

**Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta**

**Biochemie**

**Charles University, Faculty of Science**

**Biochemistry**

Doktorský studijní program: Biochemie

Doctoral study programme: Biochemistry

**Autoreferát dizertační práce**

**Summary of the Doctoral thesis**



**Mgr. Kristína Cechová**

Vliv opioidních ligandů na jejich receptory v modelových buňkách (př. lymfocyty, buňky mozkové tkáně, buněčné linie)

The effects of opioid ligands on their receptors in model cells (e.g. lymphocytes, neural cells, cell lines)

*Školitel/ Supervisor:* doc. RNDr. Petr Svoboda, DrSc.

Praha, 2020

**Autoreferát dizertační práce.....2**

**Summary of the Doctoral thesis.....24**

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

**Biochemie**

Doktorský studijní program: Biochemie

**Autoreferát dizertační práce**



**Mgr. Kristína Cechová**

Vliv opioidních ligandů na jejich receptory v modelových buňkách (př. lymfocyty,  
buňky mozkové tkáně, buněčné linie)

*Školitel:* doc. RNDr. Petr Svoboda, DrSc.

Praha, 2020

## **Abstrakt**

Morfin a další opioidy jsou významné léky používané při léčbě bolesti. Při jejich dlouhodobém užívání však často dochází k vytvoření závislosti a tolerance což omezuje jejich použití v klinické praxi. Opioidy se vážou na opioidní receptory a kromě bolesti regulují například emoce a stres. Opioidy a opioidní receptory mají hlavní funkci v centrální nervové soustavě, ale významně ovlivňují i imunitní systém. Mechanismus, kterým opioidy imunitní systém ovlivňují stejně jako mechanismy rozvoje závislosti a tolerance nebyly doposud zcela objasněny. Změny v množství opioidních receptorů mohou odrážet tyto procesy, dále může také docházet k změnám ve funkci, nebo oligomerizaci. Oligomerizace opioidních receptorů je kontroverzní téma, protože doposud publikované výsledky jsou nejednoznačné a mnohdy protichůdné.

V rámci této práce bylo zjištěno, že působením morfinu se v kůře předního mozku potkana nezměnilo celkové množství opioidních receptorů. V buňkách imunitního systému bylo průtokovou cytometrií stanoveno, že morfin způsobil specifický nárůstu množství  $\mu$ -opioidního receptoru. Zvýšené množství mRNA  $\mu$ -opioidního receptoru bývá v literatuře spojováno se sníženou funkcí imunitního systému. Zjištěné zvýšení množství tohoto receptoru tak ukazuje na imunosupresivní účinky morfinu. Vliv morfinu na celkové proteinové složení lymfocytů bylo stanoveno proteomickou analýzou, jejíž výsledky naznačují, že morfin může také způsobit epigenetické změny nebo poškození DNA.

Oligomerizace opioidních receptorů v modelových buňkách byla stanovena metodami fluorescenční mikroskopie. Tyto metody umožnily detailní pohled na jednotlivé molekuly opioidních receptorů a tak bylo možné pozorovat, zda opioidní receptory tvoří oligomery. Bylo zjištěno, že při vyšším množství receptorů v membráně buněk, existují  $\kappa$ -opioidní receptory ve formě dimerů, zatímco  $\mu$ -, a  $\delta$ -opioidní receptory jsou monomerní. Tato zjištění mohou mít významnou roli při dalším výzkumu signalizace a funkce opioidních receptorů a také při vývoji nových  $\kappa$ -opioidních ligandů.

# Obsah

<b>Abstrakt .....</b>	<b>3</b>
<b>1. Úvod.....</b>	<b>5</b>
<b>2. Cíle.....</b>	<b>6</b>
<b>3. Materiál a metodika .....</b>	<b>6</b>
<b>4. Výsledky a diskuse .....</b>	<b>8</b>
4.1 Stanovení množství $\mu$ -, $\delta$ -, a $\kappa$ -opioidních receptorů v přední mozkové kůře potkana po 10-denní aplikaci morfinu metodou „Western blotting“ .....	8
4.2 Stanovení množství $\mu$ -, $\delta$ -, a $\kappa$ -opioidních receptorů v potkaních lymfocytech ovlivněných konkanavalinem A pomocí průtokové cytometrie a agonistem stimulovaná vazba [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S .....	9
4.3 Stanovení množství $\mu$ -, $\delta$ -, a $\kappa$ -opioidních receptorů v potkaních lymfocytech ovlivněných morfinem pomocí průtokové cytometrie.....	10
4.4 Stanovení množství $\mu$ -, $\delta$ -, a $\kappa$ -opioidních receptorů v lidských lymfocytech ovlivněných morfinem pomocí průtokové cytometrie.....	11
4.5 Proteomická analýza potkaních lymfocytů ovlivněných konkanavalinem A, nebo morfinem 11	
4.6 Stanovení homooligomerního stavu opioidních receptorů v buňkách linie CHO-K1.....	12
<b>5. Závěry.....</b>	<b>13</b>
<b>Vědecké publikace a činnosti .....</b>	<b>15</b>
<b>Curriculum Vitae .....</b>	<b>17</b>
<b>6. Použitá literatura.....</b>	<b>19</b>

# 1. Úvod

*„Pokud by se celá materia medica, kterou máme k dispozici, omezovala na výběr a použití pouze jedné drogy, jsem si jistý, že by si mnozí z nás, pokud ne většina, vybrali opium; a jsem přesvědčen, že pokud bychom měli vybrat, řekněme půl tuctu nejdůležitějších drog v lékopisu, měli bychom všichni umístit opium na první pozici.“* David I. Macht (1915).

Tento citát z práce doktora Machta je i po více než sta letech stále aktuální. Možná dnes by opium, nebo opioid morfin jako hlavní analgetická složka opia, nebyl vybrán jako ten nejdůležitější lék. Moderní medicína pořád spoléhá na tyto látky při léčbě silné bolesti.

V našem těle se tvoří endogenní opioidy, které regulují bolest a rozkoš a působí tak, že se vážou na opioidní receptory. Endorfíny jsou zřejmě ty nejznámější endogenní opioidy a často se označují i jako „hormony štěstí“. Uvolňují se během sexu, jedení čokolády, smíchu nebo při sportu a vytváří pocity euforie (*Farrhud a kol. 2014*). Exogenní opioidy, kam se řadí i morfin, napodobňují působení endogenních opioidů. To, že opioidy vyvolávají euforii, je přímo předurčuje na to, aby byly lidmi zneužívány. Při nadměrném užívání však dochází ke vzniku závislosti a tolerance. V psychiatrii je závislost možné definovat jako nekontrolovatelný popud drogu užit za účelem požitku a uniknout z nepříjemného vnitřního psychického rozpoložení. Tolerance bývá popisována je rostoucí potřeba užit drogu častěji, nebo ve větší dávce (*Goodman 1990*). Molekulární mechanismy toho, jak závislost a tolerance vznikají a rozvíjí se, doposud nejsou přesně známé. Popsání těchto mechanismů by mohlo vést k vývoji nových léčiv bez nežádoucích účinků, lepšímu způsobu léčby bolesti a závislosti.

Ve spojených státech amerických vrcholí „opioidní krize“. To poukazuje více než kdy předtím v moderní společnosti, jak důležité je studování opioidů, jejich působení, interakce, signalizace a dalších procesů, z hlediska medicíny a dalších vědních oborů.

## **2. Cíle**

- Prvním cílem této práce je přispět k objasnění vzniku závislosti a tolerance, se zaměřením na možnou změnu v množství opioidních receptorů v centrální nervové soustavě.
- Druhým cílem této práce je rozšířit znalosti o působení morfinu a mitogenu na proteom imunitních buněk, se zaměřením na výskyt a množství opioidních receptorů.
- Třetím cílem této práce je popsání homooligomerního stavu opioidních receptorů.

## **3. Materiál a metodika**

### **Zvířecí model**

Samci potkana kmene Wistar - Mladí dospělí, věk 2- 6 měsíců.

### **Experimentální model závislosti na morfinu**

Dávkování morfinu: 10 mg/ kg (den 1 a 2), 15 mg/ kg (den 3 a 4), 20 mg/ kg (den 5 a 6), 30 mg/ kg (den 7 a 8), 40 mg/ kg (den 9 a 10).

Morfin byl podáván intramuskulární injekcí. Kontrolním zvířatům byl injektován fyziologický roztok.

### **Izolace tkání a buněk ze zvířat**

Kůra předního mozku izolována z kontrolních a morfinem ovlivněných zvířat.

Lymfocyty ze sleziny nebo periferní krve kontrolních zvířat byly izolované na ficoll-paque PLUS gradientu. Následovala 48-hodinová inkubace s (bez) morfinu nebo konkanavalinu A.

### **Lidské buňky**

Lymfocyty z periferní krve izolovány na ficoll-paque PLUS gradientu, a inkubované 48 h inkubace s (bez) morfinu.

Mesenchymální kmenové buňky (MSC) izolovány na gelofusine. Následně byly buňky inkubované 48 h s (bez) IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ .

### **Buněčné linie**

CHO-K1

Transfekované fluorescenčně značenými opioidním receptorem (( $\mu$ -,  $\delta$ -, nebo  $\kappa$ -OR) nebo monomerní kontrolou.

### **„Western blotting“**

Stanovení  $\mu$ -,  $\delta$ -, a  $\kappa$ -opioindních receptorů v kůře předního mozku.

Stanovení  $\mu$ -,  $\delta$ -, a  $\kappa$ -opioindních receptorů v lidských MSC.

Protilátky: Anti- $\delta$ -OR-1 (sc-9111), anti- $\kappa$ -OR-1 (sc-9112), anti- $\mu$ -OR-1 (sc-15310) anti- $\mu$ -OR-1 (sc-7488), IgG-HR (sc-2004), Santa Cruz Biotechnology

### **Průtoková cytometrie**

Stanovení  $\mu$ -,  $\delta$ -, a  $\kappa$ -opioindních receptorů v potkaních lymfocytech z krve i sleziny, v lidských krevních lymfocytech a lidských MSC.

Nepřímé znační protilátkami.

Protilátky: Anti- $\delta$ -OR-1 (sc-9111), anti- $\kappa$ -OR-1 (sc-9112), anti- $\mu$ -OR-1 (sc-15310), Santa Cruz Biotechnology, IgG H&L Alexa Fluor® 555 (ab150074) Abcam.

Permeabilizace a fixace buněk: FoxP3/Transcription Factor Fixation/ Permeabilization Kit (eBioscience).

LSRII průtokový cytometer

### **Molekulární biologie**

Plazmidy pWHE636c obsahující opioidní receptory nebo monomerní kontrolu, modifikované fluorescenčními značkami. Fluorescenční značky mEGFP, SNAP-tag, „split GFP“ spolu s mKate nebo SNAP-tag.



## Fluorescenční mikroskopie

„State-of-the-art“ mikroskop

„split GFP“ metoda s troj-barevným značením

Fluorescenční mikroskopie s úplným vnitřním odrazem – pozorování jednotlivých molekul s dvoj-barevným značením

Metoda „PhotoGate“

Vyhodnocení: Fluorescenčně značené receptory byli pozorované jako „zářící body“. Zelené body – signál GFP, červené body – signál SNAP-549, a žluté body – zelené a červené body se stejnou pozicí po překryvu dvou kanálu. Míra kolokalizace byla stanovena podle

$$\text{rovnice: } \textit{coloc.ratio} = \frac{2 \times Ny}{2 \times Ny + Ng + Nr}$$

Kde  $Ny$ ,  $Ng$ ,  $Nr$  je počet žlutých, zelených a červených bodů.

## Vazebné studie s radioligandy

Agonistem stimulovaná vazba [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S

Stanovení funkční aktivity  $\mu$ -,  $\delta$ -, a  $\kappa$ -opioidních receptorů

Stanovení funkční aktivity geneticky modifikovaných  $\mu$ -,  $\delta$ -, a  $\kappa$ -opioidních receptorů přechodně exprimovaných CHO-K1 buňkami.

## 4. Výsledky a diskuse

### 4.1 Stanovení množství $\mu$ -, $\delta$ -, a $\kappa$ -opioidních receptorů v přední mozkové kůře potkana po 10-denní aplikaci morfinu metodou „Western blotting“

Opioidní receptory byli stanovené v postnukleárním supernatantu přední mozkové kůry potkanů. *In vivo* 10-denní aplikace morfinu neovlivnila množství proteinu  $\mu$ -OR. Proužky na imunoblotu odpovídající  $\mu$ -OR byly pozorovány při vyšší molekulové váze (Mv), než by se očekávalo na základě primární struktury tohoto receptoru. Podobný výsledek je uváděný i v jiných studiích (Garzon *et al.* 1995, Petaja-Repo *et al.* 2001, Huang *et al.* 2015b). Posttranslační úpravy proteinů, jako glykosylace, mohou ovlivnit pohyblivost proteinů v gelu.

Ve vzorkách které byly vystaveny působení *N*-glukosidázy F, proužky odpovídající  $\mu$ -OR byly pozorovány při nižších Mv. *N*-glykosylace je tak hlavní faktor ovlivňující pohyblivost  $\mu$ -OR. Celkové množství proteinu  $\delta$ -OR a  $\kappa$ -OR také nebylo změněno působením morfinu. Vliv *N*-glukosidázy F na pohyblivost  $\delta$ -OR a  $\kappa$ -OR byl jiný než na  $\mu$ -OR. Proužky odpovídající  $\kappa$ -OR byly stanoveny při Mv odpovídající primární struktuře receptoru.  $\delta$ -Opioidní receptory byli stanovené při vyšších Mv i po působení *N*-glukosidázy F. Je možné, že k snížené pohyblivosti  $\delta$ -OR přispívají jiné posttranslační úpravy. Například O-glykosylace, která je důležitá pro strukturní a funkční zrání  $\delta$ -OR (*Petaja-Repo et al. 2001, Leskela et al. 2009*).

#### **4.2 Stanovení množství $\mu$ -, $\delta$ -, a $\kappa$ -opioidních receptorů v potkaních lymfocytech ovlivněných konkanavalinem A pomocí průtokové cytometrie a agonistem stimulovaná vazba [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S**

Slezinní lymfocyty byli vystavené účinku konkanavalinu A (Kon A) *in vitro* po dobu 48 hodin. Zvýšené množství mRNA a proteinu  $\delta$ -ORs a  $\kappa$ -ORs účinkem Kon A bylo dříve zaznamenáno u myších lymfocytů ze sleziny, ale efekt tohoto mitogenu na množství proteinu OR v potkaních lymfocytech stanoven nebyl (*Sharp et al. 1997, Miller 1996, Miller 1998, Bidlack & Abraham 2001*). Pokud byly lymfocyty před analýzou permeabilizované, populace buněk, které měli  $\mu$ -,  $\delta$ -, a  $\kappa$ -OR, byla větší než u kontrolního vzorku. Procento kontrolních buněk, u kterých byl stanoven  $\kappa$ -OR, bylo vyšší ve srovnání s procentem buněk pozitivních na  $\mu$ -,  $\delta$ -OR. Když bylo provedeno povrchové značení receptorů, množství buněk pozitivních na OR bylo zanedbatelné jak u kontrolního tak i u Kon A ovlivněného vzorku. Stanovení funkční aktivity OR v lymfocytech byla provedena pomocí agonistem stimulované vazby [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S. Žádná specifická vazba na OR nebyla stanovena. Stanovení OR pomocí radioligandových vazebných studií bylo úspěšné pouze při použití buněčných linií a ve vzorkách lidské periferní krve. Bylo navrženo, že na bunách tohoto typu se opioidy vážou na nízko afinní místa.

Na základě výsledku této práce, je možné předpokládat, že opioidní receptory se nachází spíše uvnitř buněk a nejsou funkčně zralé.

Potkaní lymfocyty z periferní krve měli podobnou odpověď na Kon A jako buňky ze sleziny. Účinkem Kon A došlo ke zvýšení množství buněk, které měli opioidní receptory, ale celkově nebylo toto zvýšení tak výrazné jako u lymfocytů ze sleziny. Opět byl v kontrolních buňkách nejvíce zastoupený  $\kappa$ -OR.

Větší množství  $\kappa$ -OR bylo stanoveno u nezralých T-lymfocytů. U myši postrádajících  $\kappa$ -OR byla pozorována zvýšená odezva látkové imunity (Kowalski 1998, Ignatowski & Bidlack 1998, Gaveriaux-Ruff et al. 2004, Roy et al. 2001). Na základě těchto pozorování je možné předpokládat, že opioidní receptory mají úlohu v zrání, diferenciaci, látkové odpovědi lymfocytů a zvýšení množství OR může být regulačním procesem.

#### **4.3 Stanovení množství $\mu$ -, $\delta$ -, a $\kappa$ -opioidních receptorů v potkaních lymfocytech ovlivněných morfinem pomocí průtokové cytometrie**

Potkaní lymfocyty byli vystavené účinku morfinu po dobu 48 hodin *in vitro*. Ovlivnění imunitního systému, převážně imunosuprese způsobená morfinem je vědci pozorována dlouhou dobu, ale mechanismus tohoto děje a přidružené procesy nejsou zcela objasněné (Sharp 2006, Mellon & Bayern 1998). V této práci bylo zjištěno, že vysoká koncentrace morfinu ( $10^{-4}$  M) způsobila nárůst množství  $\mu$ -OR v lymfocytech ze sleziny, ale nižší koncentrace ( $10^{-5}$  M), množství  $\mu$ -OR nezměnila. Počet lymfocytů, u kterých byl stanoven  $\delta$ -OR a  $\kappa$ -OR nebyl změněn účinkem morfinu.

V lymfocytech z periferní krve morfin, v obou koncentracích, způsobili nárůst množství  $\mu$ -OR v porovnání s kontrolou. Populace buněk pozitivních na  $\delta$ -OR a  $\kappa$ -OR byla nezměněna a zůstala malá.

Dlouhodobé podávání morfinu způsobilo u myši prodlevu v náboru imunitních buněk do rány a došlo k zmenšení populace těchto buněk (Martin et al. 2010). V jiné studii, proliferační aktivita lymfocytu vyvolána Kon A byla nižší u myši, kterým byl dlouhodobě podáván morfin, a tento efekt by doprovázen zvýšenou apoptózou. U myši, které postrádali gen pro  $\mu$ -OR, oba tyto efekty pozorovány nebyli (Wang et al. 2002). Tyto zjištění indikují, že imunosupresivní účinky morfinu jsou napojeny na přítomnost  $\mu$ -OR. V další studii bylo zjištěno, že PI3K/ AKT signální dráha je zapojena do morfinem zesílené genové exprese  $\mu$ -OR. Transkripční faktor E2F1, byl zvýšený, což vyvolalo transkripci  $\mu$ -OR genu v buňkách linie CEM $\times$  174 (Liu et al. 2010).

Výsledky této disertační práce ukazují, že morfin má ovlivňuje specificky množství  $\mu$ -OR v potkaních lymfocytech ze sleziny a periferní krve a tento efekt je vyvolaný přímým kontaktem morfinu s imunitními buňky. Tyto výsledky podporují předchozí zjištění, že opioidy ovlivňují

imunitní systém i přímo (Borner et al. 2013, Roy et al. 2001, Karaji et al. 2011, Ninkovic & Roy 2013).

#### **4.4 Stanovení množství $\mu$ -, $\delta$ -, a $\kappa$ -opioidních receptorů v lidských lymfocytech ovlivněných morfinem pomocí průtokové cytometrie**

Lymfocyty z periferní krve zdravých dobrovolníků byli vystavené působení morfinu po dobu 48 hodin *in vitro*. Množství lymfocytů, které měli  $\mu$ -OR bylo větší po působení morfinu než u kontrol, což odpovídá výsledkům získaných na zvířecím modelu. V jiné studii zvýšení mRNA  $\mu$ -opioidního receptoru bylo pozorováno u pacientů, kteří byli léčeni morfinem po dobu 12 měsíců. Podobný výsledek byl získán i po 24 měsíční léčbě. Táto změna, byla doprovázena sníženým počtem NK buněk (z ang. „Natural killer cells“), což bývá spojováno s imunosupresí (Campana et al. 2010).

V této práci se účinkem morfinu zvýšil i počet lymfocytů, které měli  $\delta$ -OR. V potkaních lymfocytech množství  $\delta$ -OR ovlivněné nebylo. Počet buněk, které měli  $\kappa$ -OR, se účinkem morfinu nezměnil, ale  $\kappa$ -OR bol opět nejvíce zastoupený, což opět odpovídá studii na zvířecím modelu. V jiných studiích bylo zvýšené množství mRNA  $\kappa$ -OR stanoveno v lymfocytech periferní krve pacientů, kteří procházeli substituční metadonovou léčbou (Shahkarami et al. 2019) a množství  $\mu$ -OR a  $\delta$ -OR bylo naopak sníženo (Toskulkao et al. 2010). Je tak možné, že různé opioidy mají různý vliv na expresi opioidních receptorů. Změna v množství  $\mu$ -OR účinkem morfinu je spojována právě s imunosupresí, to značí, že při použití morfinu jako léku, by se mělo zvážít u pacientů se sníženou funkcí imunitního systému. Pro pochopení této problematiky je nutný další výzkum.

#### **4.5 Proteomická analýza potkaních lymfocytů ovlivněných konkanavalinem A, nebo morfinem**

Potkaní lymfocyty ze sleziny byly vystavené účinku Kon A, nebo morfinu po dobu 48 hodin *in vitro*. Proteomická analýza poskytla komplexní pohled na to jak Kon a morfin ovlivňují proteinové složení těchto lymfocytů. Vliv Kon A na proteom lymfocytů byl značný. Proteiny cytoplasmy a jaderné proteiny byly nejvíce změněné a představovali více než 50 % ze všech změn. Většinu proteinů, kterých množství bylo zvýšeno účinkem Kon A, má funkci ve zpracování RNA, metabolisme, negativní regulace apoptózy, a proliferaci, což jsou funkce

spojené s buněčným růstem a dělením. Proteiny, kterých množství bylo sníženo účinkem KonA, sehrávají úlohu především při apoptóze, přenosu signálu, ovlivňují tvar buněk, pohyb a metabolismus.

Proteomická analýza lymfocytů, které byly vystavené účinku morfinu, ukázala, že změny ve složení proteinu není tak dramatické jako po působení Kon A. Pouze množství 23 proteinů bylo změněno. Většina proteinů, u kterých byla pozorována změna, jsou proteiny jádra, nebo cytoplasmy. Tyto proteiny jsou zapojeny především do procesů zpracování RNA, organizace jádra, a ovlivňují buněčný tvar a pohyb. Morfin zvýšil množství histonu H3 a histonu H2A, kterých acetylace a metylace ovlivňuje DNA transkripci. Tyto histony mají také funkci v reparaci poškozené DNA (*Li et al. 2008, Tolstorukov et al. 2012*). Dříve bylo prokázáno, že morfin způsobuje poškození DNA v T-lymfocytech (*Tsujikawa et al. 2009*). Výsledky této proteomické analýzy také poukazují na možné epigenetické změny, nebo poškození DNA účinkem morfinu.

#### **4.6 Stanovení homooligomerního stavu opioidních receptorů v buňkách linie CHO-K1**

Pro stanovení intermolekulárních interakcí opioidních receptorů byly tyto receptory pozorovány na úrovni jednotlivých molekul pomocí fluorescenční mikroskopie s úplným vnitřním odrazem (TIRFM - z ang. „total internal reflection fluorescence microscopy“). Fluorescenčně označené opioidní receptory byly přechodně exprimovány CHO-K1 buňkami.

Výsledky metody „split GFP“ s troj-barevným značením ukázali, že  $\kappa$ -OR mají nejvyšší tendenci k tvorbě dimerů, protože poskytli mnohem vyšší frakci GFP signálu, ve srovnání s monomerní kontrolou. Frakce signál GFP  $\mu$ -OR a  $\delta$ -OR byla srovnatelná s monomerní kontrolou.

Metoda TIRFM s dvoubarevným značením, kterou byly pozorovány jednotlivé molekuly OR, byla použita na kvantitativní stanovení poměru monomery/ dimery. Tato metoda vyžaduje, aby byla hustota fluorescenčně značených proteinů nízká ( $< 5$  fluoroforů/ $\mu\text{m}^2$ ), protože při vyšší hustotě by nebylo možné pozorovat jednotlivé molekuly. To by vyústilo k vysokému náhodnému překryvu signálu, tj. kolokalizaci. Hodnoty míry kolokalizace (frakce žlutých spotů) byly podobné pro všechny typy OR ve srovnání s monomerní kontrolou, co zdánlivě vypadá jako protichůdný výsledek k výsledku metody „split GFP“ pro  $\kappa$ -OR. Dimerizace receptorů však

závisí i na jejich hustotě. Proto byla dále využita technika „PhotoGate“, která umožňuje pozorování jednotlivých molekul, ale zároveň je hustota receptorů na membráně vysoká. Pomocí této techniky bylo stanoveno, že  $\kappa$ -OR tvoří dimery při hustotách 10-125 fluoroforů/ $\mu\text{m}^2$ , přičemž  $\mu$ -OR, a  $\delta$ -OR jsou monomery. Pozorovaná kolokalizace mEGFP a SNAP-značených  $\mu$ -OR,  $\delta$ -OR a monomerní kontroly byly pouze přechodná, zatímco kolokalizace  $\kappa$ -OR byla pozorována po delší čas, tj. tvořili dimery, při stejných hustotách. Vyšší stupeň oligomerizace nebyl pozorován, to znamená, že dimerizace  $\kappa$ -OR je specifický efekt a není výsledkem náhodné kolokalizace, nebo shlukování. Jiné fluorescenční mikroskopické metody jako FRAP a FRET vyžadují hustotu receptorů kolem 160 fluoroforů/ $\mu\text{m}^2$  a větší, k získání kvalitních dat (Sarabipour & Hristova 2016). Klasické metody, které umožňují pozorování jednotlivých molekul, naopak vyžadují nízkou hustotu do 5 fluoroforů/ $\mu\text{m}^2$  (Kasai et al. 2011). V této práci byl pomocí „PhotoGate“ poprvé studován rozsah hustoty od 10 po 100 fluoroforů/ $\mu\text{m}^2$  (reálna hustota molekul 20–250 /  $\mu\text{m}^2$ ), který je zároveň fyziologický rozsah hustoty těchto receptorů (Meral et al. 2018). Protože byly opioidní receptory modifikované fluorescenčními značky, jejich funkční aktivita byla ověřena agonistem stimulovanou vazbou [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S.

## 5. Závěry

Po 10 denní *in vivo* aplikaci morfinu nedošlo ke změně množství proteinu opioidních receptorů v přední mozkové kůře potkana. Tolerance a závislost tak zřejmě nejsou presentovány změnou v množství OR. Tento výsledek je v souladu s pozorováním, že exprese opioidních receptorů může být regulována různě v rozličných strukturách mozku.

V potkaních lymfocytech, krátkodobé *in vitro* působení mitogenu konkanavalinu A způsobilo výraznou změnu v množství různých proteinů, včetně opioidních receptorů. Většina proteinů se zvýšenou expresí po Kon A má úlohu ve zpracování RNA, metabolismu a negativní regulaci apoptózy. Proteiny se sníženou expresí, jsou proteiny zapojeny do procesů apoptózy a přenosu signálu. Tyto výsledky přinášejí nový pohled na to jak působení mitogenu ovlivňuje proteom těchto buněk.

Krátkodobé působení morfinu *in vitro* na potkaní lymfocyty způsobilo změnu v množství proteinů, které jsou zapojeny do regulace transkripce a také do oprav poškozené DNA. Tyto výsledky podporují teorii, že morfin způsobuje epigenetické změny a poškození DNA. Proteomická analýza poskytla nový, ucelený pohled na morfinem vyvolané změny v proteinovém složení. Účinkem morfinu se zvýšilo množství  $\mu$ -OR, ale množství  $\delta$ - and  $\kappa$ -OR změněno nebylo. Toto zvýšení  $\mu$ -OR naznačuje, že specificky tento opioidní receptor je zapojen do přímé odezvy lymfocytů na morfin.

Předběžné výsledky poukazují na to, že *in vitro* působením morfinu na lidské lymfocyty dochází ke změnám v množství proteinu  $\mu$ -OR a  $\delta$ -OR.

Tahle změna byla pozorována po krátkodobém působení, což naznačuje, že morfin navozuje náhlou modulaci imunitního systému. Pro objasnění toho jak tento opioid ovlivňuje imunitní systém je potřeba dalšího výzkumu.

Homooligomerní stav opioidních receptorů byl stanoven. V buňkách linie CHO-K1,  $\kappa$ -OR tvořili dimery ve vyšších hustotách receptoru, zatímco  $\mu$ -OR a  $\delta$ -OR byli převážně monomery. Homooligomerizace je základní vlastnost, kterou třeba znát, protože může mít vliv na farmakologii, signalizaci receptoru, a také na vývoj nových léčiv.

## **Vědecké publikace a činnosti**

### **Publikační podklad dizertační práce**

Ujcikova, H., Hlouskova, M., Cechova, K., Stolarova, K., Roubalova, L., Svoboda, P. (2017) Determination of  $\mu$ -,  $\delta$ - and  $\kappa$ -opioid receptors in forebrain cortex of rats exposed to morphine for 10 days: Comparison with animals after 20 days of morphine withdrawal, *PLoS One (10):e018679*

IF = 2.766 (2017)

Cechova, K., Hlouskova, M., Javorkova, E., Roubalova, L., Ujcikova, H., Holan, V., Svoboda, P. (2018) Up-regulation of  $\mu$ -,  $\delta$ - and  $\kappa$ -opioid receptors in concanavalin A-stimulated rat spleen lymphocytes, *J Neuroimmunol. 15*, 321:12-23

IF = 2.832 (2018)

Holan, V., Cechova, K., Zajicova, A., Kossl, J., Hermankova, B., Bohacova, P., Hajkova, M., Krulova, M., Svoboda, P., and Javorkova, E. (2018) The Impact of Morphine on the Characteristics and Function Properties of Human Mesenchymal Stem Cells, *Stem Cell Rev Rep 14*, 801-811.

IF = 4.697 (2018)

Ujcikova, H., Cechova, K., Roubalova, L., Brejchova, J., Kaufman, J., Holan, V., Svoboda, P. (2020) The high-resolution proteomic analysis of protein composition of rat spleen lymphocytes stimulated by Concanavalin A; a comparison with morphine-treated cells, *J Neuroimmunol. 15*, 341:577191

IF = 3.125 (2019)

### **Manuskript**

Cechova, K., Lan, C., Barthes, N. P. F., Jung, M., Ulbrich, M.H., (2020) Kappa but not delta or  $\mu$  opioid receptors form homodimers at low membrane densities.

<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.03.22.002394v1.abstract>



### **Ostatní publikace**

Ujcikova, H., Cechova, K., Jagr, M., Roubalova, L., Vosahlikova, M., Svoboda, P. (2020) Proteomic analysis of protein composition of rat hippocampus exposed to morphine for 10 days; comparison with animals after 20 days of morphine withdrawal, *PLoS One* 15(4):e0231721  
IF = 2.740 (2019)

Vosahlikova, M., Roubalova, L., Cechova, K., Kaufman, J., Musil, S., Miksik, I., Alda, M., Svoboda, P. (2020) Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and lipid peroxidation in forebrain cortex and hippocampus of sleep-deprived rats treated with therapeutic lithium concentration for different periods of time, *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 29, 102:109953.  
IF = 4.361 (2019)

### **Konference**

Cechová, K., Roubalová, L., Svoboda, P. (2015) Up-regulace opioidních receptorů typu  $\mu$ ,  $\delta$  a  $\kappa$  v lymfocytech sleziny potkana vlivem concanavalinu A, XVII. Pracovní setkání biochemiků a molekulárních biologů, Masarykova univerzita v Brně – Přírodovědecká fakulta, Česká společnost pro biochemii a molekulární biologii, 10–11. 11. 2015, Brno, Česká Republika

Cechova, K., Javorkova, E., Holan, V., Svoboda, P. (2019) Morphine up-regulates  $\mu$ -opioid receptors in rat lymphocytes, Pharmacology 2019, British Pharmacological Society, 15–20.12.2019, Edinburgh, Skotsko, Velká Británie.

### **Stáž**

Albert-Ludwigs-Universita Freiburg, BIOSS centrum biologických signalizačních studií, Laboratorium Kvantitativního zobrazování jednotlivých molekul, vedoucí *Dr. Maximilian Ulbrich*, 18. 01. 2018-18. 01. 2019, Freiburg, Německo, Projekt FM/a/2017-2-072, Podpořeno fondem mobility University Karlovy.

# **Curriculum Vitae**

## **OSOBNÍ ÚDAJE**

**KRISTÍNA CECHOVÁ**

kcechovak@gmail.com

Národnost - Slovenská

Datum a místo nar. - 04. 06. 1993, Čadca, Slovensko

## **JAZYKOVÉ ZNALOSTI**

Angličtina – pokročilý uživatel (CEFR úroveň C1 – IELTS™)

Němčina – mírně pokročilý uživatel

Slověnština – mateřský jazyk

## **VZDĚLÁNÍ**

### **UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

#### **Přírodovědecká fakulta**

*Doktor v oboru Biochemie*

Dizertační práce: Vliv opioidních ligandů na jejich receptory v modelových buňkách (př.

lymfocyty, buňky mozkové tkáně, buněčné linie)

2016 – 2020 (předpokládán)

*Magistr v oboru Biochemie*

Diplomová práce: Studium opioidních receptorů

2014 – 2016

*Bakalář v oboru Biochemie*

Bakalářská práce: Funkční aktivita opioidních receptorů v membránových doménách

2011 – 2014

## **PRACOVNÍ SKUŠENOSTI A STÁŽE**

**FYZIOGICKÝ ÚSTAV AKADEMIE VĚD ČESKÉ REPUBLIKY**

**Oddělení Biomatematiky**

*Odborný pracovník*

2013 – 2020

**UNIVERZITNÍ ZDRAVOTNÍ CENTRUM FREIBURG**

**Oddělení interního lékařství**

*Biochemik*

Pracovní ústav: BIOS Centre

01. 01. 2019 – 30. 04. 2019

**BIOS CENTRUM BIOLOGICKÝCH SIGNALIZAČNÍCH STUDIÍ**

**Laboratorium kvantitativního zobrazování jednotlivých molekul**

*Stážista*

18. 01. 2018 – 18. 01. 2019

## **6. Použitá literatura**

- Bidlack, J.M., and Abraham, M.K. (2001). Mitogen-induced activation of mouse T cells increases kappa opioid receptor expression. *Adv Exp Med Biol* 493, 103-110.
- Borner, C., Lanciotti, S., Koch, T., Holtt, V., and Kraus, J. (2013). mu opioid receptor agonist-selective regulation of interleukin-4 in T lymphocytes. *J Neuroimmunol* 263, 35-42.
- Campana, G., Sarti, D., Spampinato, S., and Raffaelli, W. (2010). Long-term intrathecal morphine and bupivacaine upregulate MOR gene expression in lymphocytes. *Int Immunopharmacol* 10, 1149-1152.
- Farhud, D.D. (2014). Appraisal the Output of "Iranian J Publ Health" in 2013. *Iran J Public Health* 43, i-v.
- Garzon, J., Juarros, J.L., Castro, M.A., and Sanchez-Blazquez, P. (1995). Antibodies to the cloned mu-opioid receptor detect various molecular weight forms in areas of mouse brain. *Mol Pharmacol* 47, 738-744.
- Gaveriaux-Ruff, C., Simonin, F., Filliol, D., and Kieffer, B. (2004). Antibody response and allogeneic mixed lymphocyte reaction in mu-, delta-, and kappa-opioid receptor knockout mice. *J Neuroimmunol* 147, 121-122.
- Goodman, A. (1990). Addiction: definition and implications. *Br J Addict* 85, 1403-1408.
- Huang, P., Chen, C., and Liu-Chen, L.Y. (2015b). Detection of mu opioid receptor (MOPR) and its glycosylation in rat and mouse brains by western blot with anti-muC, an affinity-purified polyclonal anti-MOPR antibody. *Methods Mol Biol* 1230, 141-154.
- Ignatowski, T.A., and Bidlack, J.M. (1998). Changes in kappa opioid receptor expression during maturation of mouse lymphocytes. *Adv Exp Med Biol* 437, 117-124.

- Karaji, A.G., Reiss, D., Matifas, A., Kieffer, B.L., and Gaveriaux-Ruff, C. (2011). Influence of endogenous opioid systems on T lymphocytes as assessed by the knockout of mu, delta and kappa opioid receptors. *J Neuroimmune Pharmacol* 6, 608-616.
- Kasai, R.S., Suzuki, K.G., Prossnitz, E.R., Koyama-Honda, I., Nakada, C., Fujiwara, T.K., and Kusumi, A. (2011). Full characterization of GPCR monomer-dimer dynamic equilibrium by single molecule imaging. *J Cell Biol* 192, 463-480.
- Kowalski, J. (1998). Immunomodulatory action of class mu-, delta- and kappa-opioid receptor agonists in mice. *Neuropeptides* 32, 301-306.
- Leskela, T.T., Markkanen, P.M., Alahuhta, I.A., Tuusa, J.T., and Petaja-Repo, U.E. (2009). Phe27Cys polymorphism alters the maturation and subcellular localization of the human delta opioid receptor. *Traffic* 10, 116-129
- Li, Y., Reddy, M.A., Miao, F., Shanmugam, N., Yee, J.K., Hawkins, D., Ren, B., and Natarajan, R. (2008). Role of the histone H3 lysine 4 methyltransferase, SET7/9, in the regulation of NF-kappaB-dependent inflammatory genes. Relevance to diabetes and inflammation. *J Biol Chem* 283, 26771-26781.
- Liu, H., Li, H., Guo, L., Li, M., Li, C., Wang, S., Jiang, W., Liu, X., McNutt, M.A., and Li, G. (2010). Mechanisms involved in phosphatidylinositol 3-kinase pathway mediated up-regulation of the mu opioid receptor in lymphocytes. *Biochem Pharmacol* 79, 516-523.
- Madden, J.J., Donahoe, R.M., Zwemer-Collins, J., Shafer, D.A., and Falek, A. (1987). Binding of naloxone to human T lymphocytes. *Biochem Pharmacol* 36, 4103-4109.
- Macht, D.I. (1915). The history of opium and some of its preparations and alkaloids. *Journal of the American Medical Association* LXIV.
- Martin, J.L., Koodie, L., Krishnan, A.G., Charboneau, R., Barke, R.A., and Roy, S. (2010). Chronic morphine administration delays wound healing by inhibiting immune cell recruitment to the wound site. *Am J Pathol* 176, 786-799.

- Mehrishi, J.N., and Mills, I.H. (1983). Opiate receptors on lymphocytes and platelets in man. *Clin Immunol Immunopathol* 27, 240-249.
- Mellon, R.D., and Bayer, B.M. (1998). Evidence for central opioid receptors in the immunomodulatory effects of morphine: review of potential mechanism(s) of action. *J Neuroimmunol* 83, 19-28.
- Meral, D., Provasi, D., Prada-Gracia, D., Moller, J., Marino, K., Lohse, M.J., and Filizola, M. (2018). Molecular details of dimerization kinetics reveal negligible populations of transient micro-opioid receptor homodimers at physiological concentrations. *Sci Rep* 8, 7705.
- Miller, B. (1996). delta opioid receptor expression is induced by concanavalin A in CD4+ T cells. *J Immunol* 157, 5324-5328.
- Miller, B.C. (1998). Western blot analysis of the delta (delta)-opioid receptor in activated murine T cells. *Adv Exp Med Biol* 437, 159-167.
- Ninkovic, J., and Roy, S. (2013). Role of the mu-opioid receptor in opioid modulation of immune function. *Amino Acids* 45, 9-24.
- Petaja-Repo, U.E., Hogue, M., Laperriere, A., Bhalla, S., Walker, P., and Bouvier, M. (2001). Newly synthesized human delta opioid receptors retained in the endoplasmic reticulum are retrotranslocated to the cytosol, deglycosylated, ubiquitinated, and degraded by the proteasome. *J Biol Chem* 276, 4416-4423
- Roy, S., Balasubramanian, S., Sumandeeep, S., Charboneau, R., Wang, J., Melnyk, D., Beilman, G.J., Vatassery, R., and Barke, R.A. (2001). Morphine directs T cells toward T(H2) differentiation. *Surgery* 130, 304-309.
- Sarabipour, S., and Hristova, K. (2016). Effect of the achondroplasia mutation on FGFR3 dimerization and FGFR3 structural response to fgf1 and fgf2: A quantitative FRET study in osmotically derived plasma membrane vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1858, 1436-1442.

- Shahkarami, K., Vousooghi, N., Golab, F., Mohsenzadeh, A., Baharvand, P., Sadat-Shirazi, M.S., Babhadi-Ashar, N., Shakeri, A., and Zarrindast, M.R. (2019). Evaluation of dynorphin and kappa-opioid receptor level in the human blood lymphocytes and plasma: Possible role as a biomarker in severe opioid use disorder. *Drug Alcohol Depend* 205, 107638.
- Sharp, B.M. (2006). Multiple opioid receptors on immune cells modulate intracellular signaling. *Brain Behav Immun* 20, 9-14.
- Sharp, B.M., Shahabi, N., McKean, D., Li, M.D., and McAllen, K. (1997). Detection of basal levels and induction of delta opioid receptor mRNA in murine splenocytes. *J Neuroimmunol* 78, 198-202.
- Tolstorukov, M.Y., Goldman, J.A., Gilbert, C., Ogryzko, V., Kingston, R.E., and Park, P.J. (2012). Histone variant H2A.Bbd is associated with active transcription and mRNA processing in human cells. *Mol Cell* 47, 596-607.
- Toskulkao, T., Pornchai, R., Akkarapatumwong, V., Vatanatunyakum, S., and Govitrapong, P. (2010). Alteration of lymphocyte opioid receptors in methadone maintenance subjects. *Neurochem Int* 56, 285-290.
- Tsujikawa, H., Shoda, T., Mizota, T., and Fukuda, K. (2009). Morphine induces DNA damage and P53 activation in CD3<sup>+</sup> T cells. *Biochim Biophys Acta* 1790, 793-799.
- Wang, J., Charboneau, R., Balasubramanian, S., Barke, R.A., Loh, H.H., and Roy, S. (2002). The immunosuppressive effects of chronic morphine treatment are partially dependent on corticosterone and mediated by the mu-opioid receptor. *J Leukoc Biol* 71, 782-790.





# Charles University in Prague

## Faculty of Science

### Biochemistry

Study programme: Biochemistry

### Summary of the Doctoral thesis



### Mgr. Kristína Cechová

The effects of opioid ligands on their receptors in model cells (e.g. lymphocytes, neural cells, cell lines)

*Supervisor:* doc. RNDr. Petr Svoboda, DrSc.

## ***Abstract***

Morphine and other opioids are powerful drugs used for pain relief, but their clinical use has limitations as prolonged treatment leads to tolerance and addiction. Opioids bind to opioid receptors, and besides pain, they regulate mood and stress. Even though the primary role of opioids and opioid receptors is in the central nervous system, they also affect the immune system. The mechanisms of how they affect the immune system, but also the mechanisms of tolerance and addiction build-out, are not fully understood. These processes may be demonstrated as changes in the opioid receptor expression level, alteration in their function or oligomeric state. The dimerization of opioid receptors is a controversial topic in literature with many contradictory results.

In this work, changes in the protein level of opioid receptors in the rat forebrain cortex were not observed after morphine treatment. However, a specific increase in the amount of  $\mu$ -opioid receptors was determined in rat lymphocytes, using flow cytometry. In other studies, an increased mRNA level of the  $\mu$ -opioid receptor was connected with immunosuppression. The increased  $\mu$ -opioid receptor protein level indicates a similar effect. The overall effect of morphine on the protein composition of lymphocytes was determined by proteomic analysis. The results imply that morphine might cause epigenetic changes or DNA damage in lymphocytes.

To resolve the oligomeric state of opioid receptors, it was "zoomed in" to the single molecules in a model cell line using fluorescence microscopy techniques. It was revealed that  $\kappa$ -opioid receptors form homodimers in higher densities, while  $\mu$ - and  $\delta$ -opioid receptors exist predominantly as monomers. This result may impact future studies of opioid receptor signaling and function and the new drug design of  $\kappa$ -opioid receptor ligands.

# Table of Contents

<b>Abstract</b> .....	<b>25</b>
<b>1. Introduction</b> .....	<b>27</b>
<b>2. Aims</b> .....	<b>28</b>
<b>3. Materials and methods</b> .....	<b>28</b>
<b>4. Results and Discussion</b> .....	<b>30</b>
4.1    Detection of $\mu$ -, $\delta$ -, and $\kappa$ -opioid receptors in rat forebrain cortex after 10-day morphine treatment by western blotting.....	30
4.2    Detection of $\mu$ -, $\delta$ -, and $\kappa$ -opioid receptors in concanavalin A-treated rat lymphocytes by flow cytometry and [ <sup>35</sup> S]GTP $\gamma$ S assay.....	31
4.3    Detection of $\mu$ -, $\delta$ -, and $\kappa$ -opioid receptors in morphine-treated rat lymphocytes by flow cytometry.....	32
4.4    Detection of $\mu$ -, $\delta$ -, and $\kappa$ -opioid receptors in human lymphocytes exposed to morphine by flow cytometry .....	33
4.5    Proteomic analyses of rat lymphocytes exposed to concanavalin A or morphine .....	33
4.6    Determination of the homo-oligomeric state of opioid receptors in CHO-K1 cell line using fluorescence microscopy techniques.....	34
<b>5. Conclusions</b> .....	<b>36</b>
<b>Scientific publications and activities</b> .....	<b>38</b>
<b>Curriculum Vitae</b> .....	<b>41</b>
<b>6. Bibliography</b> .....	<b>43</b>

# 1. Introduction

*“If the entire materia medica at our disposal were limited to the choice and use of only one drug, I am sure that a great many, if not the majority, of us would choose opium; and I am convinced that if we were to select, say half a dozen of the most important drugs in the Pharmacopeia, we should all place opium in the first rank.”* David I. Macht (1915).

More than a century later, the quote from doctor Macht’s work seems quite relevant. Maybe today, opium, or its main analgesic compound, opioid morphine would not be chosen as the most important drug. Still, modern medicine relies on these compounds in the treatment of severe pain. In the body, endogenous opioids, are present to regulate pain and pleasure, and they do so by binding to opioid receptors (OR). Endorphins are probably the most famous endogenous opioids and are often referred to as the “hormones of happiness.” They are released during sex, chocolate-eating, laughter, or continuous exercise, creating those euphoric feelings (*Farhud et al. 2014*). Exogenous opioids, like morphine, mimic the action of endogenous opioids. The euphoric effects caused by opioids predestine these drugs to be misused, and excessive use leads to addiction and tolerance. In psychiatry, addiction can be defined as the uncontrollable incentive to take drugs to produce pleasure and provide an escape from internal discomfort. Tolerance is described as a growing need for higher or more frequent doses to achieve desired effects (*Goodman 1990*). However, the molecular mechanisms describing the genesis and rise of addiction and tolerance are not fully understood. Potentially, resolving of the mechanism might lead to the synthesis of new drugs, lacking those undesired effects, and result in better pain treatment and management of opioid addiction.

As the “*opioid epidemic*” in the USA is peaking, it shows us more than ever in these days how important it is to study opioids, their actions, effects, interactions, signaling, and other features from a medical point of view to the basic science.

## **2. Aims**

- The first aim of this study is to contribute to the elucidation of opioid addiction and tolerance build-out, focusing on the potential change in the opioid receptor protein level in the rat central nervous system.
- The second aim is to expand the knowledge of how morphine and mitogen stimulation affect the proteome of the cells of the immune system with a focus on opioid receptor expression.
- The third aim is to resolve the homo-oligomeric state of opioid receptors

## **3. Materials and methods**

### **Animals**

Male Wistar rat – young adults, age 2–6 months

### **Experimental model of morphine addiction**

Morphine administration schedule: 10 mg/ kg (day 1-2), 15 mg/ kg (day 3-4), 20 mg/ kg (day 5-6), 30 mg/ kg (day 7-8), 40 mg/ kg (day 9-10)

Morphine was applied by intramuscular injection. To control animals, normal saline was injected.

### **Tissues and cells isolated from animals**

Forebrain cortex from the morphine-treated and control animals

Splenic lymphocytes and peripheral blood lymphocytes from non-treated animals

Lymphocytes were isolated on Ficoll-Paque PLUS gradient and then incubated for 48 h in the presence or absence of concanavalin A or morphine.

### **Cells from Humans**

Human peripheral blood lymphocytes were isolated on Ficoll-Paque PLUS gradient and incubated for 48 h in the presence or absence of morphine

Isolation of mesenchymal stem cells was done on Gelofusine. MSCs were then incubated 48 h in the presence or absence of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ .

### **Cell line**

CHO-K1

Transfected with fluorescently tagged opioid receptor ( $\mu$ -,  $\delta$ -, or  $\kappa$ -OR) or monomeric control

### **Western blotting**

Detection of  $\mu$ -,  $\delta$ -, and  $\kappa$ -opioid receptors in rat forebrain cortex

Detection of  $\mu$ -,  $\delta$ -, and  $\kappa$ -opioid receptors in human MSCs

Antibodies: Anti- $\delta$ -OR-1 (sc-9111), anti- $\kappa$ -OR-1 (sc-9112), anti- $\mu$ -OR-1 (sc-15310) anti- $\mu$ -OR-1 (sc-7488), IgG-HR (sc-2004), Santa Cruz Biotechnology

### **Flow cytometry**

Detection of  $\mu$ -,  $\delta$ -, and  $\kappa$ -OR in rat splenic lymphocytes, rat PB lymphocytes, human PB lymphocytes and human MSCs.

Indirect immuno-labeling.

Antibodies: Anti- $\delta$ -OR-1 (sc-9111), anti- $\kappa$ -OR-1 (sc-9112), anti- $\mu$ -OR-1 (sc-15310), Santa Cruz Biotechnology, IgG H&L Alexa Fluor® 555 (ab150074) Abcam.

FoxP3/Transcription Factor Fixation/ Permeabilization Kit (eBioscience).

LSRII flow cytometer.

### **Molecular biology**

Different plasmids pWHE636c containing  $\mu$ -,  $\delta$ -,  $\kappa$ -OR, monomeric control, modified with fluorescent tags. Fluorescent tags: mEGFP, SNAP-tag, split GFP with mKate or SNAP-tag.

Competent bacteria *E. coli* strain DH5 $\alpha$ .

### **Fluorescent Microscopy**

State-of-the-art microscope.

Three-color split GFP assay.

Dual-color single-molecule total internal reflection fluorescence microscopy.

PhotoGate.

Evaluation: Fluorescently tagged receptors were observed as luminous 'spots'. Green spots - mEGFP signal, red spots - SNAP-549 or as yellow spots – green and red spots that shared position in an overlay of two channel. The co-localization ratio was calculated by the equation:

$$coloc.ratio = \frac{2 \times Ny}{2 \times Ny + Ng + Nr}$$

Where  $Ny$ ,  $Ng$ ,  $Nr$  are numbers of yellow, green, and red spots, respectively.

### **Radioligand assay**

Agonist stimulated [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S binding.

Determination of the functional activity of  $\mu$ -,  $\delta$ -, and  $\kappa$ -OR in rat splenic lymphocytes

Determination of the functional activity of genetically modified  $\mu$ -,  $\delta$ -, and  $\kappa$ -opioid receptors transiently expressed by CHO-K1 cells.

## **4. Results and Discussion**

### **4.1 Detection of $\mu$ -, $\delta$ -, and $\kappa$ -opioid receptors in rat forebrain cortex after 10-day morphine treatment by western blotting**

Opioid receptors were detected in postnuclear supernatant of rat forebrain cortices. Prolonged *in vivo* morphine treatment had no effect on the  $\mu$ -OR protein amount. The  $\mu$ -opioid receptor was detected as multiple bands at a higher molecular weight (Mw) than expected based on its primary structure. A similar result was obtained by other scientists (*Garzon et al. 1995, Petaja-Repo et al. 2001, Huang et al. 2015b*). Posttranslational modifications, including glycosylation, can affect mobility in a gel. When the samples were pre-treated with *N*-glycosidase F, bands were present in a lower range of Mw. N-glycosylation is the main reason for the lower mobility

of  $\mu$ -ORs. The overall amount of  $\delta$ -OR and  $\kappa$ -OR was also not altered by morphine. A similar effect of *N*-glycosidase F on  $\delta$ -,  $\kappa$ -ORs mobility was not observed.  $\kappa$ -opioid receptors were detected at expected Mw.  $\delta$ -Opioid receptors were not detected at lower Mw after pre-treatment with *N*-glycosidase F, which implies that other posttranslational modifications are affecting  $\delta$ -OR mobility in the gel. e.g., O-glycosylation is known to be important for  $\delta$ -OR maturation (Petaja-Repo et al. 2001, Leskela et al. 2009).

#### **4.2 Detection of $\mu$ -, $\delta$ -, and $\kappa$ -opioid receptors in concanavalin A-treated rat lymphocytes by flow cytometry and [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S assay**

Splenic lymphocytes were exposed to concanavalin A (Con A) for 48 h *in vitro*. It was previously reported, that Con A-treatment up-regulates mRNA and protein expression of  $\delta$ -ORs and  $\kappa$ -ORs in murine splenic lymphocytes, but the effect of Con A on the protein level of all ORs in rats was not examined before (Sharp et al. 1997, Miller 1996, Miller 1998, Bidlack & Abraham 2001). When cells were permeabilized before analysis, the populations of Con A-treated cells expressing  $\mu$ -,  $\delta$ -, and  $\kappa$ -ORs proteins were increased compared to controls. The percentage of control cells expressing  $\kappa$ -ORs was higher compared to the percentage of  $\mu$ -OR- or  $\delta$ -OR-positive cells. When surface immunolabeling was performed, the amount of control and Con A-stimulated cells that were positive on opioid receptors was negligible. [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S assay was used to confirm the functional activity of opioid receptors in these cells. No specific binding for neither of the opioid receptors was observed. Previously, successful radioligand binding assays were performed only in cell lines or peripheral blood lymphocytes from humans. Atypical, low affinity opioid binding sites on these types of cells were proposed (Mehrishi & Mills 1983, Madden et al. 1987, Toskulkaio et al. 2010, Sharp 2006). Based on the results, it is reasonable to assume that the newly synthesized opioid receptors are located intracellularly and are not functionally mature.

Rat peripheral blood (PB) lymphocytes reacted similarly to Con A exposure as splenic lymphocytes. Treatment with Con A resulted in a larger population of cells positive for  $\mu$ -ORs,  $\delta$ -ORs, and  $\kappa$ -ORs, but the up-regulation was not so profound as observed in cells from the spleen.  $\kappa$ -Opioid receptors were again the most abundant OR type in untreated cells.



High expression of  $\kappa$ -ORs was found in immature T-cells. In the  $\kappa$ -OR knock out mice, humoral activity was enhanced (*Kowalski 1998, Ignatowski & Bidlack 1998, Gaveriaux-Ruff et al. 2004, Roy et al. 2001*). These observations suggest a physiological role of opioid receptors in maturation, differentiation, the humoral response of lymphocytes, and the up-regulation of protein levels of ORs might have regulatory effects.

#### **4.3 Detection of $\mu$ -, $\delta$ -, and $\kappa$ -opioid receptors in morphine-treated rat lymphocytes by flow cytometry**

Rat lymphocytes were exposed to morphine for 48 h *in vitro*. Immunomodulation, mainly immunosuppression caused by morphine, has been observed by scientists for a long time, but the mechanism of action and the contingent effects are still not well understood (*Sharp 2006, Mellon & Bayern 1998*). This work shows that a high concentration of morphine ( $10^{-4}$  M) increased the expression of  $\mu$ -ORs in splenic lymphocytes, but lower concentration ( $10^{-5}$  M) of this opioid did not change the  $\mu$ -OR amount. The populations of splenic lymphocytes positive for  $\delta$ -ORs and  $\kappa$ -ORs were not altered by morphine.

In rat peripheral blood lymphocytes, both concentrations of morphine resulted in higher expression of  $\mu$ -when compared to controls. Populations of  $\delta$ -OR- and  $\kappa$ -OR-positive PB cells were not altered and remained small.

In mice, chronic morphine administration resulted in a delay in the recruitment of cells of the immune to a wound and a reduction in the population of these cells (*Martin et al. 2010*). In another study, the proliferative response of lymphocytes to Con A was decreased in mice chronically treated with morphine, accompanied by increased apoptosis, while in  $\mu$ -OR knock out mice, these effects were not observed (*Wang et al. 2002*). These observations indicate that immunosuppressive effects are caused by  $\mu$ -OR. Are connected to presence of the  $\mu$ -OR. Another study reported that PI3K/ AKT signaling pathway is involved in morphine-induced enhancement of  $\mu$ -ORs gene expression. The E2F1 transcription factor was up-regulated and triggered the  $\mu$ -OR gene transcription in CEM $\times$  174 cells (*Liu et al. 2010*).

The results of this work imply, that morphine specifically modifies the protein expression of  $\mu$ -ORs in rat splenic and peripheral blood lymphocytes, while other types of OR are not affected, and that this effect is evoked by direct contact of lymphocyte and morphine.

The results support previous findings that opioids act directly on the immune system (*Borner et al. 2013, Roy et al. 2001, Karaji et al. 2011, Ninkovic & Roy 2013*).

#### **4.4 Detection of $\mu$ -, $\delta$ -, and $\kappa$ -opioid receptors in human lymphocytes exposed to morphine by flow cytometry**

Peripheral blood lymphocytes of healthy individuals were exposed to morphine for 48 h *in vitro*. More lymphocytes were positive for  $\mu$ -ORs after incubation with morphine compared to controls, which agrees with results from the animal model. In another study, the up-regulation of  $\mu$ -OR mRNA in lymphocytes was found in patients, who were treated with morphine for 12 months, and the results were confirmed after 24 months. That change was accompanied by a decrease in the number of natural killer cells, which was connected to immunosuppression (*Campana et al. 2010*).

In this study, morphine increased the number of human lymphocytes expressing  $\delta$ -ORs. In rat lymphocytes,  $\delta$ -ORs protein expression was not altered. The number of cells positive for  $\kappa$ -ORs was not changed by morphine, but  $\kappa$ -ORs were the most abundant opioid receptors in control cells, which complied with the animal study. In other studies, up-regulation of  $\kappa$ -ORs mRNA in peripheral blood lymphocytes was detected in methadone-maintenance treated patients (*Shahkarami et al. 2019*), and  $\mu$ -OR and  $\delta$ -OR were found to be down-regulated (*Toskulkao et al. 2010*), which implicates that different opioids have various effects on the opioid receptor expression. Morphine alters opioid  $\mu$ -OR protein levels, and since the change of  $\mu$ -ORs expression was connected to immunosuppression, it suggests that the use of morphine in pain treatment should be carefully considered, especially in already immuno-deprived patients. However, more research is needed to resolve these concerns.

#### **4.5 Proteomic analyses of rat lymphocytes exposed to concanavalin A or morphine**

Rat splenic lymphocytes were exposed to Con A or morphine for 48 h *in vitro*. The proteomic analysis presented a complex view of how concanavalin A and morphine affect the proteome of lymphocytes. The effect of Con A on the lymphocytic proteome was profound. Cytoplasmic

and nuclear proteins represented more than 50 % of proteins with a changed expression. The majority of all Con A-up-regulated proteins were involved in RNA-processing, metabolism, negative regulation of apoptosis, and proliferation, which are functions connected to cell growth, mitosis. Down-regulated proteins are proteins mainly involved in processes of apoptosis, signal transduction, cell shape, movement, and metabolism.

Proteomic analysis of rat splenic lymphocytes exposed to morphine reported less dramatic changes in protein expression. The expression of only 23 proteins was altered. The majority of the proteins with changed expression were nuclear and cytoplasmic proteins. They have involved mainly in RNA processing, nucleus organization, and cell shape and movement. Morphine up-regulated expression of histone H3 and histone H2A. These histones are methylated or acetylated in order to modulate DNA transcription and are involved in reparation of damaged DNA (*Li et al. 2008, Tolstorukov et al. 2012*). Morphine was shown to induce DNA damage in T-cells (*Tsujikawa et al. 2009*). Results of this proteomic analysis suggest that morphine might cause epigenetic changes or DNA damage.

#### **4.6 Determination of the homo-oligomeric state of opioid receptors in CHO-K1 cell line using fluorescence microscopy techniques**

To resolve the intermolecular interactions of opioid receptors, it was "zoomed in" into single molecules of the receptors using total internal reflection microscopy (TIRFM). Fluorescently tagged opioid receptors were transiently expressed by CHO-K1 cells.

Three-color split GFP complementation assay results showed that  $\kappa$ -ORs has the highest tendency to form a homodimer as it gave much higher GFP-positive fraction when compared the monomeric control.  $\mu$ -OR and  $\delta$ -OR gave similar GFP-positive fraction as the monomeric control.

Dual-color smTIRFM was used to estimate the monomer-dimer ratio quantitatively. Single-molecule TIRFM requires low densities of expressed fluorescently tagged receptors ( $< 5$  fluorophores/ $\mu\text{m}^2$ ), as higher densities would not allow identifying individual molecules, and it would result in high random co-localization. The co-localization ratio (fraction of yellow spots) for all ORs was similar to the monomeric control and provided seeming contradictory results to the split GFP assay result for  $\kappa$ -ORs. However, the dimerization of receptors is

dependent on receptor density. Therefore, to access higher opioid receptors densities while still observing single molecules, the PhotoGate technique was introduced. By that technique, it was resolved that  $\kappa$ -OR forms homodimers at densities up to 100 fluorophores/  $\mu\text{m}^2$ , while  $\mu$ -OR and  $\delta$ -OR stay monomeric. The observed co-localization of mEGFP- and SNAP-labeled  $\mu$ -OR, or  $\delta$ -OR, or the monomeric control was only transient, whereas  $\kappa$ -OR formed longer-lasting co-localized spots, i.e., homodimers, at the same densities. Higher-order oligomers were not observed, which means that dimerization is a specific effect not caused by random co-localization or clustering. Different, more common fluorescence microscopy techniques like FRAP or FRET require densities around 160 fluorophores/  $\mu\text{m}^2$  or more to obtain quality data (*Sarabipour & Hristova 2016*). For the conventional single-molecule techniques, maximum densities of 5 fluorophores/  $\mu\text{m}^2$  can be used (*Kasai et al. 2011*). In this study, using PhotoGate, a range of densities 10–125 fluorophores/  $\mu\text{m}^2$  (real densities of 20–250 molecules/  $\mu\text{m}^2$ ) was covered, which was not previously studied, but it is the range of physiological densities (*Meral et al. 2018*). As fluorescent tags were attached to the opioid receptors, the functionality of ORs was verified by [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S binding assay.

## 5. Conclusions

After prolonged *in vivo* treatment, morphine did not alter the protein level of opioid receptors in the rat forebrain cortex. Therefore, addiction and tolerance to morphine are not accompanied by changes in the total protein level of ORs in the forebrain cortex. This result supports the observations that the expression of opioid receptors might be regulated differently in various brain structures.

In rat lymphocytes, short-term *in vitro* stimulation by mitogen concanavalin A caused a major change in the expression level of a large number of proteins, including opioid receptors. The majority of Con A-up-regulated proteins have a role in RNA-processing, metabolism, and negative regulation of apoptosis. Down-regulated proteins have involvement in the processes of apoptosis and signal transduction. The results bring a new broad perspective on how mitogen-stimulation affects the proteome of lymphocytes.

The short-term *in vitro* morphine treatment of rat lymphocytes altered the expression of proteins involved in DNA methylation. It complies with a recent theory that morphine causes epigenetic modulations and/ or DNA damage. The proteomic analysis provided a new complex view on changes in protein expression caused by morphine. Morphine also caused up-regulation of  $\mu$ -ORs, but  $\delta$ - and  $\kappa$ -ORs protein amounts were unchanged. The up-regulation of  $\mu$ -OR implies that this opioid receptor is specifically involved in the direct response of lymphocytes to morphine.

Preliminary data suggest that the expression of  $\mu$ -OR, but also  $\delta$ -OR, is altered by *in vitro* morphine treatment in human lymphocytes.

The change in ORs protein level can be detected after short-term exposure to morphine, indicating acute immunomodulation caused by the opioid. More research needs to be conducted in the future to resolve the mechanism of how the opioid modulates the immune system.

The homo-oligomeric state of opioid receptors was resolved. In the CHO-K1 cell line,  $\kappa$ -ORs formed homodimers in higher receptor densities, while  $\mu$ -OR and  $\delta$ -OR were predominantly monomers. Homodimerization of the receptors is an essential feature to

understand, because it may impact the pharmacology, signaling of the receptor, or strategies of new drug development.

## **Scientific publications and activities**

### **Thesis-relevant publications**

Ujcikova, H., Hlouskova, M., Cechova, K., Stolarova, K., Roubalova, L., Svoboda, P. (2017) Determination of  $\mu$ -,  $\delta$ - and  $\kappa$ -opioid receptors in forebrain cortex of rats exposed to morphine for 10 days: Comparison with animals after 20 days of morphine withdrawal, *PLoS One (10):e018679*

IF = 2.766 (2017)

Cechova, K., Hlouskova, M., Javorkova, E., Roubalova, L., Ujcikova, H., Holan, V., Svoboda, P. (2018) Up-regulation of  $\mu$ -,  $\delta$ - and  $\kappa$ -opioid receptors in concanavalin A-stimulated rat spleen lymphocytes, *J Neuroimmunol. 15*, 321:12-23

IF = 2.832 (2018)

Holan, V., Cechova, K., Zajicova, A., Kossl, J., Hermankova, B., Bohacova, P., Hajkova, M., Krulova, M., Svoboda, P., and Javorkova, E. (2018) The Impact of Morphine on the Characteristics and Function Properties of Human Mesenchymal Stem Cells, *Stem Cell Rev Rep 14*, 801-811.

IF = 4.697 (2018)

Ujcikova, H., Cechova, K., Roubalova, L., Brejchova, J., Kaufman, J., Holan, V., Svoboda, P. (2020) The high-resolution proteomic analysis of protein composition of rat spleen lymphocytes stimulated by Concanavalin A; a comparison with morphine-treated cells, *J Neuroimmunol. 15*, 341:577191

IF = 3.125 (2019)

### **Manuscript**

Cechova, K., Lan, C., Barthes, N. P. F., Jung, M., Ulbrich, M.H., (2020) Kappa but not delta or mu opioid receptors form homodimers at low membrane densities.

<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.03.22.002394v1.abstract>

### **Other publications**

Ujcikova, H., Cechova, K., Jagr, M., Roubalova, L., Vosahlikova, M., Svoboda, P. (2020) Proteomic analysis of protein composition of rat hippocampus exposed to morphine for 10 days; comparison with animals after 20 days of morphine withdrawal, *PLoS One* 15(4):e0231721

IF = 2.740 (2019)

Vosahlikova, M., Roubalova, L., Cechova, K., Kaufman, J., Musil, S., Miksik, I., Alda, M., Svoboda, P. (2020) Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase and lipid peroxidation in forebrain cortex and hippocampus of sleep-deprived rats treated with therapeutic lithium concentration for different periods of time, *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 29, 102:109953.

IF = 4.361 (2019)

### **Conferences**

Cechová, K., Roubalová, L., Svoboda, P. (2015) Up-regulace opioidních receptorů typu  $\mu$ ,  $\delta$  a  $\kappa$  v lymfocytech sleziny potkana vlivem concanavalinu A, XVII. Meeting of Biochemists and Molecular Biologists, Masaryk University, Brno – Faculty of Science, Department of Biochemistry & National Centre for Biomolecular Research Czech Society for Biochemistry and Molecular Biology, 10–11.11. 2015, Brno, Czech Republic

Cechova, K., Javorkova, E., Holan, V., Svoboda, P. (2019) Morphine up-regulates  $\mu$ -opioid receptors in rat lymphocytes, Pharmacology 2019, British Pharmacological Society, 15–20.12.2019, Edinburgh, Scotland, United Kingdom.

### **Internship**

Albert-Ludwigs-University Freiburg, BIOS Centre for Biological Signalling Studies, Laboratory of Quantitative Single Molecule Imaging, *Dr. Maximilian Ulbrich*,



18.01.2018-18.01.2019, Freiburg, Germany, Project FM/a/2017-2-072, Funded by the Charles University Mobility Fund.

# ***Curriculum Vitae***

## **PERSONAL INFORMATION**

**KRISTINA CECHOVA**

kcechovak@gmail.com

Nationality - Slovak

Date and place of birth - 04.06.1993, Cadca, Slovakia

## **LANGUAGE SKILLS**

English - Advanced (CEFR level C1 – IELTS™)

German - Intermediate

Slovak - Native

## **EDUCATION**

### **CHARLES UNIVERSITY IN PRAGUE**

#### **Faculty of Science**

*Doctoral degree in Biochemistry*

Thesis: The effects of opioid ligands on their receptors in model cells (e.g.

lymphocytes, neural cells, cell lines)

2016 – 2020 (expected)

*Master degree in Biochemistry*

Thesis: Study of opioid receptors

2014 – 2016

*Bachelor degree in Biochemistry*

Thesis: Functional activity of opioid receptors in membrane domains

2011 – 2014

**WORK EXPERIENCE AND INTERNSHIP**  
**INSTITUTE OF PHYSIOLOGY OF THE CZECH ACADEMY OF SCIENCES**  
**Department of Biomathematics**  
*Research assistant*  
2013 – 2020

**UNIVERSITY MEDICAL CENTER FREIBURG**  
**Department of Internal Medicine**  
*Biochemist*  
Workplace: BIOSS Centre  
01.01.2019 – 30.04.2019

**BIOSS CENTRE FOR BIOLOGICAL SIGNALLING STUDIES**  
**Laboratory of Quantitative Single Molecule Imaging**  
*Intern*  
18.01.2018– 18.01.2019

## **6. Bibliography**

- Bidlack, J.M., and Abraham, M.K. (2001). Mitogen-induced activation of mouse T cells increases kappa opioid receptor expression. *Adv Exp Med Biol* 493, 103-110.
- Borner, C., Lanciotti, S., Koch, T., Holtt, V., and Kraus, J. (2013). mu opioid receptor agonist-selective regulation of interleukin-4 in T lymphocytes. *J Neuroimmunol* 263, 35-42.
- Campana, G., Sarti, D., Spampinato, S., and Raffaelli, W. (2010). Long-term intrathecal morphine and bupivacaine upregulate MOR gene expression in lymphocytes. *Int Immunopharmacol* 10, 1149-1152.
- Farhud, D.D. (2014). Appraisal the Output of "Iranian J Publ Health" in 2013. *Iran J Public Health* 43, i-v.
- Garzon, J., Juarros, J.L., Castro, M.A., and Sanchez-Blazquez, P. (1995). Antibodies to the cloned mu-opioid receptor detect various molecular weight forms in areas of mouse brain. *Mol Pharmacol* 47, 738-744.
- Gaveriaux-Ruff, C., Simonin, F., Filliol, D., and Kieffer, B. (2004). Antibody response and allogeneic mixed lymphocyte reaction in mu-, delta-, and kappa-opioid receptor knockout mice. *J Neuroimmunol* 147, 121-122.
- Goodman, A. (1990). Addiction: definition and implications. *Br J Addict* 85, 1403-1408.
- Huang, P., Chen, C., and Liu-Chen, L.Y. (2015b). Detection of mu opioid receptor (MOPR) and its glycosylation in rat and mouse brains by western blot with anti-muC, an affinity-purified polyclonal anti-MOPR antibody. *Methods Mol Biol* 1230, 141-154.
- Ignatowski, T.A., and Bidlack, J.M. (1998). Changes in kappa opioid receptor expression during maturation of mouse lymphocytes. *Adv Exp Med Biol* 437, 117-124.

- Karaji, A.G., Reiss, D., Matifas, A., Kieffer, B.L., and Gaveriaux-Ruff, C. (2011). Influence of endogenous opioid systems on T lymphocytes as assessed by the knockout of mu, delta and kappa opioid receptors. *J Neuroimmune Pharmacol* 6, 608-616.
- Kasai, R.S., Suzuki, K.G., Prossnitz, E.R., Koyama-Honda, I., Nakada, C., Fujiwara, T.K., and Kusumi, A. (2011). Full characterization of GPCR monomer-dimer dynamic equilibrium by single molecule imaging. *J Cell Biol* 192, 463-480.
- Kowalski, J. (1998). Immunomodulatory action of class mu-, delta- and kappa-opioid receptor agonists in mice. *Neuropeptides* 32, 301-306.
- Leskela, T.T., Markkanen, P.M., Alahuhta, I.A., Tuusa, J.T., and Petaja-Repo, U.E. (2009). Phe27Cys polymorphism alters the maturation and subcellular localization of the human delta opioid receptor. *Traffic* 10, 116-129
- Li, Y., Reddy, M.A., Miao, F., Shanmugam, N., Yee, J.K., Hawkins, D., Ren, B., and Natarajan, R. (2008). Role of the histone H3 lysine 4 methyltransferase, SET7/9, in the regulation of NF-kappaB-dependent inflammatory genes. Relevance to diabetes and inflammation. *J Biol Chem* 283, 26771-26781.
- Liu, H., Li, H., Guo, L., Li, M., Li, C., Wang, S., Jiang, W., Liu, X., McNutt, M.A., and Li, G. (2010). Mechanisms involved in phosphatidylinositol 3-kinase pathway mediated up-regulation of the mu opioid receptor in lymphocytes. *Biochem Pharmacol* 79, 516-523.
- Madden, J.J., Donahoe, R.M., Zwemer-Collins, J., Shafer, D.A., and Falek, A. (1987). Binding of naloxone to human T lymphocytes. *Biochem Pharmacol* 36, 4103-4109.
- Macht, D.I. (1915). The history of opium and some of its preparations and alkaloids. *Journal of the American Medical Association* LXIV.
- Martin, J.L., Koodie, L., Krishnan, A.G., Charboneau, R., Barke, R.A., and Roy, S. (2010). Chronic morphine administration delays wound healing by inhibiting immune cell recruitment to the wound site. *Am J Pathol* 176, 786-799.

- Mehrishi, J.N., and Mills, I.H. (1983). Opiate receptors on lymphocytes and platelets in man. *Clin Immunol Immunopathol* 27, 240-249.
- Mellon, R.D., and Bayer, B.M. (1998). Evidence for central opioid receptors in the immunomodulatory effects of morphine: review of potential mechanism(s) of action. *J Neuroimmunol* 83, 19-28.
- Meral, D., Provasi, D., Prada-Gracia, D., Moller, J., Marino, K., Lohse, M.J., and Filizola, M. (2018). Molecular details of dimerization kinetics reveal negligible populations of transient micro-opioid receptor homodimers at physiological concentrations. *Sci Rep* 8, 7705.
- Miller, B. (1996). delta opioid receptor expression is induced by concanavalin A in CD4+ T cells. *J Immunol* 157, 5324-5328.
- Miller, B.C. (1998). Western blot analysis of the delta (delta)-opioid receptor in activated murine T cells. *Adv Exp Med Biol* 437, 159-167.
- Ninkovic, J., and Roy, S. (2013). Role of the mu-opioid receptor in opioid modulation of immune function. *Amino Acids* 45, 9-24.
- Petaja-Repo, U.E., Hogue, M., Laperriere, A., Bhalla, S., Walker, P., and Bouvier, M. (2001). Newly synthesized human delta opioid receptors retained in the endoplasmic reticulum are retrotranslocated to the cytosol, deglycosylated, ubiquitinated, and degraded by the proteasome. *J Biol Chem* 276, 4416-4423
- Roy, S., Balasubramanian, S., Sumandee, S., Charboneau, R., Wang, J., Melnyk, D., Beilman, G.J., Vatassery, R., and Barke, R.A. (2001). Morphine directs T cells toward T(H2) differentiation. *Surgery* 130, 304-309.
- Sarabipour, S., and Hristova, K. (2016). Effect of the achondroplasia mutation on FGFR3 dimerization and FGFR3 structural response to fgf1 and fgf2: A quantitative FRET study in osmotically derived plasma membrane vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1858, 1436-1442.

- Shahkarami, K., Vousooghi, N., Golab, F., Mohsenzadeh, A., Baharvand, P., Sadat-Shirazi, M.S., Babhadi-Ashar, N., Shakeri, A., and Zarrindast, M.R. (2019). Evaluation of dynorphin and kappa-opioid receptor level in the human blood lymphocytes and plasma: Possible role as a biomarker in severe opioid use disorder. *Drug Alcohol Depend* 205, 107638.
- Sharp, B.M. (2006). Multiple opioid receptors on immune cells modulate intracellular signaling. *Brain Behav Immun* 20, 9-14.
- Sharp, B.M., Shahabi, N., McKean, D., Li, M.D., and McAllen, K. (1997). Detection of basal levels and induction of delta opioid receptor mRNA in murine splenocytes. *J Neuroimmunol* 78, 198-202.
- Tolstorukov, M.Y., Goldman, J.A., Gilbert, C., Ogryzko, V., Kingston, R.E., and Park, P.J. (2012). Histone variant H2A.Bbd is associated with active transcription and mRNA processing in human cells. *Mol Cell* 47, 596-607.
- Toskulkao, T., Pornchai, R., Akkarapatumwong, V., Vatanatunyakum, S., and Govitrapong, P. (2010). Alteration of lymphocyte opioid receptors in methadone maintenance subjects. *Neurochem Int* 56, 285-290.
- Tsujikawa, H., Shoda, T., Mizota, T., and Fukuda, K. (2009). Morphine induces DNA damage and P53 activation in CD3+ T cells. *Biochim Biophys Acta* 1790, 793-799.
- Wang, J., Charboneau, R., Balasubramanian, S., Barke, R.A., Loh, H.H., and Roy, S. (2002). The immunosuppressive effects of chronic morphine treatment are partially dependent on corticosterone and mediated by the mu-opioid receptor. *J Leukoc Biol* 71, 782-790.

