



Univerzita Karlova v Praze
1. lékařská fakulta



Oddělení biochemie
membránových receptorů

Doktorandská dizertační práce

Modulační vliv monovalentních iontů na δ -opioidní receptory

Ing. Miroslava Vošahlíková

Vedoucí dizertační práce: Doc. RNDr. Petr Svoboda, DrSc.

Publikační podklad pro přípravu dizertační práce

frontální mozková kůra potkana

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.

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.

*buněčná linie exprimující fúzní protein mezi
 δ -opioidním receptorem a $G_i1\alpha$ proteinem*

Publikace III

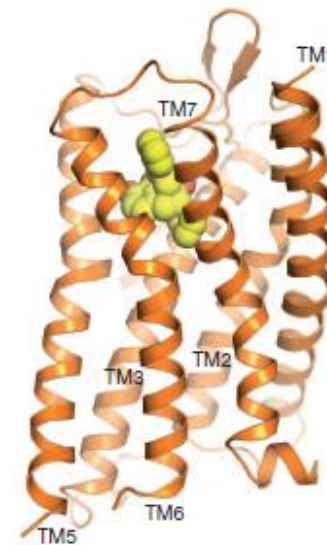
Vošahlíková, M., Svoboda, P. (2011). The influence of monovalent cations on trimeric G protein $G_i1\alpha$ activity in HEK293 cells stably expressing δ -OR- $G_i1\alpha$ (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹) fusion protein. *Physiol Res*, 60(3), 541-547.

Publikace IV

Vošahlíková, M., Jurkiewicz, P., Roubalová, L., Hof, M., Svoboda, P. (2014). High- and low-affinity sites for sodium in δ -OR- $G_i1\alpha$ (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹) fusion protein stably expressed in HEK293 cells; functional significance and correlation with biophysical state of plasma membrane. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 387(5), 487-502.

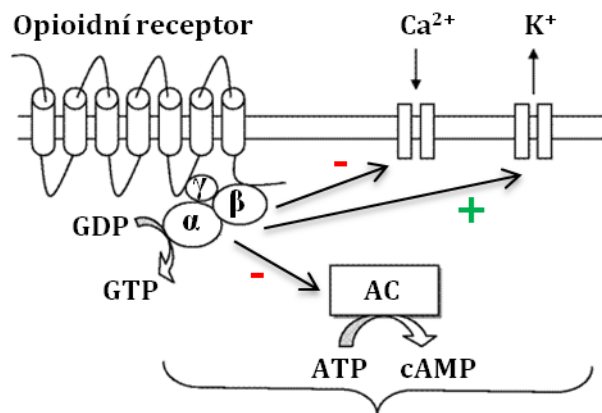
Opioidní receptory (OR)

- rhodopsinová rodina receptorů spřažených s G proteiny (**GPCRs**)
- **4 typy OR** μ -OR, δ -OR, κ -OR, NOP
- klíčový prvek **vnímání bolesti**
ovlivňují afektivní chování a neuroendokrinní funkce, ovládají autonomní funkce



Struktura GPCR

Granier S. et al., Nature, 2012



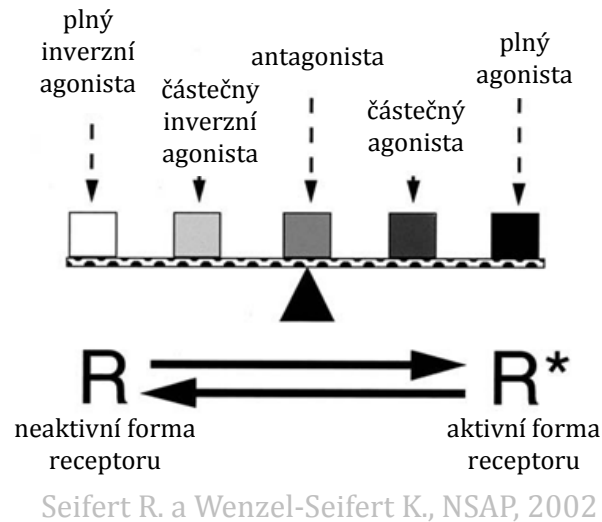
Inhibice uvolňování neurotransmiterů

McDonald J. a Lambert D.G., CAECCP, 2005

- aktivují **heterotrimerní G proteiny třídy G_i/G_o**
 - inhibují adenylyl cyklázu (AC) → pokles produkce cAMP, inhibují Ca^{2+} kanály, stimulují K^+ kanály

Konstitutivní aktivita, inverzní agonisté

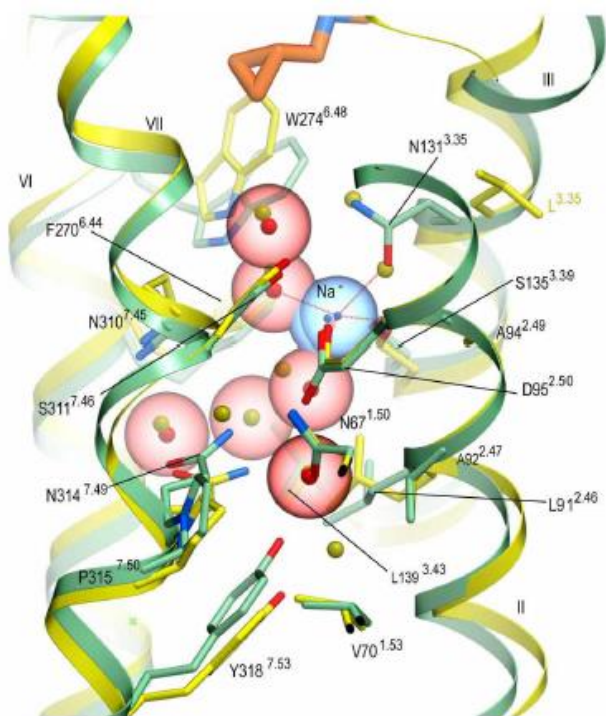
- **konstitutivní aktivita** - schopnost receptoru přejít do aktivní konformace (R^*) i v nepřítomnosti agonisty



- **Na^+** působí jako **allosterický inverzní agonista** (allosterický stabilizátor neaktivního stavu receptoru)
- **Asp^{95} v TM2 δ -OR** kritická pro regulaci vazby agonisty Na^+

Interakce monovalentních iontů s OR

- allosterická vazebná kapsa pro Na⁺
 - interakce Na⁺ s 5 kyslíkovými atomy (postranní řetězce Asp⁹⁵, Ser¹³⁵, Asn¹³¹ spolu s 2 molekulami vody)



1.8 Å

δ-opioidní receptor

adenosinový receptor A_{2A}

identické postranní řetězce a podobné konformace v 15 pozicích kapsy

Allosterická vazebná kapsa GPCRs vázající Na⁺ a vodu

Fenalti G. et al., Nature, 2014

Cíle dizertační práce

- frontální mozková kůra potkana
 - změny v signální dráze OR vyvolané dlouhodobým působením morfinu
 - klíčový fyziologický mechanismus, kterým je snižována konstitutivní aktivita - inhibiční působení sodných iontů na vazebné místo δ -OR

- buněčná linie δ -OR- $G_i1\alpha$ (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293
 - účinek různých monovalentních iontů na δ -OR i na jeho funkční spřažení s trimerními G proteiny inhibičního typu

Frontální mozková kůra potkana

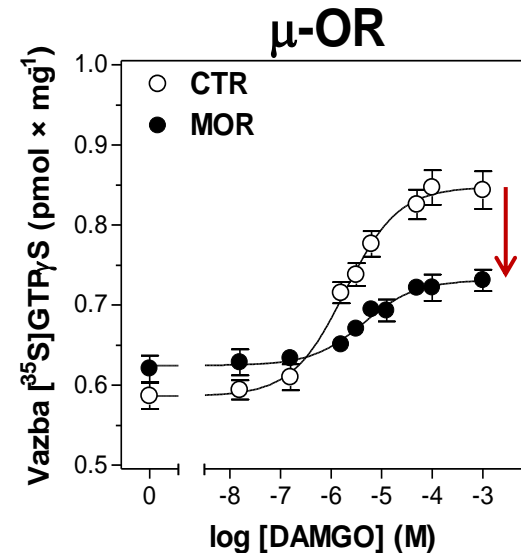
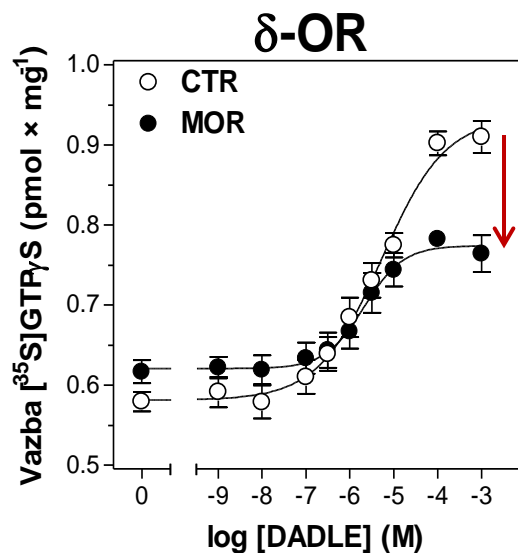
Aktivita G proteinů – změny vyvolané působením morfinu

- stanovení agonistou stimulované vazby [^{35}S]GTP γ S

- samci potkanů kmene Wistar

- kontrolní potkani (CTR, ○)

- potkani vystaveni působení 10-50 mg/kg morfinu po dobu 10 dnů (MOR, ●)



- pokles vazby [^{35}S]GTP γ S stimulované agonisty δ - a μ -OR u potkanů ovlivněných morfinem → desenzitizace odpovědi δ - a μ -OR nastává již na úrovni funkční aktivity G proteinů

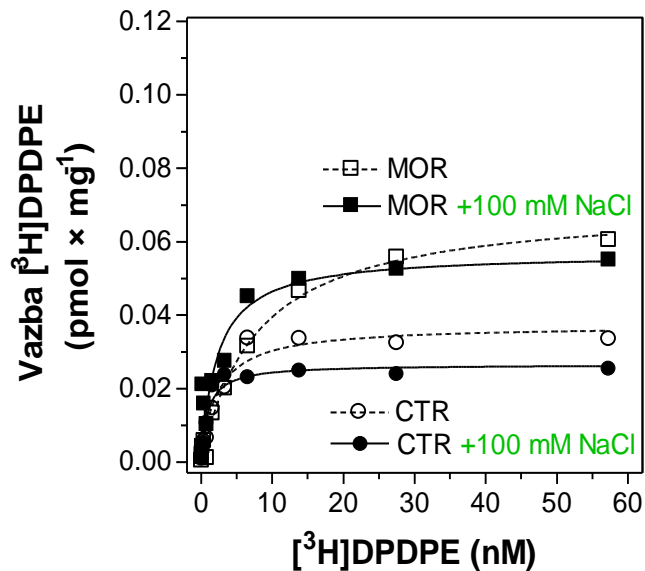
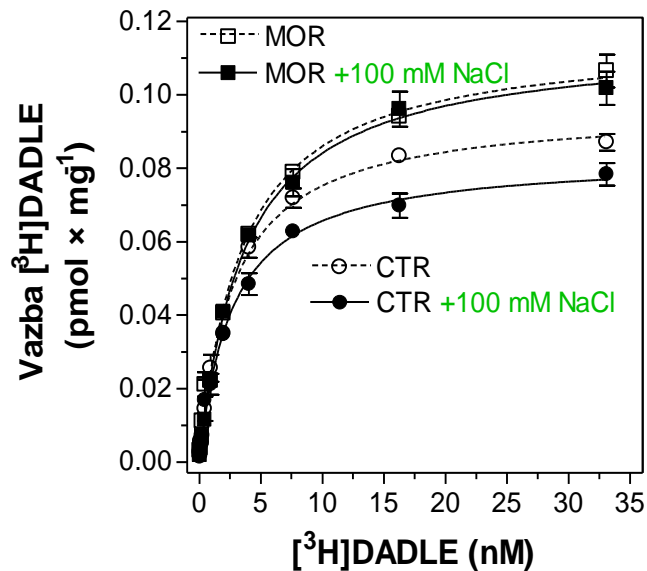
- nárůst obsahu adenylyl cyklázy typu I a II

Frontální mozková kůra potkana

Inhibiční působení Na⁺ na vazebné místo δ -OR

DADLE: δ -OR, μ_1 -OR
[D-Ala²,D-Leu⁵]enkefalin

DPDPE: δ -OR
[D-Pen²,D-Pen⁵]enkefalin



- dlouhodobé působení morfinu → nízká citlivost δ -OR k inhibičnímu účinku sodných iontů (narušení rovnováhy mezi aktivním a neaktivním stavem receptoru)

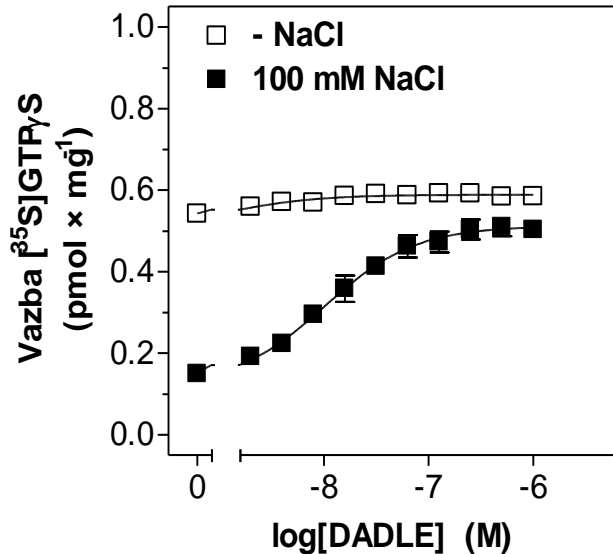
δ -OR-G_i1 α (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293

- OR vytvářejí velmi složitou signalizační síť
- GPCR-G α fúzní proteiny poskytují možnost napodobit fyziologicky se vyskytující interakce
 - užitečný model pro porovnání účinnosti vazby mezi definovaným typem receptoru a definovaným typem G proteinu

→ **přesná a známá stechiometrie 1:1 mezi receptorem a G proteinem**
- buněčná linie δ -OR-G_i1 α (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293
 - exprimuje fúzní protein mezi δ -OR a G_i1 α proteinem rezistentním vůči PTX (pertussis toxin)

δ -OR-G_i1 α (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293

Inhibice signalizace δ -OR monovalentními kationty



- vliv různých monovalentních kationtů na bazální a agonistou stimulovanou vazbu [³⁵S]GTP γ S
 - v jejich nepřítomnosti zjištěna vysoká bazální aktivita G proteinů
 - inhibice vysoké bazální aktivity G proteinů vyvolání maximální odpovědi (B_{max})
 - afinita agonisty DADLE (EC_{50})

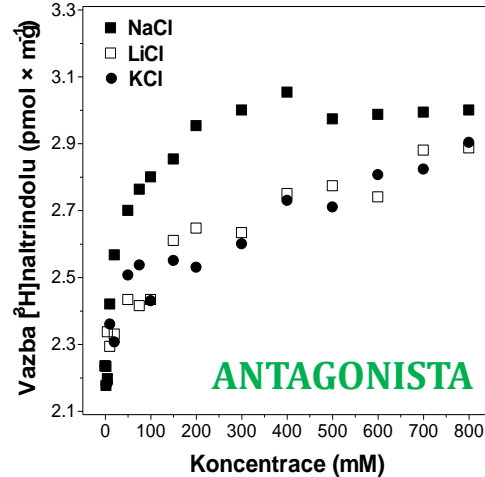
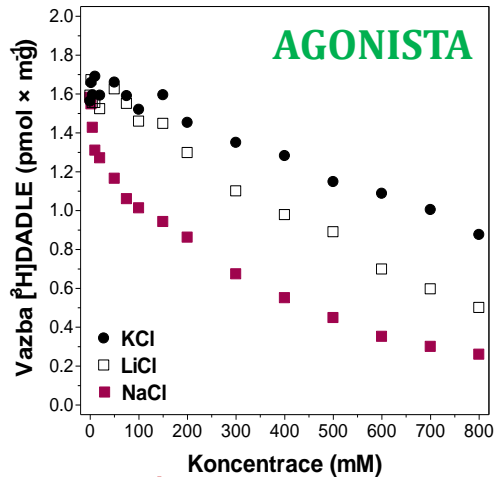
$Na^+ > Li^+ \approx K^+$

$Li^+ > K^+ > Na^+$

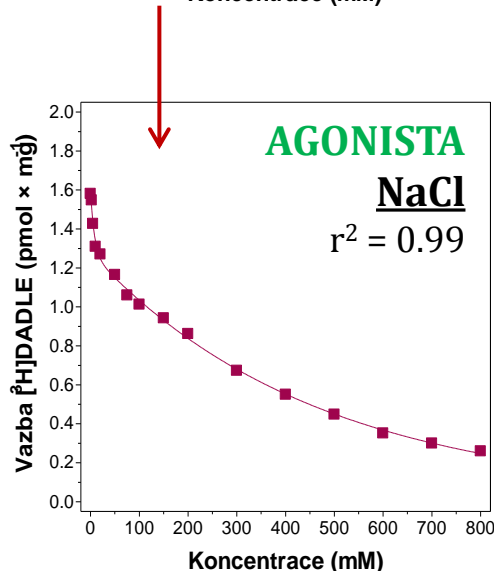
	+PTX				-PTX	
	100 mM		200 mM		200 mM	
	EC_{50} [M]	B_{max} % bazální aktivity	EC_{50} [M]	B_{max} % bazální aktivity	EC_{50} [M]	B_{max} % bazální aktivity
NaCl	1.0×10^{-8}	335	5.1×10^{-8}	350	6.5×10^{-8}	327
KCl	0.6×10^{-8}	162	9.6×10^{-8}	216	2.0×10^{-8}	237
LiCl	0.3×10^{-8}	171	0.5×10^{-8}	231	0.9×10^{-8}	248

δ -OR-G_i1 α (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293

Vliv monovalentních kationtů na vazbu agonisty a antagonisty



- schopnost monovalentních kationtů měnit vazebná místa OR



- vysokoafinní vazebné místo pro Na⁺

→ 50 % inhibice vazby agonisty při 5.4 mM koncentraci NaCl
→ interakce pozitivně nabitých Na⁺ iontů s negativně nabitou Asp⁹⁵

- nízkoafinní vazebné místo pro Na⁺

→ 50 % inhibice vazby agonisty při 321 mM koncentraci NaCl
→ vysvětlení existence nízkoafinních vazebných míst pro Na⁺ jsme se snažili hledat pomocí biofyzikálních studií se zaměřením na plazmatickou membránu

δ -OR-G_i1 α (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293

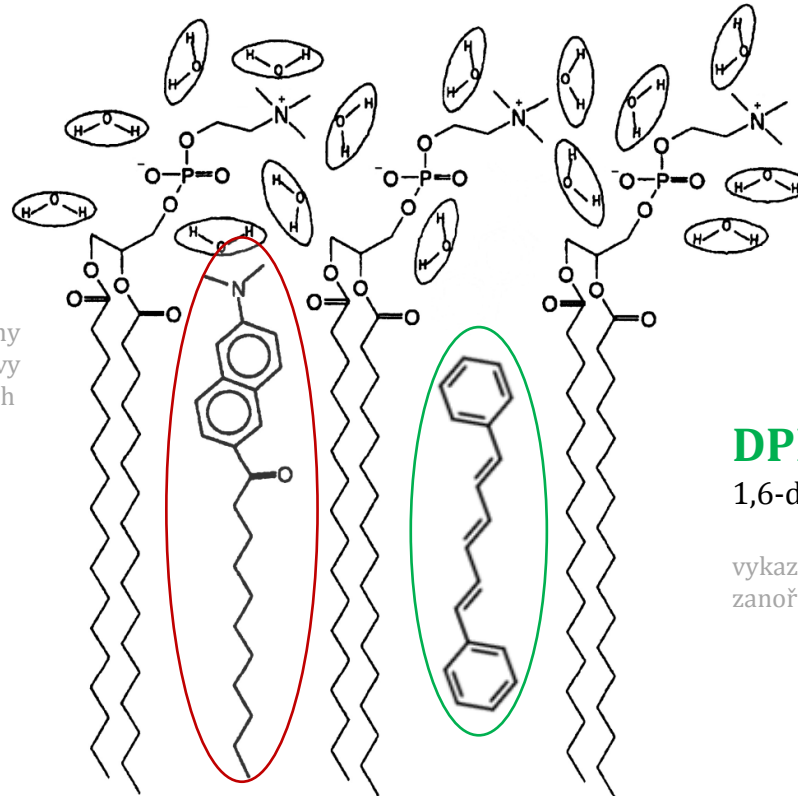
Biofyzikální stav plazmatické membrány

- spojení GPCRs a G proteinů s plazmatickou membránou je činí citlivými k jejich lipidovému okolí → **interakce s lipidy** jsou důležité pro jejich funkci
- role monovalentních kationtů při interakci s polárním rozhraním membrána-voda a hydrofóbním vnitřkem lipidové dvojvrstvy

Laurdan

(2-dimethylamino-6-lauroylnaftalen)

postihuje změny ve vlastnostech membrány díky své citlivosti k polaritě lipidové dvojvrstvy a poskytuje informaci o lipidových karbonylech



DPH

1,6-difenyl-1,3,5-hexatrien

vykazuje silnou fluorescenci, pokud je zanořen do lipidové membrány

δ-OR-G_i1α (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293

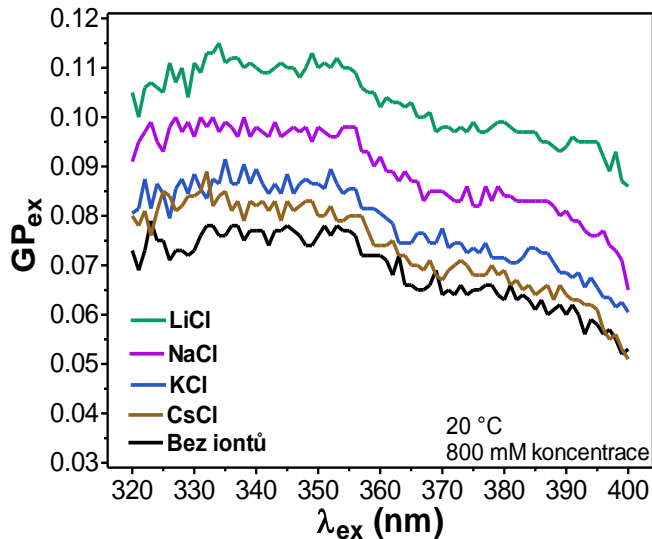
Excitační generalizovaná polarizace Laurdanu - GP_{ex}

$$GP_{ex}(\lambda_{ex}) = \frac{I_{440} - I_{490}}{I_{440} + I_{490}}$$

λ_{ex}excitační vlnová délka

I_{440}, I_{490}intenzity fluorescence změřené při emisních vlnových délkách 440 a 490 nm

↑ GP_{ex}
↓ polarita membrány a mobilita membránových komponent v hydrofilní části lipidů (oblast polárních hlaviček)



	Poloměry iontů	Přibližné poloměry hydratovaných iontů
	[Å] 1Å = 10 ⁻¹⁰ m	[Å] 1Å = 10 ⁻¹⁰ m
Li ⁺	0.68	6
Na ⁺	0.95	4
K ⁺	1.33	3
Cs ⁺	1.69	2.5

Lange et al., Příručka Chemie, 1979

Li⁺ > Na⁺ > K⁺ > Cs⁺ > médium bez iontů

HEK 293
POPC/POPS
POPC/POPS/cholesterol

POPC 1,2-palmitoyl-oleoyl-*sn*-glycero-3-fosfocholin
POPS 1,2-palmitoyl-oleoyl-*sn*-glycero-3-fosfoserin

monovalentní kationty pronikají dovnitř lipidové dvojvrstvy na úroveň glycerolu, kde interagují s kyslíkovými atomy karbonylů a nahrazují tak molekuly vody

Jurkiewicz P. et al., BBA, 2012

δ -OR-G_i1 α (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293

Rovnovážná anizotropie fluorescence DPH - GP_{ex}

$$r_{\text{DPH}} = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}$$

I_{\parallel}složky světelné intenzity rovnoběžné ke směru polarizace budícího záření
 I_{\perp} složky světelné intenzity kolmé ke směru polarizace budícího záření

↑ r_{DPH}

↓ membránová fluidita

vliv monovalentních kationtů na vnitřní hydrofóbní část membrány

	$r_{\text{DPH}} \pm \text{SEM}$ (25 °C Ex365nm/Em425nm)			
	0 mM	100 mM	200 mM	800 mM
	0.204 ± 0.003			
LiCl		0.205 ± 0.004 ^{NS}	0.209 ± 0.004 ^{NS}	0.211 ± 0.005 ^{NS}
NaCl		0.203 ± 0.004 ^{NS}	0.206 ± 0.004 ^{NS}	0.213 ± 0.005 ^{NS}
KCl		0.205 ± 0.003 ^{NS}	0.208 ± 0.004 ^{NS}	0.213 ± 0.005 ^{NS}
CsCl		0.208 ± 0.004 ^{NS}	0.206 ± 0.004 ^{NS}	0.214 ± 0.005 ^{NS}

- žádné změny hodnot r_{DPH}

→ vliv vysokých koncentrací monovalentních kationtů nastává výlučně jako interakce s povrchovým, polárním regionem lipidové dvojvrstvy

→ hydrofóbní vnitřek membrány se účinku monovalentních kationtů neúčastní

Závěr

- frontální mozková kůra potkanů vystavených dlouhodobému působení morfinu
 - mechanismus závislosti na morfinu je založen na desenzitizaci odpovědi δ - a μ -OR, která nastává již na úrovni funkční aktivity G proteinů
 - zvýšení počtu δ -OR a změna jejich citlivosti k sodným iontům
- buněčná linie δ -OR- $G_i1\alpha$ (Cys³⁵¹-Ile³⁵¹)-HEK293
 - rozlišení vysoko- a nízkoafinních míst pro Na⁺ při inhibici vazby agonisty δ -OR
 - polární rozhraní membrána-voda jsme označily 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



Děkuji za pozornost