Scholz, G. M. Regulation of IRAK-1 activation by its C-terminal domain. *Cell Signal* **21**, 719–726 (2009).
132. Lamothe, B. *et al.* The RING Domain and First Zinc Finger of TRAF6 Coordinate Signaling by Interleukin-1, Lipopolysaccharide, and RANKL. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 24871–24880 (2008).
133. Conze, D. B., Wu, C.-J., Thomas, J. A., Landstrom, A. & Ashwell, J. D. Lys63-Linked Polyubiquitination of IRAK-1 Is Required for Interleukin-1 Receptor- and Toll-Like Receptor-Mediated NF- $\kappa$ B Activation. *Mol Cell Biol* **28**, 3538–3547 (2008).
134. Alagbala Ajibade, A. *et al.* TAK1 Negatively Regulates NF- $\kappa$ B and p38 MAP Kinase Activation in Gr-1+CD11b+ Neutrophils. *Immunity* **36**, 43–54 (2012).
135. Sakurai, H., Miyoshi, H., Mizukami, J. & Sugita, T. Phosphorylation-dependent activation of TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase by TAB1. *FEBS Lett* **474**, 141–145 (2000).
136. Kanayama, A. *et al.* TAB2 and TAB3 activate the NF- $\kappa$ B pathway through binding to polyubiquitin chains. *Mol Cell* **15**, (2004).
- \* 137. Napetschnig, J. & Wu, H. Molecular Basis of NF- $\kappa$ B Signaling. *Annu Rev Biophys* **42**, 443–468 (2013).
138. Fliegau, M. *et al.* Detrimental NFKB1 missense variants affecting the Rel-homology domain of p105/p50. *Front Immunol* **13**, (2022).
139. Huxford, T., Huang, D.-B., Malek, S. & Ghosh, G. The Crystal Structure of the I $\kappa$ B $\alpha$ /NF- $\kappa$ B Complex Reveals Mechanisms of NF- $\kappa$ B Inactivation. *Cell* **95**, 759–770 (1998).
140. Takaesu, G. *et al.* TAK1 is Critical for I $\kappa$ B Kinase-mediated Activation of the NF- $\kappa$ B Pathway. *J Mol Biol* **326**, 105–115 (2003).
141. Wan, J. *et al.* NF- $\kappa$ B inhibition attenuates LPS-induced TLR4 activation in monocyte cells. *Mol Med Rep* **14**, 4505–4510 (2016).
- \* 142. Karin, M. The Regulation of AP-1 Activity by Mitogen-activated Protein Kinases. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 16483–16486 (1995).
143. Park, J. M. *et al.* Signaling Pathways and Genes that Inhibit Pathogen-Induced Macrophage Apoptosis— CREB and NF- $\kappa$ B as Key Regulators. *Immunity* **23**, 319–329 (2005).
144. Gohda, J., Matsumura, T. & Inoue, J. Cutting Edge: TNFR-Associated Factor (TRAF) 6 Is Essential for MyD88-Dependent Pathway but Not Toll/IL-1 Receptor Domain-Containing Adaptor-Inducing IFN- $\beta$  (TRIF)-Dependent Pathway in TLR Signaling. *The Journal of Immunology* **173**, 2913–2917 (2004).
145. Tseng, P.-H. *et al.* Different modes of ubiquitination of the adaptor TRAF3 selectively activate the expression of type I interferons and proinflammatory cytokines. *Nat Immunol* **11**, 70–75 (2010).
146. Häcker, H. *et al.* Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6. *Nature* **439**, 204–207 (2006).
147. Lin, Y.-C., Huang, D.-Y., Chu, C.-L., Lin, Y.-L. & Lin, W.-W. The Tyrosine Kinase Syk Differentially Regulates Toll-like Receptor Signaling Downstream of the Adaptor Molecules TRAF6 and TRAF3. *Sci Signal* **6**, (2013).

148. Larabi, A. *et al.* Crystal Structure and Mechanism of Activation of TANK-Binding Kinase 1. *Cell Rep* **3**, 734–746 (2013).
149. Liu, S. *et al.* Phosphorylation of innate immune adaptor proteins MAVS, STING, and TRIF induces IRF3 activation. *Science (1979)* **347**, (2015).
- \* 150. Papadakos, S. P. *et al.* The Role of TLR4 in the Immunotherapy of Hepatocellular Carcinoma: Can We Teach an Old Dog New Tricks? *Cancers (Basel)* **15**, 2795 (2023).
151. Wang, X. *et al.* Morphine activates neuroinflammation in a manner parallel to endotoxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 6325–6330 (2012).
152. Hutchinson, M. R. *et al.* Opioid activation of toll-like receptor 4 contributes to drug reinforcement. *Journal of Neuroscience* **32**, (2012).
153. Wang, Y., Van Ngo, A. & Wang, X. Stereoselective recognition of morphine enantiomers by  $\mu$ -opioid receptor. *Natl Sci Rev* (2024) doi:10.1093/nsr/nwae029.
154. Goldstein, A., Lowney, L. I. & Pal, B. K. Stereospecific and nonspecific interactions of the morphine congener levorphanol in subcellular fractions of mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**, (1971).
155. Zhang, X. *et al.* Stereochemistry and innate immune recognition: (+)-norbinaltorphimine targets myeloid differentiation protein 2 and inhibits toll-like receptor 4 signaling. *FASEB Journal* **33**, 9577–9587 (2019).
156. Shah, M., Anwar, M. A., Yesudhas, D., Krishnan, J. & Choi, S. A structural insight into the negative effects of opioids in analgesia by modulating the TLR4 signaling: An in silico approach. *Sci Rep* **6**, 39271 (2016).
157. Juni, A., Klein, G., Pintar, J. E. & Kest, B. Nociception increases during opioid infusion in opioid receptor triple knock-out mice. *Neuroscience* **147**, (2007).
158. Wu, H. E., Thompson, J., Sun, H. Sen, Terashvili, M. & Tseng, L. F. Antianalgesia: Stereoselective action of dextro-morphine over levo-morphine on glia in the mouse spinal cord. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **314**, (2005).
159. Yan, X., Yadav, R., Gao, M. & Weng, H. Interleukin-1 beta enhances endocytosis of glial glutamate transporters in the spinal dorsal horn through activating protein kinase C. *Glia* **62**, 1093–1109 (2014).
160. Stevens, C. W., Aravind, S., Das, S. & Davis, R. L. Pharmacological characterization of LPS and opioid interactions at the toll-like receptor 4. *Br J Pharmacol* **168**, (2013).
161. Madera-Salcedo, I. K., Cruz, S. L. & Gonzalez-Espinosa, C. Morphine Prevents Lipopolysaccharide-Induced TNF Secretion in Mast Cells Blocking I $\kappa$ B Kinase Activation and SNAP-23 Phosphorylation: Correlation with the Formation of a  $\beta$ -Arrestin/TRAF6 Complex. *The Journal of Immunology* **191**, 3400–3409 (2013).
162. Wang, Y. *et al.* Association of  $\beta$ -arrestin and TRAF6 negatively regulates Toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling. *Nat Immunol* **7**, (2006).
163. Li, H. *et al.*  $\beta$ -Arrestin 2 Negatively Regulates Toll-like Receptor 4 (TLR4)-triggered Inflammatory Signaling via Targeting p38 MAPK and Interleukin 10. *Journal of Biological Chemistry* **289**, 23075–23085 (2014).
164. Kong, L.-Y. *et al.* Reduction of lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in mouse mixed cortical neuron/glia cultures by ultralow concentrations of dynorphins. *J Biomed Sci* **7**, 241–247 (2000).

165. Shivling Mali, A., Honc, O., Hejnova, L. & Novotny, J. Opioids Alleviate Oxidative Stress via the Nrf2/HO-1 Pathway in LPS-Stimulated Microglia. *Int J Mol Sci* **24**, 11089 (2023).
166. Merighi, S. *et al.* Morphine mediates a proinflammatory phenotype via  $\mu$ -opioid receptor–PKC $\epsilon$ –Akt–ERK1/2 signaling pathway in activated microglial cells. *Biochem Pharmacol* **86**, 487–496 (2013).
167. Gessi, S. *et al.* The activation of  $\mu$ -opioid receptor potentiates LPS-induced NF- $\kappa$ B promoting an inflammatory phenotype in microglia. *FEBS Lett* **590**, 2813–2826 (2016).
168. Taganov, K. D., Boldin, M. P., Chang, K.-J. & Baltimore, D. NF- $\kappa$ B-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 12481–12486 (2006).
169. Peng, X. *et al.* miR-146a promotes M2 macrophage polarization and accelerates diabetic wound healing by inhibiting the TLR4/NF- $\kappa$ B axis. *J Mol Endocrinol* **69**, 315–327 (2022).
170. Lu, Y., Cao, D. L., Jiang, B. C., Yang, T. & Gao, Y. J. MicroRNA-146a-5p attenuates neuropathic pain via suppressing TRAF6 signaling in the spinal cord. *Brain Behav Immun* **49**, (2015).
171. Banerjee, S. *et al.* Morphine induced exacerbation of sepsis is mediated by tempering endotoxin tolerance through modulation of miR-146a. *Sci Rep* **3**, (2013).
172. Grace, P. M., Strand, K. A., Galer, E. L., Maier, S. F. & Watkins, L. R. MicroRNA-124 and microRNA-146a both attenuate persistent neuropathic pain induced by morphine in male rats. *Brain Res* **1692**, 9–11 (2018).
173. Wang, Y., Jiang, W., Xia, B., Zhang, M. & Wang, Y. MicroRNA-146a attenuates the development of morphine analgesic tolerance in a rat model. *Neurol Res* **42**, 415–421 (2020).
174. Zhang, D. *et al.* Remifentanyl protects heart from myocardial ischaemia/reperfusion (I/R) injury via miR-206-3p/TLR4/NF- $\kappa$ B signalling axis. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **74**, 282–291 (2022).
- \* 175. Chen, Y. M., He, X. Z., Wang, S. M. & Xia, Y.  $\delta$ -Opioid Receptors, microRNAs, and Neuroinflammation in Cerebral Ischemia/Hypoxia. *Frontiers in Immunology* vol. 11 Preprint at <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00421> (2020).
- \* 176. Saitoh, S. I. & Miyake, K. Mechanism regulating cell surface expression and activation of Toll-like receptor 4. *Chemical Record* **6**, (2006).
177. Hutchinson, M. R. *et al.* Possible involvement of toll-like receptor 4/myeloid differentiation factor-2 activity of opioid inactive isomers causes spinal proinflammation and related behavioral consequences. *Neuroscience* **167**, 880–893 (2010).
178. Franchi, S. *et al.* Mu opioid receptor activation modulates Toll like receptor 4 in murine macrophages. *Brain Behav Immun* **26**, 480–488 (2012).
179. Lin, J. *et al.*  $\kappa$ -Opioid receptor stimulation modulates TLR4/NF- $\kappa$ B signaling in the rat heart subjected to ischemia–reperfusion. *Cytokine* **61**, 842–848 (2013).
180. Jantzie, L. L. *et al.* Prenatal opioid exposure: The next neonatal neuroinflammatory disease. *Brain Behav Immun* **84**, 45–58 (2020).



181. Schwarz, J. M. & Bilbo, S. D. Adolescent Morphine Exposure Affects Long-Term Microglial Function and Later-Life Relapse Liability in a Model of Addiction. *The Journal of Neuroscience* **33**, 961–971 (2013).
182. Liu, L., Collier, J. K., Watkins, L. R., Somogyi, A. A. & Hutchinson, M. R. Naloxone-precipitated morphine withdrawal behavior and brain IL-1 $\beta$  expression: Comparison of different mouse strains. *Brain Behav Immun* **25**, 1223–1232 (2011).
183. Stellwagen, D., Beattie, E. C., Seo, J. Y. & Malenka, R. C. Differential Regulation of AMPA Receptor and GABA Receptor Trafficking by Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ . *The Journal of Neuroscience* **25**, 3219–3228 (2005).
- \* 184. Jacobsen, J. H. W., Watkins, L. R. & Hutchinson, M. R. Discovery of a Novel Site of Opioid Action at the Innate Immune Pattern-Recognition Receptor TLR4 and its Role in Addiction. in 129–163 (2014). doi:10.1016/B978-0-12-801284-0.00006-3.
185. Farzi, A. *et al.* Toll-like receptor 4 contributes to the inhibitory effect of morphine on colonic motility in vitro and in vivo. *Sci Rep* **5**, (2015).
186. Maher, D. P., Walia, D. & Heller, N. M. Morphine decreases the function of primary human natural killer cells by both TLR4 and opioid receptor signaling. *Brain Behav Immun* **83**, 298–302 (2020).
- \* 187. Maher, D. P., Walia, D. & Heller, N. M. Suppression of Human Natural Killer Cells by Different Classes of Opioids. *Anesth Analg* **128**, 1013–1021 (2019).