

Univerzita Karlova v Praze

1. lékařská fakulta

Autoreferát dizertační práce



**Modulační vliv monovalentních iontů
na δ -opioidní receptory**

Ing. Miroslava Vošahlíková

2014

Doktorské studijní programy v biomedicině

Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky

Obor: Biochemie a patobiochemie

Předseda oborové rady: Prof. MUDr. Stanislav Štípek, DrSc.

Školící pracoviště: Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i.

Oddělení biochemie membránových receptorů

Školitel: Doc. RNDr. Petr Svoboda, DrSc.

Dizertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

OBSAH

ABSTRAKT.....	1
ABSTRACT.....	2
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	3
1. ÚVOD.....	5
2. CÍLE.....	6
3. MATERIÁL A METODIKA.....	6
4. VÝSLEDKY A DISKUZE.....	8
4.1 Aktivita G proteinů ve frontální mozkové kůře potkanů vystavených dlouhodobému působení morfinu.....	8
4.2 Vliv sodných iontů na vazebné parametry δ -OR v plazmatických membránách izolovaných z frontální mozkové kůry potkanů vystavených dlouhodobému působení morfinu.....	8
4.3 Inhibice signalizace δ -OR monovalentními ionty v δ -OR-G _i 1 α (Cys ³⁵¹ -Ile ³⁵¹)-HEK293.....	9
4.4 Vysokoafinní a nízkoafinní místa pro Na ⁺ v δ -OR-G _i 1 α (Cys ³⁵¹ -Ile ³⁵¹)-HEK293, korelace s biofyzikálním stavem plazmatické membrány.....	11
5. ZÁVĚR.....	13
6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	14
Seznam publikací doktoranda.....	16
Abstrakta z konferencí.....	18

ABSTRAKT

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AC	adenylyl cykláza
ATP	adenosintrifosfát
[α - ³² P]ATP	ATP s fosforem nahrazeným v poloze α radionuklidem [³² P]
B _{max}	maximální vazebná kapacita
Cys ³⁵¹	cystein v pozici 351 (pořadí aminokyseliny v proteinu od N-konce)
DADLE	agonista δ -OR; (2-D-alanin-5-D-leucin)-enkefalin Tyr-D-Ala-Gly-N-methyl-Phe-Gly-ol
DAMGO	agonista μ -OR; (2-D-alanin-4-methylfenylalanin-5-glycinol)-enkefalin Tyr-D-Ala-Gly-N-methyl-Phe-Gly-ol
DPDPE	agonista δ -OR [2-D-penicillamin,5-D-penicillamin]-enkefalin, [D-Pen ² , D-Pen ⁵]EK)
DPH	1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien
δ -OR	δ -opioidní receptor
EC ₅₀	50 % efektivní koncentrace
G α , G β , G γ	jednotlivé podjednotky G proteinu (α , β , γ)
G _{P_{ex}}	excitační generalizovaná polarizace Laurdanu
GPCR	receptor spřažený s G proteinem (G P rotein C oupled R eceptor)
G protein	trimerní GTP-vazebný protein
GTP	guanosintrifosfát

[γ - ³² P]GTP	GTP s fosforem nahrazeným v poloze γ radionuklidem [³² P]
GTP γ S	guanosin 5'-O-thiotrifosfát, nehydrolyzovatelný analog GTP
[³⁵ S]GTP γ S	GTP γ S s kyslíkem nahrazeným v poloze γ radionuklidem [³⁵ S]
HEK293	buněčná linie HEK (lidské embryonální buňky z ledvin, H uman E mryonic K idney)
Ile ³⁵¹	isoleucin v pozici 351 (pořadí aminokyseliny od N-konce)
κ -OR	κ -opioidní receptor
NMDG	N-methyl-D-glukamin
μ -OR	μ -opioidní receptor
OR	opioidní receptor
PM	plazmatická membrána
POPC	1,2-palmitoyl-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-fosfocholin
POPS	1,2-palmitoyl-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-fosfoserin
PTX	pertussis toxin
r_{DPH}	rovnovážná anizotropie fluorescence DPH
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza za přítomnosti
U-69593	agonista κ -OR (5 α , 7 α , 8 β)-(-)-N-methyl-N-(7-(1-pyrroldinyl)-1-oxaspiro(4,5)dec-8-yl) benzenacetamid

1. ÚVOD

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

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

signalizaci GPCRs dosud ne zcela definovaným mechanismem. Jejich interakce se signální kaskádou iniciovanou opioidními receptory byly studovány již od počátku výzkumu zaměřeného na GPCRs.

2. CÍLE

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

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

3. MATERIÁL A METODIKA

Experimentální modely

- dospělí samci potkanů rodu Wistar (90 denní, 160-180 g)
- buněčná linie δ -OR-G_i1 α (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293
- unilamelární vezikuly POPC/POPS, POPC/POPS/cholesterol

Aplikace morfinu experimentálním zvířatům

- morfin byl dávkován intramuskulárně podle následujícího postupu: 10 mg/kg (1.-2. den), 15 mg/kg (3.-4. den), 20 mg/kg (5.-6. den), 30 mg/kg (7.-8. den), 40 mg/kg (9. den) a 50 mg/kg (10. den)
- kontrolním zvířatům byl aplikován sterilní 0,9 % NaCl

Kultivace buněk δ -OR-G_i1 α (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293

Izolace plazmatických membrán

- na Percollovém gradientu
- P2 membrány podle metody Moonové (Moon H. E. et al., 2001a)

Stanovení koncentrace proteinů pomocí modifikované Lowryho metody

SDS-PAGE a imunoblot

Vazebné studie s radioligandy

- stanovení agonistou stimulované vysokoafinní aktivity GTPázy pomocí [γ -³²P]GTP; stanovení agonistou stimulovaná vazby [³⁵S]GTP γ S
- stanovení aktivity adenylyl cyklázy pomocí [α -³²P]ATP
- stanovení vazba [³H]ouabainu na Na, K ATPázu
- stanovení vazby [³H]DADLE, [³H]DPDPE, [³H]DAMGO, [³H]U-69593, [³H]naltrindolu, [³H]baklofenu, [³H]somatostatinu, [³H]karbacholu, [³H]isoprenalinu

Metody fluorescenční spektroskopie:

- stanovení generalizované polarizace Laurdanu (GP_{ex})
- stanovení rovnovážné anizotropie fluorescence DPH (r_{DPH})

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

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

Dlouhodobé vystavení potkanů vysokým dávkám morfinu mělo za následek pokles celkové aktivity G proteinů stimulované μ - a δ -opioidním receptorem v plazmatických membránách izolovaných z frontální mozkové kůry. Nedošlo ovšem ke snížení množství těchto regulačních proteinů. Naše výsledky potvrzují názor, že mechanismus závislosti na morfinu je primárně založen na desenzitizaci odpovědi opioidních receptorů, která nastává již na úrovni funkční aktivity G proteinů.

Stanovili jsme pořadí účinnosti agonistů opioidních receptorů DADLE (δ -OR) > DAMGO (μ -OR) > U-69593 (κ -OR) ve smyslu snížení aktivity G proteinů a zjistili jsme, že dochází k desenzitizaci odpovědi na aktivaci zprostředkovanou δ -OR na úrovni G proteinů. Naše výsledky, získané při práci s potkany vystavenými působení morfinu, přinášejí nové důkazy, které nebyly dosud publikovány. Zároveň jsou naše zjištění ve shodě s nálezy potvrzujícími relativně vysokou hustotu δ -OR v předním mozku dospělých potkanů (Kornblum H. I. et al., 1987; Ko M. C. et al., 2003) a s malou funkční významností kaskády iniciované κ -OR v této části CNS (Maurer R., 1982).

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

Zjistili jsme, že obsah adenyllyl cyklázy I a II v plazmatických membránách (PM) byl významně zvýšen u potkanů ovlivněných morfinem

a nastává jako specifická, kompenzační (plně vratná), homeostatická odpověď na dlouhodobé působení této drogy.

Dramatický nárůst obsahu ACI a ACII popsany v této práci byl podpořen dalšími výsledky, dokazujícími specifitu tohoto nárůstu, protože ostatní izoformy AC (ACIII-IX) byly nezměněny a nárůst nebyl zjištěn v PM izolovaných z potkanů vystavených jednorázové dávce morfinu. Desenzitizace odpovědi G proteinu slouží jako impulz pro kompenzační odpověď - dochází k proteosyntéze vedoucí ke specifickému nárůstu ACI a ACII u morfinem ovlivněných zvířat. Po odnětí drogy na dobu 20 dnů se hladiny AC vrací do normálu.

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

Bylo také zjištěno, že dlouhodobá expozice morfinu má za následek zvýšení počtu δ -opioidních receptorů a změnu jejich citlivost vůči sodným iontům. Nízká citlivost δ -OR k inhibičnímu účinku NaCl u skupiny potkanů vystavených působení morfinu může být interpretována jako narušení rovnováhy mezi aktivním a neaktivním stavem receptoru.

4.3 Inhibice signalizace δ -OR monovalentními ionty

v δ -OR-G_i1 α (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293

Autoři několika publikací uvedli, že μ -, δ - and κ -OR mohou aktivovat G_i/G_o proteiny se stejnou účinností (Offermanns S. et al., 1991; Roerig S. C. et al., 1992; Prather P. L. et al., 1994a; Prather P. L. et al., 1994b; Chakrabarti S. et al., 1995; Prather P. L. et al., 1995; Quinones-Jenab V. et al., 1997). Každý z OR tedy může interagovat s 5 různými

formami G_i/G_o proteinů (G_i1 α , G_i2 α , G_i3 α , G_o1 α , G_o2 α) (Tso P. H. a Wong Y. H., 2003). OR specificky regulují různé třídy efektorů a tak vzniká velmi složitá signalizační síť. Buňky HEK 293 (lidské embryonální buňky z ledvin, "human embryonic kidney cells"), které stabilně exprimují fúzní protein mezi OR a α -podjednotkou G proteinu, představují užitečný model pro porovnání účinnosti vazby daných typů G proteinu se stejným receptorem. Pro naši práci jsme použili stabilně transferovanou linii buněk HEK293, která exprimuje fúzní bílkovinu mezi δ -OR a G proteinem rezistentním vůči PTX G_i1 α (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹), δ -OR-G_i1 α (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293, za účelem získat informace o vazbě mezi definovaným typem OR a definovaným typem G proteinu. To, že je δ -OR v této molekule spojen kovalentní vazbou s G_i1 α , zajišťuje přesnou a známou stechiometrii 1:1 mezi receptorem a G proteinem.

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

Význam sodných iontů spočívá v tom, že mají podobný účinek jako inverzní agonisté - posunují rovnováhu mezi aktivní a neaktivní konformací receptoru směrem k neaktivní konformaci (Mullaney I. et al., 1996; Burford N. T. et al., 2000; Moon H. E. et al., 2001a; Moon H. E. et al., 2001b; Massotte D. et al., 2002; Seifert R. a Wenzel-Seifert K., 2002). Tím dochází ke snížení schopnosti receptoru aktivovat G protein a snížení

bazální/spontánní vazby [³⁵S]GTPγS. Za těchto podmínek lze dobře stanovit hormonální aktivaci G proteinu, protože bazální aktivita v nepřítomnosti agonisty je velmi nízká.

4.4 Vysokoafinní a nízkoafinní místa pro Na⁺ v δ-OR-G_i1α (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293, korelace s biofyzikálním stavem plazmatické membrány

Porovnali jsme vliv různých koncentrací sodných, draselných a lithných iontů na vazbu agonisty a antagonisty k δ-opioidnímu receptoru a na spojení tohoto receptoru s G proteinem v plazmatických membránách izolovaných z δ-OR-G_i1α (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293 buněčné linie. Detailní analýza provedená v širokém rozsahu koncentrací vedla ke zjištění, že celkový inhibiční účinek Na⁺ na vazbu agonisty k δ-OR-G_i1α (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293 je složen ze dvou komponent - z vysoko- a nízkoafinních interakčních míst. Vysokoafinní místa byla charakterizována 50 % inhibicí vazby agonisty již při 5.4 mM koncentraci NaCl a nízkoafinní místa byla charakterizována 50 % inhibicí vazby agonisty při koncentraci 321 mM. Inhibice vazby agonisty vlivem LiCl, KCl a NMDG probíhala pouze s nízkou afinitou. Naše výsledky podporují představu, že vysokoafinní místa pro Na⁺ jsou umístěna hluboko uvnitř vazebné kapsy pro ligand a zprostředkovávají "inverzně agonistický" účinek Na⁺. Nízkoafinnímu efektu jsme se podrobněji věnovali při biofyzikálních studiích.

Dále byl proměřen vliv různých monovalentních kationtů chloridů na bazální a agonistou δ-OR DADLE stimulovanou vazbu [³⁵S]GTPγS. V nepřítomnosti iontů byla zjištěna vysoká bazální aktivita, která nebyla ovlivněna rostoucí koncentrací agonisty. Přidání 100 nebo 200 mM koncentrace NaCl, KCl a LiCl mělo za následek snížení vazby [³⁵S]GTPγS, které bylo kompenzováno rostoucí koncentrací agonisty. Konstitutivní

aktivita, která se projevuje jako vysoká bazální aktivita v nepřítomnosti agonisty a monovalentních iontů, byla snížena s pořadím účinnosti $\text{Na}^+ > \text{Li}^+ \approx \text{K}^+$. Porovnání křivek závislosti odpovědi na koncentraci agonisty potvrdilo stejné pořadí, co se týče vyvolání maximální odpovědi B_{max} . Afinita agonisty DADLE ("potency"), vyjádřená pomocí hodnot EC_{50} , byla ale přednostně podporována Li^+ (statisticky významný pokles vazby [^{35}S]GTP γ S byl změřen již při 1 mM koncentraci LiCl). Stejně pořadí bylo zjištěno pro všechny parametry i v membránách izolovaných z buněk neovlivněných PTX.

Účinek iontů jsme zkoumali i v polární oblasti lipidových hlaviček a hydrofóbním vnitřku plazmatických membrán. Polární rozhraní membrána-voda bylo studováno pomocí fluorescenční sondy Laurdanu (2-dimethylamino-6-lauroyl-naftalen). Laurdan je fluorescenční sonda, která postihuje změny ve vlastnostech membrány díky své citlivosti k polaritě lipidové dvojvrstvy a poskytuje informaci o lipidových karbonylech. Vliv monovalentních kationtů na hydrofóbní vnitřek membrány jsme studovali pomocí fluorescenční sondy 1,6-difenyl-1,3,5-hexatrienu (DPH). Fluorescenční sonda DPH nesvíí ve vodě, ale vykazuje silnou fluorescenci, pokud je zanořena do lipidové membrány.

Analýza interakce iontů lithia, sodíku, draslíku a cesia s plazmatickou membránou buněk HEK293, prováděná pomocí fluorescenčních technik, ukázala na význam polárních skupin přítomných v povrchové vrstvě membrány. Polární rozhraní membrána-voda jsme označili jako jedno z možných míst, kde by mohl probíhat nízkoafinní typ inhibice vazby agonisty. Tato interakce by následně mohla ovlivnit vazbu ligandu na receptor allosterickou cestou prostřednictvím lipidových molekul.

5. ZÁVĚR

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

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

6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Burford, N.T., Wang, D. a Sadee, W. (2000) G-protein coupling of mu-opioid receptors (OP3): elevated basal signalling activity. *Biochem J* 348 Pt 3: 531-537.
- Chakrabarti, S., Prather, P.L., Yu, L., Law, P.Y. a Loh, H.H. (1995) Expression of the mu-opioid receptor in CHO cells: ability of mu-opioid ligands to promote alpha-azidoanilido[32P]GTP labeling of multiple G protein alpha subunits. *J Neurochem* 64 (6): 2534-2543.
- Ko, M.C., Lee, H., Harrison, C., Clark, M.J., Song, H.F., Naughton, N.N., Woods, J.H. a Traynor, J.R. (2003) Studies of micro-, kappa-, and delta-opioid receptor density and G protein activation in the cortex and thalamus of monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* 306 (1): 179-186.
- Kornblum, H.I., Hurlbut, D.E. a Leslie, F.M. (1987) Postnatal development of multiple opioid receptors in rat brain. *Brain Res* 465 (1-2): 21-41.
- Massotte, D., Brillet, K., Kieffer, B. a Milligan, G. (2002) Agonists activate Gi1 alpha or Gi2 alpha fused to the human mu opioid receptor differently. *J Neurochem* 81 (6): 1372-1382.
- Maurer, R. (1982) Multiplicity of opiate receptors in different species. *Neurosci Lett* 30 (3): 303-307.
- Moon, H.E., Bahia, D.S., Cavalli, A., Hoffmann, M. a Milligan, G. (2001a) Control of the efficiency of agonist-induced information transfer and stability of the ternary complex containing the delta opioid receptor and the alpha subunit of G(i1) by mutation of a receptor/G protein contact interface. *Neuropharmacology* 41 (3): 321-330.
- Moon, H.E., Cavalli, A., Bahia, D.S., Hoffmann, M., Massotte, D. a Milligan, G. (2001b) The human delta opioid receptor activates

- G(i1)alpha more efficiently than G(o1)alpha. *J Neurochem* 76 (6): 1805-1813.
- Mullaney, I., Carr, I.C. a Milligan, G. (1996) Analysis of inverse agonism at the delta opioid receptor after expression in Rat 1 fibroblasts. *Biochem J* 315 (Pt 1): 227-234.
- Offermanns, S., Schultz, G. a Rosenthal, W. (1991) Evidence for opioid receptor-mediated activation of the G-proteins, Go and Gi2, in membranes of neuroblastoma x glioma (NG108-15) hybrid cells. *J Biol Chem* 266 (6): 3365-3368.
- Prather, P.L., Loh, H.H. a Law, P.Y. (1994a) Interaction of delta-opioid receptors with multiple G proteins: a non-relationship between agonist potency to inhibit adenylyl cyclase and to activate G proteins. *Mol Pharmacol* 45 (5): 997-1003.
- Prather, P.L., McGinn, T.M., Claude, P.A., Liu-Chen, L.Y., Loh, H.H. a Law, P.Y. (1995) Properties of a kappa-opioid receptor expressed in CHO cells: interaction with multiple G-proteins is not specific for any individual G alpha subunit and is similar to that of other opioid receptors. *Brain Res Mol Brain Res* 29 (2): 336-346.
- Prather, P.L., McGinn, T.M., Erickson, L.J., Evans, C.J., Loh, H.H. a Law, P.Y. (1994b) Ability of delta-opioid receptors to interact with multiple G-proteins is independent of receptor density. *J Biol Chem* 269 (33): 21293-21302.
- Quinones-Jenab, V., Jenab, S., Ogawa, S., Inturrisi, C. a Pfaff, D.W. (1997) Estrogen regulation of mu-opioid receptor mRNA in the forebrain of female rats. *Brain Res Mol Brain Res* 47 (1-2): 134-138.
- Roerig, S.C., Loh, H.H. a Law, P.Y. (1992) Identification of three separate guanine nucleotide-binding proteins that interact with the delta-

opioid receptor in NG108-15 neuroblastoma x glioma hybrid cells.
Mol Pharmacol 41 (5): 822-831.

Seifert, R. a Wenzel-Seifert, K. (2002) Constitutive activity of G-protein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 366 (5): 381-416.

Tso, P.H. a Wong, Y.H. (2003) Molecular basis of opioid dependence: role of signal regulation by G-proteins. Clin Exp Pharmacol Physiol 30 (5-6): 307-316.

Seznam publikací doktoranda

1) publikace in extenso, které jsou podkladem dizertace

Publikace I

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

IF = 1.699 (rok 2010)

Publikace II

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

IF = 5.000 (rok 2011)

Publikace III

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

IF = 1.555 (rok 2011)

Publikace IV

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

IF = 2.147 (rok 2012)

2) publikace in extenso bez vztahu k tématu dizertace

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

IF = 3.990 (rok 2011)

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

IF = 1.531 (rok 2012)

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

IF = 1.531 (rok 2012)

Abstrakta z konferencí

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

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

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

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

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

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