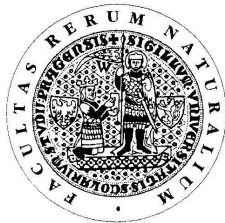


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
Přírodovědecká fakulta

---

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Martin Valný

Molekulární fyziologie opioidních receptorů

Molecular physiology of opioid receptors

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Jiří Novotný, DSc.

Praha 2011

## ***Prohlášení***

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

*Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.*

*V Praze dne 30. 5. 2011*

## ***Poděkování***

*Rád bych poděkoval svému školiteli RNDr. Jiřímu Novotnému, DSc. Za jeho pomoc při sepisování této práce. Dále bych chtěl poděkovat své rodině a přátelům za podporu a mnoho cenných rad.*

## Obsah

1	Úvod.....	12
2	Rozdělení OR.....	13
2.1	μ opioidní receptory .....	13
2.2	δ opioidní receptory .....	13
2.3	κ opioidní receptory .....	14
2.4	ORL 1.....	14
3	Exprese.....	15
4	Ligandy .....	16
4.1	Agonisté .....	16
4.2	Antagonisté .....	17
4.3	Bioaktivní konformace ligandů.....	17
5	Struktura a funkce .....	19
5.1	Vazba ligandů .....	20
5.2	Aktivace G proteinů .....	22
5.3	Konstitutivní aktivita.....	23
6	Signalizace .....	24
6.1	G proteiny zprostředkovaná regulace aktivity AC.....	25
6.2	G proteiny zprostředkovaná regulace iontových kanálů .....	26
6.3	G proteiny aktivované signální dráhy MAPK.....	26
6.4	β-arrestinem aktivované signální dráhy MAPK.....	27
6.5	G proteiny aktivovaná signální dráha PLC .....	27
6.6	Kalmodulinové signální dráhy .....	27
7	Oligomerizace OR.....	29
8	Regulace signalizace .....	30

8.1	Regulátory signalizace G proteinů (RGS).....	30
8.2	Desenzitizace .....	30
8.3	Internalizace .....	31
8.4	Osud OR po internalizaci .....	32
9	Tolerance a závislost.....	35
9.1	Role OR při vzniku tolerance.....	35
9.2	Adaptační změny v signalizaci OR vedoucí k závislosti .....	37
10	Závěr .....	39
11	Literatura.....	40

## Abstrakt

Opioidní receptory (OR) patří mezi receptory spřažené s G proteiny (GPCR). Prostřednictvím především inhibičních G proteinů třídy  $G_i/G_o$  regulují účinky opioidních agonistů vedoucí primárně ke snížení neuroexcitability. Klonováním byla potvrzena existence čtyř podtypů opioidních receptorů  $\mu$ ,  $\kappa$ ,  $\delta$  a ORL 1, z nichž každý reguluje účinky určité skupiny opioidních ligandů. Hlavním cílem této práce je shrnutí poznatků objasňujících funkce OR na molekulární úrovni. Akutní expozice OR jejich agonistům vede k aktivaci signalizačních kaskád vyvolávajících analgesii. Chronická expozice OR opioidním agonistům ovšem vede k desenzitizaci a internalizaci receptorů a k vývoji adaptačních procesů vedoucích k potlačení opioidní akce, což vede ke vzniku opioidní tolerance a závislosti. Ačkoliv v poznání molekulárních mechanismů signalizace OR byl učiněn velký pokrok, k jejich úplnému pochopení je stále velmi daleko.

**Klíčová slova:** Opioidní receptory, opioidy, signalizace, tolerance, závislost, GPCR, struktura, funkce

## Abstract

The opioid receptors (OR) belong to the family of G protein-coupled receptors (GPCRs). ORs mediate the effects of the opioids, leading primarily to inhibition of neuroexcitability, predominantly through the class of the inhibitory G proteins  $G_i/G_o$ . Cloning of ORs confirmed the existence of four subtypes of ORs, which mediate effects of different classes of opioid ligands. The major aim of this work is to summarize the current knowledge about characteristics and function of ORs at the molecular level. Acute exposition of ORs to their agonists results in activation of the signaling cascades that trigger mechanisms leading to analgesia. Chronic exposition of ORs to their agonists leads to desensitization and internalization of the receptors and induces adaptive changes in signal transduction system that suppresses the opioid action, and may result in the development of opioid tolerance and dependence. Although a big progress has been made in the field of understanding the molecular

mechanisms of the OR-mediated signaling, there are still a lot of unresolved questions that are necessary to answer.

**Key words:** Opioid receptors, opioids, signaling, tolerance, dependence, GPCR, structure, function

## Seznam použitých zkratek

6'-GNTI	6'-guanidinonaltrindol
AC	Adenylát cykláza
Ala	Alanin
AP-2	Adaptační proteiny
Arg	Arginin
Asn	Asparágin
CaM	Calmodulin, kalmodulín
CaMK	Ca <sup>2+</sup> /kalmodulín-závislá kináza
cAMP	Cyklický adenosin monofosfát
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid, komplementární deoxyribonukleová kyselina
CREB	cAMP response element-binding protein
CTOP	D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Pen-Thr
CTOP	D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Pen-Thr-NH <sub>2</sub>
D	Aspartát
DADLE	[D-Ala(2), D-Leu(5)]-enkefalin
DAG	Diacylglycerol
DALCE	[D-Ala(2), Leu(5), Cys(6)]-enkefalin
DALDA	Tyr-D-Arg-Phe-Lys-NH <sub>2</sub>
DAMGO	[D-Ala(2), N-MePhe(4), Gly-ol]-enkefalin
DPDPE	[D-Pen(2),D-Pen(5)]-enkefalin
DSLET	[D-Ser(2), Leu(5), Thr(6)]-enkefalin
E	Glutamát
EGF	Epidermal growth factor, epidermální růstový faktor
ERK	Extracellular signal-regulated kinases, extracelulárními signály regulované kinázy
GAP	GTPase accelerator proteins, GTPázu aktivující proteiny
GASP	GPCR-associated sorting protein
GDP	Guanosindifosfát



GIRK	G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channel, s G proteiny spřažené dovnitř usměřující draslíkové kanály
Gln	Glutamin
Glu	Glutamát
Gly	Glycin
GPCR	G protein-coupled receptors, receptory spřažené s G proteiny
GRK	G protein-coupled receptors kinases, kinázy receptorů spřažených s G proteiny
GTP	Guanosintrifosát
HCN	Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels, hyperpolarizací aktivované kanály závislé na cyklických nukleotidech
HEK-293	Human embryonal kidney cells 293, lidské embryonální ledvinové buňky 293
ICL	intracellular loop, intracelulární smyčka
Ile	Isoleucin
IP3	inositoltrifosfát
JNK	c-Jun N-terminální kinázy
Leu	Leucin
Lys	Lysin
MAPK	Mitogen-activated protein kinases, mitogenem aktivované proteinkinázy
Met	Methionin
MMP	Matrixové metaloproteázy
mRNA	Mediátorová ribonukleová kyselina
N- Ca <sup>2+</sup> kanály	N-typ napětově závislých Ca <sup>2+</sup> kanálů
N/OFQ	Nociceptin/orfanin FQ
NalBzoH	Naloxon benzoylhydrazon
NK1	Neurokinin 1 receptor
Nor-BNI	Nor-Binaltorfimin
OP	Opioidní peptidy
OR	Opioidní receptory

Orn	Ornitin
P- Ca <sup>2+</sup> kanály	P-typ napětově závislých Ca <sup>2+</sup> kanálů
Pen	Penicilamin
Phe	Fenylalanin
PI3K	Fosfatidylinositol-3-kinázy
PKA	Proteinkináza A
PKC	Proteinkináza C
PLC	Fosfolipáza C
PLD 2	Fosfolipáza D2
PTX	Pertussis toxin, toxin černého kašle
Q- Ca <sup>2+</sup> kanály	Q-typ napětově závislých Ca <sup>2+</sup> kanálů
R	Arginin
RGS	Regulators of G protein signaling, regulátory signalizace G proteinů
RTK	Receptor tyrosine kinases, receptory s tyrozin kinázovou aktivitou
Ser	Serin
SKF-10047	N-allylnormetazocin
SNC 80	4-[(R)-[(2S,5R)-4-allyl-2,5-dimethylpiperazin-1-yl](3-methoxyphenyl)methyl]-N,N-diethylbenzamid
STAT5 A	Signal transducer and activator of transcription 5A, signální přenašeč a aktivátor transkripce 5A
STAT5 B	Signal transducer and activator of transcription 5A, signální přenašeč a aktivátor transkripce 5B
Thr	Threonin
Tic	Kyselina 1,2,3,4-tetrahydroisochinolin-3-karboxylová
TIPP	Tyr-Tic-Phe-Phe
TMH	Transmembránový helix
TRP	<i>Transient receptor potential</i> kanály
Trp	Tryptofan
Tyr	Tyrosin

U-50,488	2-(3,4-dichlorophenyl)-N-methyl-N-[(2R)-2-pyrrolidin-1- lcyclohexyl]acetamin
U-69,593	N-methyl-2-phenyl-N-[(5R,7S,8S)-7-(pyrrolidin-1-yl)-1- oxaspiro[4.5]dec-8-yl]acetamid
Val	Valin

## 1 Úvod

OR patří do skupiny A receptorů spřažených s G proteiny (GPCR), se vyskytují zejména v CNS a v menší míře i v PNS savců. Jejich hlavní fyziologická funkce spočívá v modulaci účinků některých neurotransmiterů a hormonů vedoucí zejména k inhibici neuroexcitability a k uvolňování neurotransmiterů. OR mohou být aktivovány endogenními i exogenně podávanými opioidy, jejichž klasickým zástupcem je morfin<sup>1,2</sup>. Od roku 1973, kdy byla prokázána existence vazebných míst pro opioidy v nervové tkáni savců<sup>3,4</sup>, byla na základě farmakologických testů popsána řada typů opioidních receptorů. Skupiny  $\mu$ ,  $\kappa$  a  $\sigma$  OR byly navrženy Martinem a spol. na základě různých účinků modelových agonistů morfinu ( $\mu$ ), ketocyklazocinu ( $\kappa$ ) a SKF-10047 ( $\sigma$ )<sup>5</sup>.  $\delta$  OR mají vysokou afinitu pro enkefaliny<sup>2</sup>. Mezi OR patří i tzv. ORL 1 (opioid receptor-like) receptory s vysokým stupněm podobnosti k dříve objeveným OR, avšak s nízkou afinitou pro do té doby známé opioidy<sup>6</sup>. Jak se později ukázalo,  $\sigma$  receptory strukturálně neodpovídají GPCR, a přestože ovlivňují účinky opioidů, nejsou za OR považovány<sup>7,8</sup>. V literatuře je možné najít zmínky i o dalších typech OR ( $\lambda$ ,  $\zeta$ ,  $\epsilon$ ). Nicméně, poněvadž jsou tyto receptory jen málo prostudovány a na rozdíl od výše zmíněných typů receptorů není jejich existence potvrzena identifikací jim příslušných genů, nebudu se jimi v této práci zabývat<sup>9</sup>.

## 2 Rozdělení OR

### 2.1 $\mu$ opioidní receptory

Dříve než byla existence  $\mu$  receptorů prokázána klonováním příslušných genů z několika savčích druhů<sup>10-13</sup>, byly na základě vazebných pokusů navrženy dva podtypy  $\mu$  receptorů,  $\mu_1$  a  $\mu_2$  receptory<sup>14</sup>. Tyto typy se liší v afinitách pro některé ligandy, jakými jsou morfin,  $\beta$ -endorfin či naloxon<sup>15</sup>. Výsledky pokusů s ireverzibilním antagonistou  $\mu_1$  receptorů naloxonazinem ukazují, že farmakologické účinky  $\mu$  selektivních opioidů jako analgesie, uvolnění prolaktinu či acetylcholinový obrat jsou zprostředkovány  $\mu_1$  receptory, zatímco útlum dýchání či bradykardie jsou modulovány typem  $\mu_2$ <sup>16</sup>.

Nedávno byla izolována řada mRNA vzniklých alternativním splicingem genu pro  $\mu$  receptory. Tyto varianty mRNA se liší zejména v sekvencích C-terminálního konce a intracelulárních smyček, jež zajišťují vazbu G proteinů k receptoru. Ačkoliv afinita ligandů k receptorům, která je určena zejména N-terminálním koncem a transmembránovými doménami, zůstává pro různé typy zachována, byly u jednotlivých isoform  $\mu$  receptorů pozorovány rozdíly v účinnosti a efektivitě signálního přenosu. Tyto objevy naznačují, že řízení fyziologické odpovědi vyvolané  $\mu$  citlivými ligandy je značně složitější, než předpokládá podtypová teorie<sup>17,18</sup>.

### 2.2 $\delta$ opioidní receptory

Na základě *in vivo* pokusů potlačení analgesie vyvolané  $\delta$  selektivními ligandy byly definovány dva druhy  $\delta$  receptorů.  $\delta_1$  receptory, s vyšší afinitou pro agonisty DPDPE a DADLE a antagonisty DALCE či 6'-GNTI, primárně ovlivňující opioidní akce v míše a  $\delta_2$  receptory, selektivně vázající agonisty DSLET a [D-Ala(2)]-Deltopfin II a antagonisty Naltrindol a 5'-NTII, ovlivňující opioidní akci zejména v supraspinální oblasti<sup>1,15,19</sup>. Pro existenci  $\delta$  podtypů svědčí i např. fakt, že tolerance navozená podáváním DPDPE se neprojeví po následném podání DSLET, či [D-Ala(2)]-Deltopfinu II<sup>1,20</sup>. Další práce ukazují, že  $\delta_2$  receptory se na rozdíl od  $\delta_1$  receptorů podílejí na vzniku a vývoji morfinové závislosti<sup>21,22</sup>, a že mezi  $\mu$  a  $\delta$  receptory existují funkční souvislosti<sup>19,20</sup>.

cDNA  $\delta$  receptorů byla poprvé klonována roku 1992<sup>23, 24</sup>, nicméně doposud se nepodařilo objevit a klonovat jiné varianty  $\delta$  receptorů, a tudíž důkazy o existenci více druhů  $\delta$  receptorů zůstávají pouze farmakologické<sup>19</sup>.

### 2.3 $\kappa$ opioidní receptory

Typy  $\kappa$  receptorů byly navrhovány na základě vazebných pokusů s neselektivními opioidy při současném zablokování  $\mu$  a  $\delta$  receptorů jim selektivními ligandy<sup>1</sup>. Původně byly rozlišeny dva typy  $\kappa$  receptorů.  $\kappa_1$  receptory mají vysokou afinitu k Dynorfinu A 1-17, U-50,488 a U-69,593 a  $\kappa_2$  receptory, které mají podobnou afinitu pouze k Dynorfinu A 1-17, kdežto afinitu k U-50,488 mají o dva řády nižší a s U-69,593 dokonce neinteragují vůbec<sup>15, 25</sup>.  $\kappa_1$  receptory výlučně zprostředkovávají  $\kappa_1$  selektivními agonisty vyvolanou analgesii s místem účinku v míše. S objevem nového selektivního ligandu NalBzoH byly definovány  $\kappa_3$  receptory necitlivé k U-50,488. Na rozdíl od  $\kappa_1$  receptorů  $\kappa_3$  receptory modulují analgesii vyvolanou  $\kappa_3$  selektivními agonisty v supraspinální oblasti<sup>1, 15</sup>.

Doposud byl klonován pouze jeden druh  $\kappa$  receptorů<sup>26-28</sup>, který svými vlastnostmi nejvíce odpovídá vlastnostem typu  $\kappa_1$ <sup>2</sup>.

### 2.4 ORL 1

Jako poslední byly klonovány ORL 1 receptory nazývané také, podle jejich endogenního ligandu, N/OFQ (nociceptin/orphanin FQ) receptory<sup>6, 29, 30</sup>. Přestože jsou ORL 1 strukturálně i místem účinku značně podobné a spouštějí stejné signální dráhy jako  $\mu$ ,  $\delta$  a  $\kappa$  receptory, jsou v současné době považovány za ne-opioidní větev rodiny OR. Je tomu tak proto, že ORL 1 jsou necitlivé vůči jinak univerzálnímu opioidnímu antagonistovi naloxonu, či kvůli skutečnosti, že jejich agonisté inhibují opioidy vyvolanou analgesii a mohou vyvolat dokonce hyperalgesii<sup>31</sup>.

### 3 Exprese

OR jsou ve velké míře exprimovány v CNS, nicméně hladina exprese se pro jednotlivé podtypy OR liší v závislosti na oblasti CNS (*review*<sup>32, 33</sup>).  $\mu$  a  $\kappa$  receptory jsou v CNS distribuovány relativně rovnoměrně,  $\delta$  receptory nikoliv. Zatímco v mozkové kůře a v hypokampu jsou  $\delta$  receptory exprimovány ve velké míře v porovnání s  $\mu$  a  $\kappa$  receptory, v oblastech mezimozku, jako jsou thalamus či hypothalamus, se naopak  $\delta$  receptory téměř nevyskytují. V oblasti mozkového kmene, mozečku a míchy jsou  $\delta$  receptory až na nepatrné výjimky exprimovány ve výrazně nižší míře než  $\mu$  a  $\kappa$  receptory. OR jsou exprimovány rovněž v PNS. Jejich výskyt v PNS je nejvíce zkoumán v míšních gangliích, kde se podílejí na antinocicepci a regulaci signálů přicházejících z primárních aferentních nervových drah. V míšních gangliích jsou nejvíce exprimovány  $\mu$  receptory<sup>2</sup>. OR se nenacházejí jen v nervových tkáních. Přítomnost všech podtypů OR byla prokázána také v některých periferních tkáních, jako jsou ledviny, nadledviny či plíce. V dalších orgánech byl registrován výskyt pouze některých podtypů. Pouze  $\delta$  a  $\kappa$  receptory se vyskytují v žaludku a v srdci, naproti tomu pouze výskyt  $\mu$  a  $\delta$  receptorů byl zaznamenán v játrech<sup>34</sup>.

V neuronech se OR nacházejí jak v presynaptických zakončeních, kde primárně inhibují výlev neurotransmiterů, tak v postsynaptických zakončeních, kde způsobují zejména hyperpolarizaci plazmatické membrány. Oba tyto procesy přispívají k inhibici nervového přenosu<sup>35-37</sup>. V řadě nervových buněk byla prokázána ko-exprese více typů OR, především  $\mu$  a  $\delta$  receptorů a  $\mu$  a  $\kappa$  receptorů. Výsledkem ko-exprese OR je zvýšení citlivosti regulace účinků opioidních agonistů<sup>38, 39</sup>. Navíc bylo zjištěno, že zatímco  $\mu$  receptory jsou většinou přítomny na plazmatické membráně neuronů,  $\delta$  a  $\kappa$  receptory nikoliv. Většina nově vzniklých  $\delta$  a  $\kappa$  receptorů je skladována intracelulárně, asociována s membránami sekretorických váčků obsahujících neuropeptidy<sup>40-42</sup>. Translokace intracelulárně skladovaných receptorů do plazmatické membrány je spojena s výlevem neuropeptidů, tedy závislá na stimulaci neuronů. Například v míšních gangliích způsobí bolestivý podnět uvolnění neuropeptidů regulujících bolest a s nimi spřaženou translokaci  $\delta$  receptorů do plazmatické membrány, kde poté zprostředkovávají antinocicepční účinky endogenních opioidů<sup>38, 40</sup>.

## 4 Ligandy

### 4.1 Agonisté

Agonisté jsou obecně látky, které aktivují jim příslušné receptory a vyvolávají tudíž buněčnou odpověď. Agonisticky působící opioidní ligandy lze rozdělit na endogenně produkované a exogenně podávané. Endogenní ligandy jsou z chemického hlediska krátké oligopeptidy produkované CNS a některými žlázami jako jsou hypofýza, či nadledviny. Vznikají-li opioidní peptidy v neuronech CNS jsou využívány jako neuromodulátory. Vznikají-li opioidní peptidy ve žlázách, působí jako hormony. Dále můžeme opioidní peptidy rozdělit na *typické*, mající Tyr-Gly-Gly-Phe aminokyselinovou sekvenci na N-konci, a na *atypické* obsahující zachovaný pouze tyrozinový zbytek. Mezi *typické* opioidní peptidy patří ligandy s různou afinitou pro  $\mu$ ,  $\delta$  a  $\kappa$  receptory enkefaliny, endorfíny, dynorfíny, endomorfíny a ORL1 ligand nociceptin. (Tab. 1) Z *atypických* jsou významné především deltorfíny s vysokou afinitou pro  $\delta$  receptory<sup>43</sup>.

Nejznámějším exogenně podávaným opioidem je přírodní alkaloid opia morfin. Morfin interaguje s  $\mu$ ,  $\delta$  i  $\kappa$  receptory, avšak jeho afinita pro  $\mu$  receptory je značně vyšší než pro zbylé dva typy, díky čemuž se ve farmakologii využívá jako selektivní ligand  $\mu$  receptorů. Bylo dokonce dokázáno, že v nepřítomnosti  $\mu$  receptorů nejsou  $\delta$  a  $\kappa$  receptory schopny modulovat žádné z hlavních biologických účinků morfinu<sup>44</sup>.

Další skupinou exogenních ligandů jsou synteticky vyráběná lineární či cyklická analoga endogenních peptidových ligandů jakými jsou např.: DAMGO a DALDA, vysoce selektivní ligandy pro  $\mu$  receptory. DADLE, DPDPE a DSLET, které jsou selektivními ligandy  $\delta$  receptorů. Syntetické selektivní ligandy  $\kappa$  a ORL1 receptorů bývají zpravidla různě modifikované dynorfíny a nociceptiny, či látky jiných chemických struktur jako jsou U-50,488 a NalBzoH<sup>43, 45</sup>.

Dále můžeme agonisty rozdělit podle efektivity jejich účinku na plné agonisty (DAMGO pro  $\mu$  receptory, DPDPE pro  $\delta$  receptory, U-50,488 pro  $\kappa$  receptory), vyvolávající maximální účinek a na parciální agonisty (morfin pro  $\mu$ ,  $\delta$  i  $\kappa$  receptory), vyvolávající pouze částečný účinek v porovnání s plnými agonisty.



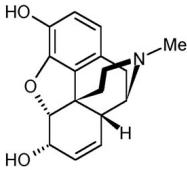
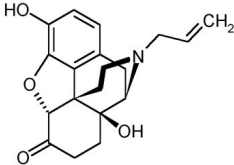
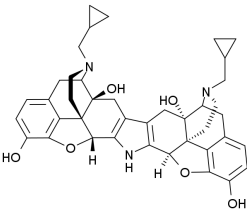
## 4.2 Antagonisté

Antagonisté jsou, na rozdíl od agonistů, látky, které stabilizují jim příslušné receptory v inaktivním stavu, čímž znemožňují vznik buněčné odpovědi. Opioidní antagonisté jsou látky většinou syntetického původu. Jedná se buď o syntetické alkaloidy jako jsou např.: neselektivní naloxon a diprenorfin či  $\delta$  selektivní naltrindol a  $\kappa$  selektivní Nor-BNI, nebo o syntetické peptidy jako  $\mu$  selektivní CTOP či  $\delta$  selektivní TIPP<sup>43</sup>. (Tab. 1)

## 4.3 Bioaktivní konformace ligandů

Bioaktivní konformací rozumíme prostorové uspořádání ligandů při interakci s receptorem. Konformace ligandů morfinového typu je vcelku rigidní a musí tedy představovat i jejich bioaktivní konformaci. V případě peptidických ligandů se jejich prostorové uspořádání může snadno měnit. Za účelem zjištění specifických bioaktivních konformací ligandů vyžadovaných jednotlivými receptory, byla syntetizována řada cyklických peptidů<sup>46</sup>. Většina opioidních peptidů se dá z hlediska struktury rozdělit na dva úseky. Na tzv. N-terminální *message* sekvenci obsahující farmakoforní zbytky tyrozinu a fenylalaninu (v případě endomorfinů tryptofanu) oddělené tzv. *spacerem* (- Gly - Gly -) a na C-terminální *address* sekvenci. Zatímco *message* sekvence je zodpovědná za biologickou aktivitu receptorů, *address* sekvence odpovídá za interakce se specifickými segmenty jednotlivých receptorů a tudíž za selektivitu ligandů<sup>43,47</sup>.

**Tab. 1.** Přehled opioidních peptidů a porovnání jejich afinit k typům opioidních receptorů <sup>43</sup>.

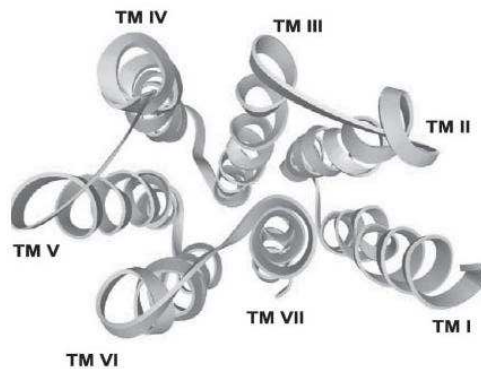
Ligand	Aminokyselinové složení	Afinita k OR
<i>Agonisté</i>		
<b>[Met]enkefalin</b>	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met	δ, μ
<b>[Leu]enkefalin</b>	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu	(δ >> μ)
<b>β-endorphin</b>	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Gln-Thr-Pro-	δ, μ
	Leu-Val-Thr-Leu-Phe-Lys-Asn-Ala-Ile-Ile-Lys-Asn-Ala-Tyr-Lys-Lys-Gly-Glu	(δ = μ)
<b>Dynorfin A</b>	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-ArG ArG Ile-ArG Pro-Lys-Leu-Lys-Trp-Asp-Asn-Gln	κ, μ, δ
<b>Dynorfin B</b>	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-ArG ArG Gln-Phe-Lys-Val-Val-Thr	(κ >> μ, δ)
<b>Endomorfín-1</b>	Tyr-Pro-Trp-Phe-NH <sub>2</sub>	μ
<b>Endomorfín-2</b>	Tyr-Pro-Trp-Phe-NH <sub>2</sub>	μ
<b>Nociceptin</b>	Phe-Gly-Gly-Phe-Thr-Gly-Ala-ArG Lys-Ser-Ala-ArG Lys-Leu-Ala-Asn-Gln	ORL
<b>Morfin</b>		μ, δ, κ
		(μ >> κ, δ)
<i>Antagonisté</i>		
<b>Naloxon</b>		μ, δ, κ
<b>TIPP</b>	Tyr-Tic-Phe-Phe	δ
<b>CTOP</b>	D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Pen-Thr	μ
<b>Nor-BNI</b>		κ

Pro více informací: <http://www.opioid.umn.edu/>

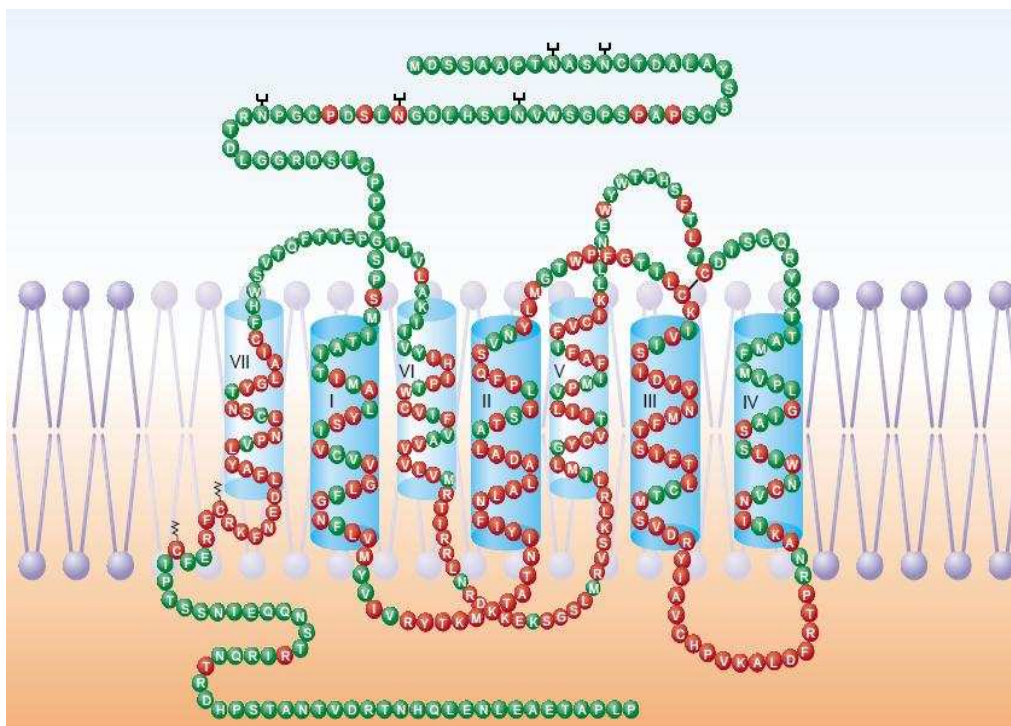
## 5 Struktura a funkce

Vzhledem k absenci experimentálně získané krystalické formy OR je hlavním klíčem k objasnění jejich struktury teoretické modelování na základě struktur rhodopsinu a  $\beta_2$ -adrenergního receptoru<sup>48, 49</sup>. Stejně jako ostatní členové skupiny A (rhodopsinu podobných) GPCR, tvoří OR sedm transmembránových helikálních domén (TMH) spojených třemi intracelulárními a třemi extracelulárními smyčkami, N-terminální extracelulární doménu a C-terminální intracelulární doménu, která pravděpodobně může tvořit čtvrtou intracelulární smyčku po navázání kyseliny palmitové na některý cysteinový zbytek C-konce a následné inkorporaci její nepolární části do membrány<sup>50</sup>. Transmembránové domény jsou při pohledu z extracelulárního prostoru orientovány proti směru hodinových ručiček a tvoří *utažený* spirálovitý útvar. (Obr. 1)

OR jsou tvořeny 370-400 aminokyselinami, přičemž jsou zhruba z 60 % identické. Nejvyšší stupeň podobnosti pak vykazují v sekvencích TMH, zatímco nejméně podobné si jsou v N- a C-terminálních oblastech a v sekvencích extracelulárních smyček. Všechny čtyři typy OR obsahují cysteinový zbytek ve druhé extracelulární smyčce, který pravděpodobně tvoří spolu s cysteinovým zbytkem v TMH III disulfidový můstek. Dále mohou být OR modifikovány glykosylací přes asparaginové zbytky nacházející se v extracelulární oblasti<sup>12, 24, 28</sup>. (Obr. 2)



**Obr. 1** Uspořádání TMH OR nahlíženo z extracelulárního prostoru. Sedm TMH je uspořádáno proti směru hodinových ručiček. Každý helix je označen římskou číslicí<sup>9</sup>.



**Obr. 2** 3D schematické znázornění struktury lidského  $\mu$  receptoru. Červeně jsou vyznačeny aminokyselinové zbytky shodné pro lidské  $\mu$ ,  $\delta$  i  $\kappa$  receptory. TMH jsou číslovány římskými číslicemi. Vrchní část obrázku představuje extracelulární prostor, spodní část představuje prostor intracelulární. Symbolem  $\cup$  jsou na extracelulárním N-konci  $\mu$  receptoru vyznačena možná glykosylační místa. Na intracelulárním C-konci za TMH VII jsou naznačeny potenciální místa interakce receptoru s kyselinou palmitovou, jež může mít za následek vznik čtvrté intracelulární smyčky. Mezi extracelulární smyčkou 2 a TMH III je naznačena disulfidová vazba mezi cysteinovými zbytky<sup>51</sup>.

## 5.1 Vazba ligandů

Z poznatků získaných z mutačních analýz a z počítačového modelování vyplývá, že vazebné místo pro opioidní ligandy se nachází mezi TMH III-VII, tvoří dutinu a zčásti je zakryto extracelulárními smyčkami, zvláště pak druhou extracelulární smyčkou tvořící vlásenkovitý útvar spojující TMH IV a V<sup>52-54</sup>. Vnitřní část vazebného místa obsahuje několik aminokyselinových zbytků z TMH III-VII, stejných pro všechny typy OR, které zprostředkovávají interakci s farmakofory *message* sekvence opioidních ligandů. Vnější část vazebného místa, která sestává z některých

aminokyselin TMH V-VII a z extracelulárních smyček, interaguje s *address* sekvencí ligandů a zodpovídá tudíž za selektivitu receptorů.

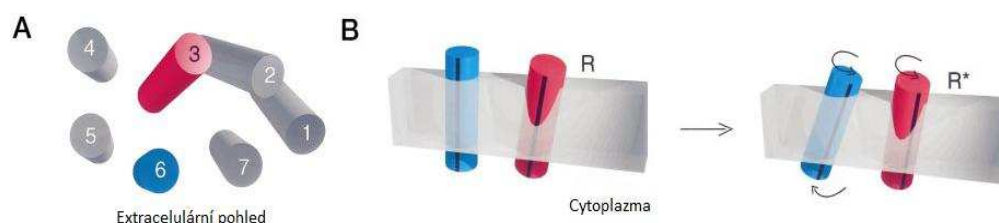
Objemné ligandy (Nor-BNi, DPDPE) vyplňují téměř celý vazebný prostor a interagují jak s vnitřními tak s vnějšími sekvencemi aminokyselin. Naproti tomu menší ligandy (morfin) interagují především s vnitřní částí vazebného místa, která leží na dně vazebné dutiny. Navíc antagonisté se váží hlouběji než agonisté. Inkorporací své většinou objemnější N-skupiny mezi TMH III a VI brání vzájemnému posunu těchto helixů, který probíhá při aktivaci OR<sup>52,53</sup>.

Mezi strukturou vazebných míst jednotlivých typů OR existují rozdíly. Tyto rozdíly jsou zapříčiněny různou velikostí, polaritou a nábojem aminokyselinových zbytků vnější části TMH V a VI a extracelulárních smyček 1 a 2. Nejvyšší stupeň odlišnosti vykazují  $\kappa$  receptory, které mají druhou extracelulární smyčku delší o tři aminokyseliny. To má za následek zmenšení prostoru ve vazebné dutině.  $\kappa$  receptory rovněž obsahují několik záporně nabitých aminokyselinových zbytků ve druhé a třetí extracelulární smyčce, které ohraničují vazebnou dutinu, což má pravděpodobně za následek přednostní interakci s kladně nabitými  $\kappa$  selektivními ligandy<sup>47</sup>.

V inaktivním stavu jsou OR stabilizovány řadou hydrofobních a hydrofilních interakcí mezi aminokyselinovými zbytky TMH. Po navázání agonisty dochází k přerušení starých a vzniku nových intramolekulárních vazeb a k reorientaci některých aminokyselinových zbytků. Tyto změny mají za následek posun a rotaci TMH vůči sobě navzájem. Nejmarkantnější změnu pozice, ovlivňující následnou aktivaci G proteinů, vykazují TMH III a VI. Předpokládá se, že v inaktivním stavu jsou k sobě oba helixy poutány iontovou vazbou mezi argininem, nacházejícím se ve vysoce zachovávaném tzv. D/ERY (Asp/Glu-Arg Tyr) motivu na intracelulárním konci TMH III, a záporně nabitým aminokyselinovým zbytkem nacházejícím se v ICL 3 blízko TMH VI. (Obr. 2) Pro tuto vazbu je důležitá stabilizace další iontovou vazbou mezi argininem a sousedním glutamátem, čímž vzniká tzv. *Argininová klec*.

Po navázání agonisty dochází vlivem jeho kladně nabitě aminoskupiny k neutralizaci glutamátu, což vede k reorientaci argininu a tudíž k přerušení vazby mezi TMH III a VI<sup>55</sup>. To vede k pootočení obou helixů proti směru hodinových ručiček (nahlíženo z extracelulární strany) a navíc dochází k posunu intracelulárního konce TMH VI od TMH III<sup>47, 53, 56</sup>. (obr. 3) Oddálením TMH VI od TMH III a s ním

spojené oddálení ICL 2 od ICL 3, způsobí uvolnění vazebného místa pro G proteiny. Za selektivitu vůči  $\alpha$  podjednotkám G proteinů odpovídá N- a C-terminální část a ICL 3, zatímco ICL 2 odpovídá za efektivitu aktivace.<sup>57, 58</sup>



**Obr. 3** A) Uspořádání TMH typického GPCR nahlíženo z extracelulárního prostoru. B) Předpokládané konformační změny TMH III a VI po navázání agonisty<sup>56</sup>

## 5.2 Aktivace G proteinů

Nedávné studie ukazují, že konformační změny receptorů probíhající po navázání ligandů jsou ligand-specifické. To znamená, že každý ligand stabilizuje GPCR v jiné aktivní konformaci (existuje více aktivních stavů)<sup>59, 60</sup>.

OR tvoří makromolekulární komplexy obsahující samotné receptory, podjednotky ( $\alpha\beta\gamma$ ) příslušných G proteinů a regulační proteiny. Tyto komplexy nevznikají na plazmatické membráně, nýbrž v endoplazmatickém retikulu, Golgiho aparátu a v cytosolu při transportu komplexů k plazmatické membráně. Na složení komplexů se výrazně podílí hladina exprese interagujících proteinů a přítomnost chaperonů a lešeňových proteinů. Tyto vlastnosti jsou ovšem specifické pro jednotlivé druhy buněk. Proto stejný receptor může být v různých buňkách součástí velice odlišných komplexů, což vede k velké funkční rozmanitosti<sup>61-63</sup>. Po zabudování receptorů do membrány zůstávají tyto komplexy zachovány.

Dojde-li tedy k ligandem vyvolané specifické změně konformace receptoru, musí se nutně změnit i konformace s ním asociovaných signálních molekul. Právě jedinečnost těchto strukturálních změn příslušících jednotlivým ligandům má za následek přednostní aktivaci jednoho typu G proteinu, zatímco ostatní typy jsou stejným ligandem aktivovány méně často. Tento jev byl nazván funkční selektivitou

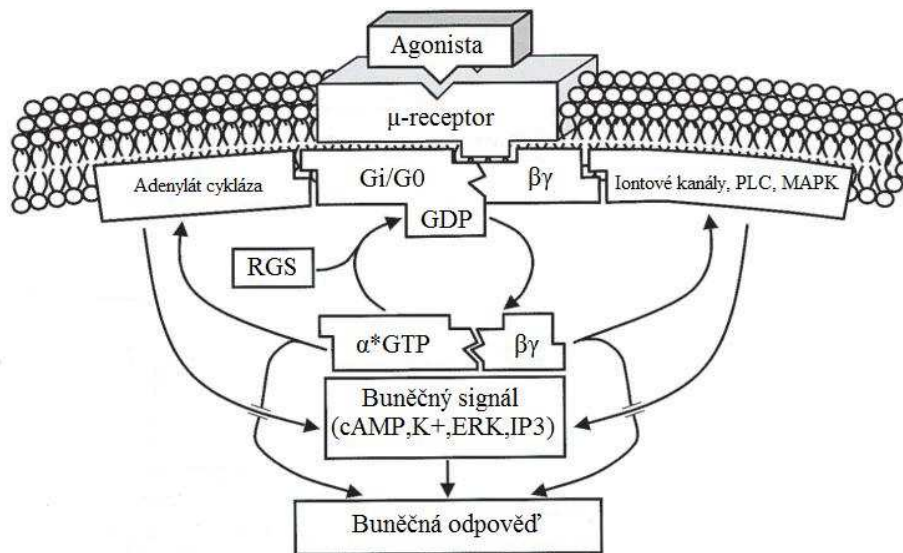
ligandů. Schopnost aktivovat současně různé typy G proteinů s různou efektivitou, závislou na typu ligandu, se nazývá *pleiotropismus* <sup>64</sup>.

### 5.3 Konstitutivní aktivita

OR stejně jako řada jiných GPCR jsou schopny v jisté míře aktivovat G proteiny a tudíž být signalizačně aktivní i v nepřítomnosti agonistů. Tento jev byl nazván konstitutivní (bazální) aktivitou receptorů <sup>65</sup>. Konstitutivní aktivita byla dokázána pro  $\mu$ ,  $\delta$  i  $\kappa$  receptory. Konstitutivní aktivita může být ovlivněna zejména mutacemi v D/ERY oblasti, která hraje klíčovou roli při udržování inaktivního stavu receptorů <sup>55</sup>. Další činitel figurující v regulaci konstitutivní aktivity je protein kalmoduín, který se váže na ICL 3 OR a inhibuje tak bazální interakce G proteinů s receptory, čímž znemožňuje jejich aktivaci. Bylo zjištěno, že po dlouhodobém vystavení  $\mu$  receptorů morfinu, dochází ke zvýšení konstitutivní aktivity receptorů v důsledku disociace kalmodulínu <sup>66</sup>.

## 6 Signalizace

Signální kaskády bývají v případě OR nejčastěji regulovány *pertusis toxin* (PTX) sensitivními inhibičními G proteiny skupiny  $G_i/G_o$ . Výsledkem činností  $\alpha$  podjednotek a  $\beta\gamma$  komplexů těchto G proteinů jsou inhibice aktivity adenylátcyklázy (AC) a napěťově ovládaných  $Ca^{2+}$  kanálů, stimulace G proteiny ovládaných dovnitř usměrňujících  $K^+$  kanálů (GIRK), zvýšení intracelulární hladiny  $Ca^{2+}$ , aktivace mitogenem aktivovaných protein kináz (MAPK) a aktivace signální dráhy fosfolipázy C (PLC) <sup>67, 68</sup>. (Obr. 4)



**Obr. 4** Schematické zobrazení signalizace  $\mu$  receptoru aktivovaného agonistou. Aktivace receptoru katalyzuje disociaci G proteinu na  $\alpha$  podjednotku s vázaným GTP a komplex podjednotek  $\beta\gamma$ . Tyto pak regulují aktivitu řady efektorů (AC, MAPK, PLC, iontové kanály), z nichž některé katalyzují tvorbu signálních molekul (cAMP, IP<sub>3</sub>) vyvolávajících buněčnou odpověď <sup>69</sup>.

OR interagují nejen s G proteiny, ale i s jinými signálními molekulami jakými jsou kalmodulín (CaM) <sup>70</sup> či aktivátory transkripce STAT5 A a B <sup>71</sup>. CaM je vázán na stejné vazebné místo jako G proteiny. Po aktivaci receptorů je vytěsněn kompetujícími G proteiny a aktivuje signalizační kaskády, které budou popsány níže.



STAT5 A a B jsou po aktivaci receptorů fosforylovány, dimerizují a jsou transportovány do jádra, kde zprostředkují transkripci příslušných genů.

### 6.1 G proteiny zprostředkovaná regulace aktivity AC

AC katalyzují vznik cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP). Význam tohoto druhého posla při regulaci neuroexcitability spočívá zejména v aktivaci proteinkinázy A (PKA), která stimuluje výlev neurotransmiterů na nervových zakončeních<sup>67</sup>. Inhibicí AC tedy OR zprostředkovaně inhibují aktivitu PKA a následný výlev neurotransmiterů, což přispívá ke snížení neuroexcitability. Intracelulární cAMP také reguluje napěťově ovládané, neselektivní, kationtové kanály (HCN), které jsou aktivovány při hyperpolarizaci buněk. Otevření těchto kanálů způsobí vtok kationů do buněk, což vede k depolarizaci směřující k ustanovení klidového membránového potenciálu. Pokles intracelulární hladiny cAMP způsobí posun hodnoty potenciálu, při které dochází k aktivaci HCN do zápornějších hodnot, čímž dochází ke stabilizaci hyperpolarizovaného stavu<sup>67</sup>.

Jak bylo popsáno výše inhibice AC je zprostředkována především skupinou inhibičních  $G_i/G_o$  proteinů. Savčí AC se vyskytuje nejméně v devíti isoformách, z nichž každá je specificky regulována<sup>72</sup>. Pouze isoformy V a VI, které jsou exprimovány především v srdci, je možné přímo inhibovat  $G_{i\alpha}$  podjednotkami. Inhibicí isoformy I, vyskytující se zejména v mozku, zprostředkovává  $G_{o\beta\gamma}$  komplex, přičemž  $G_{\alpha o}$  podjednotka tuto inhibici usnadňuje. Ačkoliv OR jsou vnímány především jako inhibiční receptory a neinteragují se stimulačními  $G_s$  proteiny<sup>68</sup>, mohou prostřednictvím  $\beta\gamma$  komplexů umocňovat aktivitu AC typu II, IV a VII, pakliže jsou tyto současně stimulovány  $G_{\alpha s}$  podjednotkami<sup>73</sup>. Účinek  $G_i/G_o$  proteinů je možné potlačit PTX. Bylo dokázáno, že OR interagují i s PTX necitlivými  $G_z$  proteiny, které jsou stejně jako  $G_i/G_o$  schopné inhibovat aktivitu AC<sup>74</sup>.

## 6.2 G proteiny zprostředkovaná regulace iontových kanálů

Ke snížení neuroexcitability prostřednictvím iontových kanálů OR přispívají inhibicí napětově ovládaných  $\text{Ca}^{2+}$  kanálů, což vede k inhibici výlevu neurotransmiterů na nervových zakončeních a aktivací GIRK, které způsobují hyperpolarizaci buňky.  $\mu$ ,  $\delta$  i  $\kappa$  receptory vykazují schopnost prostřednictvím  $G_{\beta\gamma}$  komplexu inhibovat N- a P/Q- $\text{Ca}^{2+}$  kanály, které jsou na presynaptických zakončeních exprimovány v největší míře <sup>75</sup>. Aktivace GIRK probíhá stejně jako inhibice  $\text{Ca}^{2+}$  kanálů prostřednictvím  $G_{\beta\gamma}$  komplexu <sup>76</sup>.

## 6.3 G proteiny aktivované signální dráhy MAPK

Mezi MAPK aktivované OR patří extracelulárními signály regulované proteinkinázy 1 a 2 (ERK 1/2), p38 kinázy a c-Jun N-terminální kinázy (JNK). MAPK se obecně uplatňují jako regulátory buněčné proliferace, diferenciace či apoptózy.

OR regulují aktivitu ERK 1/2 zejména zprostředkovanou aktivací receptorů epidermálního růstového faktoru (EGF), patřících do skupiny receptorů s tyrozin kinázovou aktivitou (RTK). Tato transaktivace není regulována přímo prostřednictvím G proteinů, ale jedná se o komplexní proces, kterého se účastní řada cytosolických signálních molekul. Po aktivaci OR dochází prostřednictvím CaM a fosfolipázy C (PLC) v případě  $\mu$  receptorů, či prostřednictvím  $G_{\beta\gamma}$  komplexu a fosfatidylinositol-3-kinázy (PI3K) v případě  $\kappa$  receptorů k aktivaci různých isoform proteinkinázy C (PKC). PKC následně aktivuje na membránách vázané matrixové metaloproteázy (MMP), které způsobí částečnou proteolýzu endogenních EGF-like ligandů na povrchu buňky. Tyto EGF-like ligandy poté aktivují EGF receptory, které jsou schopné přímo aktivovat ERK 1/2 <sup>77, 78</sup>. V případě  $\mu$  receptorů, na rozdíl od některých jiných typů GPCR <sup>79</sup>, jsou ERK 1/2 aktivované prostřednictvím G proteinů zadržovány v cytoplazmě, kde fosforylují různé cytosolické substráty, jakými jsou např. transkripční faktory CREB <sup>80</sup>, které se podílí na regulaci opioidní tolerance a závislosti <sup>81, 82</sup>.

Při aktivaci JNK prostřednictvím OR hraje primární úlohu opět  $G_{\beta\gamma}$  komplex  $G_i$  proteinů, avšak nedochází k transaktivaci EGF receptorů. Komplex  $G_{\beta\gamma}$  v tomto

případě způsobí aktivaci Src tyrozinových kináz vedoucí k aktivaci JNK. V případě  $\mu$  receptorů je do signalizační kaskády aktivující JNK zapojena i PI3K<sup>83</sup>.

#### 6.4 $\beta$ -arrestinem aktivované signální dráhy MAPK

ERK 1/2 mohou být aktivovány nejen zprostředkovaně G proteiny, ale také interakcí s  $\beta$ -arrestinem po jeho asociaci s OR fosforylovaným kinázami receptorů spřažených s G proteiny (GRK)<sup>84, 85</sup>. Na rozdíl od G proteiny aktivovanými ERK 1/2 jsou  $\beta$ -arrestinem aktivované ERK 1/2 v případě OR transportovány do jádra, kde regulují aktivitu transkripčního faktoru Elk 1 a následnou expresi GRK 2 a  $\beta$ -arrestinu 2<sup>80</sup>.

K aktivaci kinázy p38 dochází na rozdíl od ERK 1/2 pouze prostřednictvím  $\beta$ -arrestinu. Kináza p38 hraje klíčovou roli při poškození buněk a při zánětlivých procesech. Reguluje apoptózu, produkci cytokinů a interleukinů či tvorbu látek uplatňujících se při buněčné chemotaxi<sup>86</sup>.

#### 6.5 G proteiny aktivovaná signální dráha PLC

OR mohou aktivovat PLC prostřednictvím  $G_{\beta\gamma}$  komplexu  $G_i/G_o$  proteinů. PLC katalyzuje štěpení fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu na inositol-1,4,5-trisfosfát (IP3) a diacylglycerol (DAG)<sup>87, 88</sup>. Hlavní účinek IP3 je zvýšení hladiny intracelulárního  $Ca^{2+}$ . IP3 interaguje s IP3 receptory vyskytujícími se převážně na membráně endoplazmatického retikula, jež aktivují  $Ca^{2+}$  kanály. Zvýšení hladiny  $Ca^{2+}$  je tedy způsobeno uvolněním  $Ca^{2+}$  z intracelulárních zásobáren, nikoliv vtokem extracelulárního  $Ca^{2+}$ <sup>89</sup>. Zvýšení intracelulárního  $Ca^{2+}$  vede rovněž k aktivaci  $Ca^{2+}$ /CaM-závislé proteinkinázy (CaMK). Funkce DAG spočívá v aktivaci PKC a TRP  $Ca^{2+}$  kanálů<sup>90</sup>.

#### 6.6 Kalmodulinové signální dráhy

Regulace AC: Některé typy AC mohou být CaM aktivovány, jiné naopak inhibovány<sup>73</sup>. V případě CaM uvolňujícím se při aktivaci OR dochází přednostně k aktivaci AC<sup>91</sup>. Aktivaci zprostředkovává CaMK. Stimulační efekt je ovšem patrný pouze při velmi nízkých koncentracích opioidních agonistů. Při vyšších koncentracích je stimulační efekt CaM zastíněn inhibičním efektem  $G_i/G_o$  proteinů.

Regulace aktivity transkripčního faktoru CREB: Po disociaci CaM od receptorů zřejmě dochází také k jeho difúzi do oblasti buněčného jádra, kde se prostřednictvím CaMK spolupodílí na aktivaci transkripčního faktoru CREB <sup>92</sup>.

## 7 Oligomerizace OR

OR se nevyskytují pouze v monomerní podobě. Bylo dokázáno, že tvoří oligomery, a to především dimery, mezi sebou navzájem nebo i s jinými typy GPCR. Dimerizace neprobíhá na cytoplazmatické membráně, nýbrž v cytosolu. Afinity jednotlivých typů OR k tvorbě dimerů s ostatními podtypy jsou si velmi blízké. Tento fakt je přičítán vysoké aminokyselinové podobnosti (cca 80%) TMH I, IV a V, jež za dimerizaci zodpovídají<sup>93</sup>.

Vznikající heterodimery mají odlišné farmakologické a signální vlastnosti, než monomerní OR. Například  $\mu/\delta$  heterodimery mají sníženou afinitu k exogenním selektivním ligandům (DAMGO, morfin, DADLE, DPDPE), zatímco afinita k endogenním opioidům endomorfínu-1 a Leu-enkefalinu je vyšší než u  $\mu$  a  $\delta$  monomerů<sup>94</sup>. Desenzitizační a internalizační vlastnosti  $\mu/\delta$  heterodimeru jsou také změněny oproti monomerním formám.  $\delta$  selektivní agonista DPDPE selhává ve schopnosti vyvolat desenzitizaci a internalizaci  $\mu/\delta$  heterodimerů, zatímco v přítomnosti  $\mu$  selektivního agonisty DAMGO nastávají oba procesy častěji než v případě  $\mu$  monomerů<sup>94</sup>. Podobné chování bylo pozorováno v případě  $\delta/\kappa$  heterodimerů<sup>51</sup>. Navíc  $\mu/\delta$  heterodimery vykazují PTX necitlivou inhibici AC, což je způsobeno jejich přednostním spřažením s  $\alpha$  podjednotkami  $G_z$  proteinů, které jsou PTX necitlivé<sup>95</sup>. OR tvoří dimery také s GPCR, které se podílejí na nocicepční regulaci a na imunitní odpovědi organismu, jako jsou  $\alpha$ -adrenergní receptory, neurokininové receptory NK1, kanabinoidní receptory a chemokinové receptory<sup>96-99</sup>.

## 8 Regulace signalizace

Signál OR může být regulován buď prostřednictvím proteinů regulujících aktivitu G proteinů, nebo prostřednictvím proteinů způsobujících desenzitizaci, resenzitizaci a internalizaci receptorů.

### 8.1 Regulátory signalizace G proteinů (RGS)

RGS patří do rodiny GTPázu aktivujících proteinů (GAP), které přímo interagují s podjednotkou  $G_\alpha$  s vázaným GTP, čímž stimulují její vlastní GTPázovou aktivitu. RGS tedy regulují délku života signalizačně aktivních komponent G proteinů a tudíž dobu po kterou mohou tyto komponenty aktivovat efektorové molekuly<sup>100</sup>. Existuje přes dvacet isoform savčích RGS, které se svou účinností liší jak mezi jednotlivými typy OR, tak v rámci jednoho typu. Za interakci OR s RGS odpovídá C-terminální konec receptorů<sup>101, 102</sup>. Po aktivaci OR dochází k uvolnění RGS a k jejich interakci s  $G_\alpha$  podjednotkami, což vede ke snížení maximální účinnosti agonistou vyvolané inhibice AC či aktivace MAPK<sup>103</sup>.

### 8.2 Desenzitizace

Desenzitizací OR, rozumíme snížení účinnosti signalizace po dlouhotrvající expozici receptorů jejich agonistům. Prvním krokem při desenzitizaci je fosforylace aktivních OR zprostředkovaná nejčastěji různými typy GRK. GRK fosforylují serinové a threoninové zbytky vyskytující se na ICL 2 a 3 a na C-konci receptorů. Fosforylované OR mají vysokou afinitu k  $\beta$ -arrestinu 1 a 2, které s OR interagují a brání tak opětovnému spřažení s G proteiny, čímž zabrání přenosu signálu z OR na G proteiny<sup>67</sup>.

Fosforylace OR je způsobována zejména isoformami GRK, nicméně i některé další kinázy jako jsou PKC či MAPK mohou aktivované OR fosforylovat<sup>104, 105</sup>. Jak již bylo uvedeno, různé ligandy tvoří s OR strukturálně odlišné komplexy, mezi nimiž dokáží desenzitizační kinázy rozlišovat. Například zatímco desenzitizace vyvolaná plným agonistou  $\mu$  receptorů DAMGO je zprostředkovaná GRK, desenzitizace vyvolaná parciálním agonistou morfinem je zprostředkována PKC<sup>104</sup>. V případě  $\delta$  receptorů bylo pozorováno, že po odstranění některých Ser/Thr zbytků z C-konce

$\delta$  receptorů byl agonista SNC 80 schopen vyvolat fosforylaci, zatímco agonista DPDPE tuto schopnost ztratil, což naznačuje, že funkční komplexy ligand-OR stabilizované různými agonisty jsou fosforylovány na různých místech<sup>106</sup>.

Interakce OR s  $\beta$ -arrestinem je výrazně ovlivněna fosforylací OR. Není tedy překvapivé, že vazebná místa pro  $\beta$ -arrestin 1/2 se nacházejí na ICL 2 a 3 a na C-konci. V případě  $\delta$  receptorů bylo prokázáno, že  $\beta$ -arrestin 1/2 interaguje s ICL 3 a s C-koncem, zatímco  $\kappa$  receptory váží  $\beta$ -arrestin pouze prostřednictvím C-konce<sup>107</sup>. V případě  $\mu$  receptorů bylo dokonce zjištěno, že interagují s  $\beta$ -arrestinem prostřednictvím ICL 2 a C-konce, avšak pouze interakce  $\beta$ -arrestinu s ICL 2 má za následek desenzitizaci receptorů<sup>108</sup>.

Na příkladu  $\mu$  receptorů bylo opět ukázáno, že odlišný ligand vyvolává odlišnou akci. Zatímco agonista DAMGO vyvolává v lidských embryonálních ledvinových buňkách 293 (HEK 293) desenzitizaci v řádu minut, při použití morfinu dochází k desenzitizaci až po zvýšení exprese  $\beta$ -arrestinu, což značí nízkou schopnost komplexu  $\mu$  receptor-morfin vázat  $\beta$ -arrestin v porovnání s komplexem  $\mu$  receptor-DAMGO<sup>109</sup>. Naproti tomu v buňkách AtT-20 vykazuje morfin podobnou schopnost vyvolat desenzitizaci jako agonisté DAMGO či metadon<sup>110</sup>. Pro vyvolání desenzitizace agonisty DAMGO a morfinem je nutná přítomnost  $\beta$ -arrestinu 2, zatímco jiné  $\mu$  ligandy (etorfin, metadon) regulují desenzitizaci prostřednictvím obou isoform<sup>111, 112</sup>.

### 8.3 Internalizace

Internalizace, neboli také endocytóza, je proces regulující aktivitu OR a ostatních GPCR jejich odstraněním z povrchu buněčné membrány. Pro započítí internalizace je nezbytný vznik komplexů agonista-receptor- $\beta$ -arrestin. Tyto komplexy oligomerizují v plazmatické membráně. Následně dochází k adaptiny zprostředkované interakci  $\beta$ -arrestinu s molekulami klathrinu, které vytvoří kolem receptorových komplexů plášť usnadňující endocytózu. Nakonec GTPáza dynamin způsobí odštěpení vzniklých endocytických váček od plazmatické membrány<sup>67, 113</sup>. (Obr. 5)

Pro internalizaci OR není nezbytná jejich fosforylace, což bylo dokázáno pro  $\mu$  a  $\delta$  receptory<sup>114, 115</sup>. Tato skutečnost může být vysvětlena existencí různých vazebných

míst pro  $\beta$ -arrestin, která selektivně odpovídají za desenzitizaci a internalizaci<sup>108</sup>. Pro  $\delta$  receptory bylo rovněž dokázáno, že internalizace závislá na fosforylaci receptorů je zprostředkována  $\beta$ -arrestinem 1, zatímco za internalizaci na fosforylaci nezávislou zodpovídá  $\beta$ -arrestin 2. V případě internalizace závislé na fosforylaci GRK, bylo dokázáno, že GRK, jež aktivují  $\delta$  receptory, s nimi ko-internalizují. V případě  $\mu$  receptorů tento jev nebyl pozorován<sup>116</sup>

Parciální  $\mu$  agonista morfin na rozdíl od plných agonistů DAMGO či etorfinu selhává ve vyvolání internalizace jak v buňkách HEK-293, tak v buňkách AtT-20<sup>109, 110</sup>. To může vést k závěru, že účinnější agonista vyvolává účinnější internalizaci. Nicméně nedávné studie s  $\mu$  agonistou herkinorinem, který je srovnatelně účinný s DAMGO při inhibici AC a při aktivaci ERK 1/2, ukazují, že tomu tak není. Bylo dokázáno, že herkinorin stejně jako morfin selhává ve schopnosti vyvolat interakci  $\mu$  receptorů s  $\beta$ -arrestinem a jejich následnou internalizaci<sup>117</sup>. Tyto výsledky opět svědčí o existenci funkční selektivity opioidních ligandů. Nicméně nedávné studie ukazují, že i morfin je schopen v některých nervových tkáních, konkrétně ve striatických neuronech, vyvolat internalizaci  $\mu$  receptorů, což je pravděpodobně způsobeno odlišnou expresí isoformů  $\beta$ -arrestinu a GRK v těchto tkáních<sup>118</sup>.

Dalším významným regulátorem internalizace  $\mu$  a  $\delta$  receptorů je i fosfolipáza D2 (PLD2). Bylo dokázáno, že opioidní agonisté stimulují aktivitu PLD2, a že aktivita PLD2 usnadňuje vznik endocytických váčků. Navíc PLD2 aktivovaná jiným mechanismem než opioidními agonisty může způsobovat i na agonistech nezávislou internalizaci  $\mu$  a  $\delta$  receptorů<sup>119</sup>. Stejně tak aktivace PKC vyvolaná jinak než opioidními agonisty může vyvolat desenzitizaci a následnou internalizaci OR<sup>120</sup>.

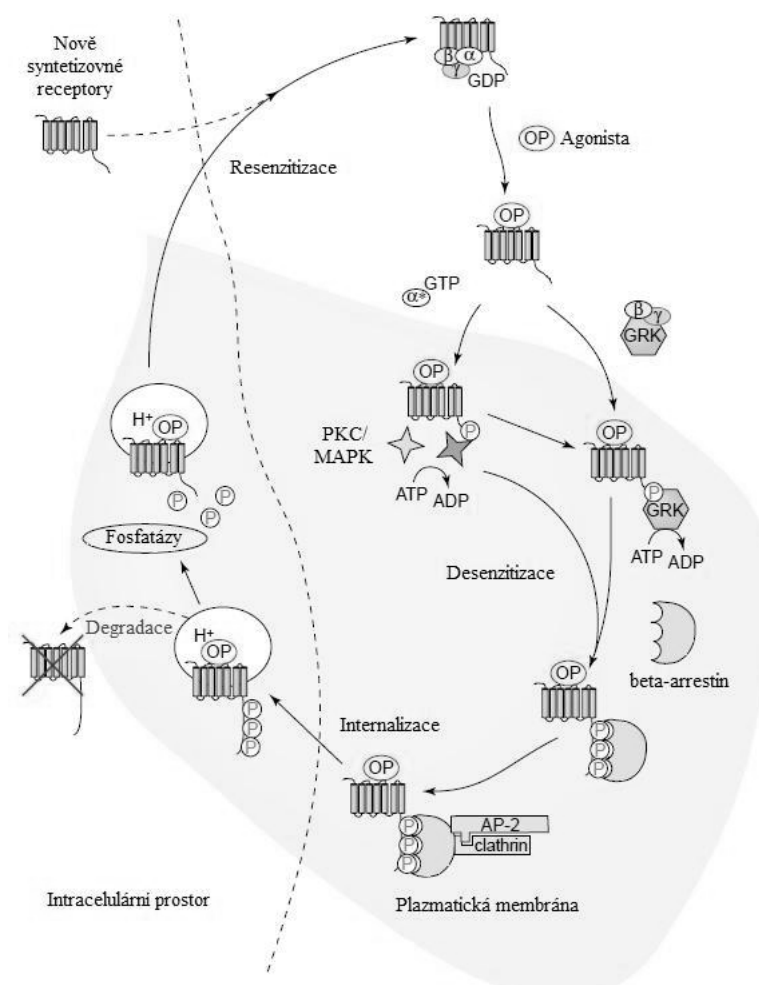
#### **8.4 Osud OR po internalizaci**

Internalizované receptory mohou být buď defosforylovány intracelulárními fosfatázami a následně vráceny do plazmatické membrány, čímž dochází k jejich resenzitizaci. Druhou možností je, že dojde k degradaci OR v lysozomech. Na to, zda budou receptory resenzitizovány či degradovány, má vliv řada faktorů. (Obr. 5)

Jedním z nich je druh buněk, ve kterých internalizace probíhá. Bylo dokázáno, že  $\delta$  receptory aktivované stejným agonistou mohou být v závislosti na druhu buněk



resenzitizovány i degradovány <sup>121, 122</sup>. Stejně tak doba trvání expozice agonistům určuje, zda dojde k resenzitizaci či k degradaci. Zatímco vystavení  $\delta$  receptorů etorfinu po dobu jedné hodiny vede k resenzitizaci receptorů, čtyřhodinové působení etorfinem na receptory způsobuje jejich degradaci <sup>123</sup>. V neposlední řadě je osud internalizovaných receptorů závislý na druhu ligandu <sup>121</sup>.



**Obr. 5** Obecné schéma procesů desenzitizace, internalizace, degradace a resenzitizace OR. Šedá oblast představuje stav OR, kdy nejsou spřaženy s G proteiny. OR aktivované agonistou (OP = opioidní peptidy) jsou fosforylovány různými kinázami (PKC, MAPK, GRK). Fosforylované receptory interagují s  $\beta$ -arrestinem a následně s adaptiny (AP-2) a s molekulami klathrinu. Poté jsou dalšími procesy OR směřovány buď k degradaci v lysozomech či proteazomech, nebo jsou defosforylovány

buněčnými fosfatázami a následně znovu přesunuty do buněčné membrány (resenzitizace) <sup>124</sup>.

Na osud OR po internalizaci mají vliv i interakce s některými cytosolickými proteiny jako ubiquitin či GASP. Kovalentní interakce s ubiquitem vede k degradaci OR v proteazomech <sup>125</sup>. Interakce s GASP reguluje transport a následný rozklad OR v lysozomech.  $\delta$  receptory mají pro GASP výrazně vyšší afinitu než  $\mu$  receptory, což je důvod, proč  $\mu$  receptory podléhají zejména resenzitizaci, zatímco  $\delta$  receptory jsou z velké části degradovány proteolýzou <sup>126</sup>.

## 9 Tolerance a závislost

Po chronické expozici OR opioidním agonistům, dochází ke snížení schopnosti OR vyvolat buněčnou odpověď. Jinak řečeno k vyvolání stejného účinku je zapotřebí větší dávka opioidů. Tento jev je nazýván opioidní tolerancí. Opioidní závislost se na molekulární úrovni projevuje charakteristickými změnami signálních kaskád, které vedou k aktivaci procesů směřujících k potlačení opioidní akce. Analgetické účinky a vznik závislosti nejčastěji používaného opioidního analgetika morfinu jsou zprostředkovány téměř výlučně  $\mu$  receptory<sup>44</sup>. Molekulární mechanismy vzniku a vývoje opioidní tolerance a následně závislosti budou proto popisovány na příkladu  $\mu$  receptorů.

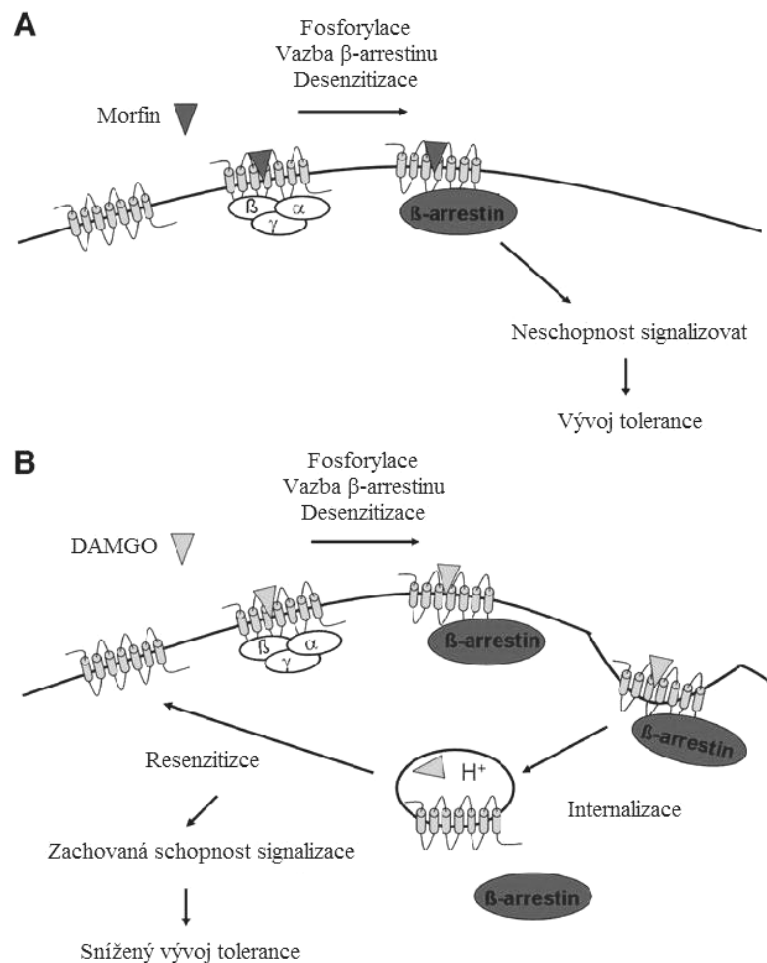
### 9.1 Role OR při vzniku tolerance

Za jeden z důležitých procesů vedoucích ke vzniku tolerance je považována schopnost agonisty vyvolat internalizaci  $\mu$  receptorů. Jak bylo popsáno výše, morfin, na rozdíl od plných agonistů DAMGO či metadonu, selhává ve schopnosti vyvolat internalizaci  $\mu$  receptorů.

Jedna z hypotéz (H1) předpokládá, že morfinem aktivované  $\mu$  receptory zůstávají v desenzitizovaném stavu, tedy neschopné signalizovat, ukotveny na plazmatické membráně. Oproti tomu  $\mu$  receptory aktivované metadonem či DAMGO jsou úspěšně internalizovány a resenzitizovány, čímž si zachovávají signalizační schopnost. (Obr. 6) Z definice tolerance tedy vyplývá, že agonisté s vyšší internalizační schopností mají nižší schopnost vytvářet toleranci než agonisté s nízkou internalizační schopností, poněvadž OR aktivované internalizujícími agonisty si zachovávají schopnost kontinuálně vyvolávat buněčnou odpověď i při neustálém působení agonistů<sup>127-130</sup>.

Druhá hypotéza (H2) předpokládá, že  $\mu$  receptory aktivované morfinem nepodléhají desenzitizaci ani internalizaci. Setrvávají na plazmatické membráně a vyvolávají změny v signalizačních kaskádách, které vedou ke vzniku adaptace na chronickou stimulaci agonisty. Tyto změny jsou pak podstatou samotné tolerance. Tato hypotéza, na rozdíl od prvně uvedené, předpokládá, že internalizace  $\mu$  receptorů

vede k ukončení signalizace a tudíž znemožňuje vznik adaptace a potažmo tolerance.<sup>127, 131, 132</sup>



**Obr. 6** Vliv internalizace  $\mu$  receptorů na vznik tolerance podle H1. A) Aktivace  $\mu$  receptoru neinternalizujícím agonistou morfinem vede k desenzitizaci receptorů. Desenzitizované receptory setrvávají v plazmatické membráně neschopny signalizovat, což vede k vývoji tolerance. B) Aktivace  $\mu$  receptorů internalizujícím agonistou DAMGO vede k desenzitizaci receptorů, ale také k jejich internalizaci a resenzitizaci, což vede k zachování signální schopnosti receptorů a tudíž k nízkému rozvoji tolerance<sup>127</sup>.

Tyto dvě hypotézy patrně popisují procesy, které oba probíhají při vývoji morfinové tolerance a závislosti *in vivo*. V buňkách, ve kterých je morfin schopen

vyvolat desenzitizaci, patrně převládá proces popsáný hypotézou H1, zatímco v buňkách, ve kterých morfin ve vyvolání desenzitizace selhává, převažuje proces popsáný hypotézou H2<sup>133</sup>.

Výsledky některých studií naznačují, že současné podání morfinu spolu se subanalgetickou dávkou internalizujícího agonisty (metadon, DAMGO) usnadňuje morfinem vyvolanou internalizaci  $\mu$  receptorů, což vede ke sníženému vývoji morfinové tolerance<sup>131, 134</sup>. Nicméně tyto výsledky jsou v nesouladu s výsledky jiných prací<sup>129, 130</sup>, a nelze je tudíž považovat za směrodatné.

Na vývoji morfinové tolerance mají velký vliv  $\delta$  receptory. Bylo dokázáno, že v nepřítomnosti  $\delta$  receptorů nedochází k vývoji morfinové tolerance<sup>21, 22, 135</sup>. Pro objasnění tohoto jevu byla navržena hypotéza, která předpokládá, že chronické působení morfinu způsobí zvýšenou expresi  $\delta$  receptorů z intracelulárních zásobáren na plazmatickou membránu neuronů. Na plazmatické membráně tvoří  $\mu$  a  $\delta$  receptory heterodimery, přičemž aktivované  $\delta$  receptory inhibují signalizaci  $\mu$  receptorů, což vede k vývoji morfinové tolerance<sup>40</sup>.

## 9.2 Adaptační změny v signalizaci OR vedoucí k závislosti

Za vývoj opioidní tolerance a závislosti nezodpovídá pouze snížená signalizační schopnost  $\mu$  receptorů, ale také vývoj kompenzačních mechanismů vedoucích k potlačení dlouhodobé opioidní akce. Tyto procesy tedy obecně směřují k zvýšení excitability neuronů<sup>69</sup>.

Nejlépe prozkoumaným procesem nastávajícím po chronickém vystavení  $\mu$  receptorů opioidním agonistům je nárůst intracelulární hladiny cAMP, který je nejvíce patrný po přerušení expozice  $\mu$  receptorů agonistům. Tento jev byl nazván superaktivací AC. Molekulární podstata není doposud plně objasněna. Některé studie naznačovaly, že superaktivace AC je negativně korelována se schopností agonisty vyvolat internalizaci a toleranci. Jinak řečeno, internalizující agonisté (DAMGO, etorfin, metadon) mají nízkou schopnost vyvolat toleranci, nicméně usnadňují vývoj kompenzačních mechanismů, jako je superaktivace AC, vedoucích k opioidní závislosti. Na rozdíl od neinternalizujících agonistů (morfin), jež usnadňují vznik tolerance, avšak jsou méně účinné v aktivaci kompenzačních mechanismů<sup>127-129</sup>.

Novější studie však ukazují, že superaktivace AC není závislá na internalizaci OR, ale na hustotě  $\mu$  receptorů na plazmatické membráně<sup>136, 137</sup>. Z této představy vyplývá, že internalizující agonisté způsobují nižší stupeň superaktivace AC, neboť snižují hustotu  $\mu$  receptorů na povrchu buněk. Superaktivace AC je podle těchto prací závislá na umístění  $\mu$  receptorů v *lipidových raftech*, což jsou membránové útvary bohaté na signální molekuly, mezi které patří mj. různé isoformy AC či Src kinázy ovlivňující regulaci hladiny cAMP. Dále je superaktivace AC závislá rovněž na přítomnosti podjednotky  $G_{\alpha i2}$ . Po chronické expozici agonistům, pak dochází k aktivaci Src kináz, které fosforylují  $\mu$  receptory. Při této interakci hraje důležitou roli podjednotka  $G_{\alpha i2}$ , která má patrně stabilizační účinky a usnadňuje vznik komplexu  $\mu$  receptoru se Src kinázami. Vzniklý komplex  $\mu$  receptor-Src- $G_{\alpha i2}$  má schopnost přímo, či prostřednictvím aktivace dalších signálních molekul aktivovat AC. Src má tedy v tomto případě zřejmě funkci molekulárního *přepínače*, jež mění prvotní inhibiční signál  $\mu$  receptorů na signál aktivační<sup>136, 137</sup>.

Pokud zvýšení intracelulární hladiny cAMP nezávisí na internalizaci OR, tolerance a superaktivace AC jsou zřejmě dva nezávislé procesy.

Se vzrůstem intracelulární hladiny cAMP je přímo spojena zvýšená aktivita PKA, vedoucí k aktivaci výlevu neurotransmiterů a transkripčního faktoru CREB, jenž aktivuje expresi AC VIII<sup>138</sup>. Dalším procesem vedoucím ke zvýšení excitability buněk nastávajícím po chronické expozici  $\mu$  receptorů morfinu je snížení aktivity  $Na^+/K^+$  pumpy, což vede k depolarizaci buněk, a tudíž k usnadnění vzniku akčního potenciálu<sup>139</sup>.

## 10 Závěr

Přestože opioidy a OR jsou v současné době intenzivně studovány, pole jejich výzkumu je stále dynamicky rozvíjejícím se oborem, ve kterém je nadále prostor pro nové objevy. Opioidy patří mezi neúčinnější a nejpoužívanější analgetika. Nejznámější a nejdéle používaný opioid morfin ovšem vytváří silnou toleranci a závislost. Proto od samého počátku výzkumu účinků opioidů bylo hlavním cílem zefektivnit analgetické účinky opioidů a pokud možno eliminovat vznikající toleranci a závislost.

Od dob kdy existovaly pouze farmakologické náznaky existence OR, byl učiněn v poznání a pochopení vlastností OR velký pokrok. Klonování OR přineslo před dvaceti lety, nejen první nesporné důkazy o existenci více druhů OR, ale také možnost poznání jejich aminokyselinového složení. Tento objev spolu s mutačními analýzami a počítačovým modelováním umožnil poznání struktury vazebných míst pro ligandy, G proteiny a další proteiny regulující funkce OR, což vedlo k vývoji řady syntetických opioidů rozdílně regulujících vývoj analgesie, tolerance a závislosti.

Byla navržena řada molekulárních mechanismů zahrnujících desenzitizaci a internalizaci OR či změny v signalizačních kaskádách regulovaných OR, které mají s vysokou pravděpodobností velký podíl na vývoji opioidní tolerance a závislosti. Nicméně je zjevné, že procesy vedoucí k opioidní toleranci a závislosti jsou značně komplexní a komplikované. Liší se v závislosti na ligandech a jsou ovlivňovány interakcemi s řadou dalších proteinů a jiných receptorů, jejichž exprese je závislá na typu buněk.

Současné vědecké poznání tedy nestačí na vysvětlení těchto procesů. K jejich objasnění je zapotřebí usilovné vědecké práce, což poskytuje prostor pro budoucí badatele.

## 11 Literatura

1. Harrison, L. M.; Kastin, A. J.; Zadina, J. E., Opiate tolerance and dependence: Receptors, G proteins, and antiopiates. *Peptides* **1998**, 19, (9), 1603-1630.
2. Minami, M.; Satoh, M., Molecular-Biology of the Opioid Receptors - Structures, Functions and Distributions. *Neuroscience Research* **1995**, 23, (2), 121-145.
3. Pert, C. B.; Snyder, S. H., Opiate Receptor - Demonstration in Nervous-Tissue. *Science* **1973**, 179, (4077), 1011-1014.
4. Simon, E. J.; Hiller, J. M.; Edelman, I., Stereospecific Binding of Potent Narcotic Analgesic [H-3]Etorphine to Rat-Brain Homogenate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1973**, 70, (7), 1947-1949.
5. Martin, W. R.; Eades, C. G.; Thompson, J. A.; Huppler, R. E.; Gilbert, P. E., Effects of Morphine-Like and Nalorphine-Like Drugs in Nondependent and Morphine-Dependent Chronic Spinal Dog. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **1976**, 197, (3), 517-532.
6. Mollereau, C.; Parmentier, M.; Mailleux, P.; Butour, J. L.; Moisand, C.; Chalon, P.; Caput, D.; Vassart, G.; Meunier, J. C., Or11, a Novel Member of the Opioid Receptor Family - Cloning, Functional Expression and Localization. *Febs Letters* **1994**, 341, (1), 33-38.
7. Mei, J. F.; Pasternak, G. W., Molecular cloning and pharmacological characterization of the rat sigma(1) receptor. *Biochemical Pharmacology* **2001**, 62, (3), 349-355.
8. Chien, C. C.; Pasternak, G. W., Sigma-Antagonists Potentiate Opioid Analgesia in Rats. *Neuroscience Letters* **1995**, 190, (2), 137-139.
9. Waldhoer, M.; Bartlett, S. E.; Whistler, J. L., Opioid receptors. *Annual Review of Biochemistry* **2004**, 73, 953-990.
10. Eppler, C. M.; Hulmes, J. D.; Wang, J. B.; Johnson, B.; Corbett, M.; Luthin, D. R.; Uhl, G. R.; Linden, J., Purification and Partial Amino-Acid-Sequence of a Mu-Opioid Receptor from Rat-Brain. *Journal of Biological Chemistry* **1993**, 268, (35), 26447-26451.
11. Min, B. H.; Augustin, L. B.; Felsheim, R. F.; Fuchs, J. A.; Loh, H. H., Genomic Structure and Analysis of Promoter Sequence of a Mouse Mu-Opioid Receptor Gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1994**, 91, (19), 9081-9085.
12. Wang, J. B.; Imai, Y. S.; Eppler, C. M.; Gregor, P.; Spivak, C. E.; Uhl, G. R., Mu-Opiate Receptor - Cdna Cloning and Expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1993**, 90, (21), 10230-10234.
13. Wang, J. B.; Johnson, P. S.; Persico, A. M.; Hawkins, A. L.; Griffin, C. A.; Uhl, G. R., Human Mu-Opiate Receptor - Cdna and Genomic Clones, Pharmacological Characterization and Chromosomal Assignment. *Febs Letters* **1994**, 338, (2), 217-222.



14. Wolozin, B. L.; Pasternak, G. W., Classification of Multiple Morphine and Enkephalin Binding Sites in the Central Nervous-System. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* **1981**, 78, (10), 6181-6185.
15. Pasternak, G. W., Pharmacological Mechanisms of Opioid Analgesics. *Clinical Neuropharmacology* **1993**, 16, (1), 1-18.
16. Ling, G. S. F.; Macleod, J. M.; Lee, S.; Lockhart, S. H.; Pasternak, G. W., Separation of Morphine Analgesia from Physical-Dependence. *Science* **1984**, 226, (4673), 462-464.
17. Pan, Y. X., Diversity and complexity of the mu opioid receptor gene: Alternative pre-mRNA splicing and promoters. *DNA and Cell Biology* **2005**, 24, (11), 736-750.
18. Pasternak, G. W., Insights into mu opioid pharmacology - The role of mu opioid receptor subtypes. *Life Sciences* **2001**, 68, (19-20), 2213-2219.
19. Shippenberg, T. S.; LeFevour, A.; Chefer, V. I., Targeting Endogenous Mu- and Delta-Opioid Receptor Systems for the Treatment of Drug Addiction. *Cns & Neurological Disorders-Drug Targets* **2008**, 7, (5), 442-453.
20. Vanderah, T.; Takemori, A. E.; Sultana, M.; Portoghese, P. S.; Mosberg, H. I.; Hruby, V. J.; Haaseth, R. C.; Matsunaga, T. O.; Porreca, F., Interaction of [D-Pen(2),D-Pen(5)]Enkephalin and [D-Ala(2),Glu(4)]Deltorphin with Delta-Opioid Receptor Subtypes in-Vivo. *European Journal of Pharmacology* **1994**, 252, (2), 133-137.
21. Miyamoto, Y.; Portoghese, P. S.; Takemori, A. E., Involvement of Delta2 Opioid Receptors in the Development of Morphine-Dependence in Mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **1993**, 264, (3), 1141-1145.
22. Miyamoto, Y.; Bowen, W. D.; Portoghese, P. S.; Takemori, A. E., Lack of Involvement of Delta-1 Opioid Receptors in the Development of Physical-Dependence on Morphine in Mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **1994**, 270, (1), 37-39.
23. Evans, C. J.; Keith, D. E.; Morrison, H.; Magendzo, K.; Edwards, R. H., Cloning of a Delta Opioid Receptor by Functional Expression. *Science* **1992**, 258, (5090), 1952-1955.
24. Kieffer, B. L.; Befort, K.; Gaveriauxruff, C.; Hirth, C. G., The Delta-Opioid Receptor - Isolation of a Cdna by Expression Cloning and Pharmacological Characterization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1992**, 89, (24), 12048-12052.
25. Zukin, R. S.; Eghbali, M.; Olive, D.; Unterwald, E. M.; Tempel, A., Characterization and Visualization of Rat and Guinea-Pig Brain K Opioid Receptors - Evidence for K1 and K2 Opioid Receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1988**, 85, (11), 4061-4065.
26. Li, S. X.; Zhu, J. M.; Chen, C. G.; Chen, Y. W.; Deriel, J. K.; Ashby, B.; Liuchen, L. Y., Molecular-Cloning and Expression of a Rat Kappa-Opioid Receptor. *Biochemical Journal* **1993**, 295, 629-633.

27. Bunzow, J. R. S., C. Mortrud, M. Bouvier, C. Williams, J. T. Low, M. Grandy, D. K., Molecular-Cloning and Tissue Distribution of a Putative Member of the Rat Opioid Receptor Gene Family That Is Not a Mu-Opioid, Delta-Opioid or Kappa-Opioid Receptor-Type. *Febs Letters* **1994**, 347, (2-3), 284-288.
28. Chen, Y.; Mestek, A.; Liu, J.; Yu, L., Molecular-Cloning of a Rat Kappa-Opioid Receptor Reveals Sequence Similarities to the Mu-Opioid and Delta-Opioid Receptors. *Biochemical Journal* **1993**, 295, 625-628.
29. Meunier, J. C.; Mollereau, C.; Toll, L.; Suaudeau, C.; Moisand, C.; Alvinerie, P.; Butour, J. L.; Guillemot, J. C.; Ferrara, P.; Monsarrat, B.; Mazarguil, H.; Vassart, G.; Parmentier, M.; Costentin, J., Isolation and Structure of the Endogenous Agonist of Opioid Receptor-Like Or1(1) Receptor. *Nature* **1995**, 377, (6549), 532-535.
30. Reinscheid, R. K.; Nothacker, H. P.; Bourson, A.; Ardati, A.; Henningsen, R. A.; Bunzow, J. R.; Grandy, D. K.; Langen, H.; Monsma, F. J.; Civelli, O., Orphanin-Fq - a Neuropeptide That Activates an Opioid-Like G Protein-Coupled Receptor. *Science* **1995**, 270, (5237), 792-794.
31. Mogil, J. S.; Grisel, J. E.; Zhangs, G.; Belknap, J. K.; Grandy, D. K., Functional antagonism of mu-, delta- and kappa-opioid antinociception by orphanin FQ. *Neuroscience Letters* **1996**, 214, (2-3), 131-134.
32. Peckys, D.; Landwehrmeyer, G. B., Expression of mu, kappa, and delta opioid receptor messenger RNA in the human CNS: A P-33 in situ hybridization study. *Neuroscience* **1999**, 88, (4), 1093-1135.
33. Mansour, A.; Fox, C. A.; Akil, H.; Watson, S. J., Opioid-Receptor Messenger-Rna Expression in the Rat Cns - Anatomical and Functional Implications. *Trends in Neurosciences* **1995**, 18, (1), 22-29.
34. Wittert, G.; Hope, P.; Pyle, D., Tissue distribution of opioid receptor gene expression in the rat. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1996**, 218, (3), 877-881.
35. Svingos, A. L.; Moriwaki, A.; Wang, J. B.; Uhl, G. R.; Pickel, V. M., mu-Opioid receptors are localized to extrasynaptic plasma membranes of GABAergic neurons and their targets in the rat nucleus accumbens. *Journal of Neuroscience* **1997**, 17, (7), 2585-2594.
36. Svingos, A. L.; Colago, E. E. O.; Pickel, V. M., Cellular sites for dynorphin activation of kappa-opioid receptors in the rat nucleus accumbens shell. *Journal of Neuroscience* **1999**, 19, (5), 1804-1813.
37. Svingos, A. L.; Clarke, C. L.; Pickel, V. M., Cellular sites for activation of delta-opioid receptors in the rat nucleus accumbens shell: Relationship with Met(5)-enkephalin. *Journal of Neuroscience* **1998**, 18, (5), 1923-1933.
38. Wang, H. B.; Zhao, B.; Zhong, Y. Q.; Li, K. C.; Li, Z. Y.; Wang, Q. O.; Lu, Y. J.; Zhang, Z. N.; He, S. Q.; Zheng, H. C.; Wu, S. X.; Hokfelt, T. G. M.; Bao, L.; Zhang, X., Coexpression of delta- and mu-opioid receptors in nociceptive sensory neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2010**, 107, (29), 13117-13122.

39. Gray, A. C.; Coupar, I. M.; White, P. J., Comparison of opioid receptor distributions in the rat central nervous system. *Life Sciences* **2006**, *79*, (7), 674-685.
40. Zhang, X.; Bao, L.; Guan, J. S., Role of delivery and trafficking of delta-opioid peptide receptors in opioid analgesia and tolerance. *Trends in Pharmacological Sciences* **2006**, *27*, (6), 324-329.
41. Kim, K. A.; von Zastrow, M., Neurotrophin-regulated sorting of opioid receptors in the biosynthetic pathway of neurosecretory cells. *Journal of Neuroscience* **2003**, *23*, (6), 2075-2085.
42. Shuster, S. J.; Riedl, M.; Li, X. R.; Vulchanova, L.; Elde, R., Stimulus-dependent translocation of kappa opioid receptors to the plasma membrane. *Journal of Neuroscience* **1999**, *19*, (7), 2658-2664.
43. Janecka, A.; Fichna, J.; Janecki, T., Opioid receptors and their ligands. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2004**, *4*, (1), 1-17.
44. Matthes, H. W. D.; Maldonado, R.; Simonin, F.; Valverde, O.; Slowe, S.; Kitchen, I.; Befort, K.; Dierich, A.; LeMeur, M.; Dolle, P.; Tzavara, E.; Hanoune, J.; Roques, B. P.; Kieffer, B. L., Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. *Nature* **1996**, *383*, (6603), 819-823.
45. Lambert, D. G., The nociceptin/orphanin FQ receptor: a target with broad therapeutic potential. *Nature Reviews Drug Discovery* **2008**, *7*, (8), 694-U11.
46. Hruby, V. J.; Agnes, R. S., Conformation-activity relationships of opioid peptides with selective activities at opioid receptors. *Biopolymers* **1999**, *51*, (6), 391-410.
47. Pogozheva, I. D.; Przydzial, M. J.; Mosberg, H. I., Homology modeling of opioid receptor-ligand complexes using experimental constraints. *Aaps Journal* **2005**, *7*, (2).
48. Palczewski, K.; Kumasaka, T.; Hori, T.; Behnke, C. A.; Motoshima, H.; Fox, B. A.; Le Trong, I.; Teller, D. C.; Okada, T.; Stenkamp, R. E.; Yamamoto, M.; Miyano, M., Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* **2000**, *289*, (5480), 739-745.
49. Stevens, R. C.; Cherezov, V.; Rosenbaum, D. M.; Hanson, M. A.; Rasmussen, S. G. F.; Thian, F. S.; Kobilka, T. S.; Choi, H. J.; Kuhn, P.; Weis, W. I.; Kobilka, B. K., High-resolution crystal structure of an engineered human beta(2)-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science* **2007**, *318*, (5854), 1258-1265.
50. Chen, C.; Shahabi, V.; Xu, W.; Liu-Chen, L. Y., Palmitoylation of the rat mu opioid receptor. *FEBS Lett* **1998**, *441*, (1), 148-52.
51. Levac, B. A. R.; O'Dowd, B. F.; George, S. R., Oligomerization of opioid receptors: generation of novel signaling units. *Current Opinion in Pharmacology* **2002**, *2*, (1), 76-81.
52. Chaturvedi, K.; Christoffers, K. H.; Singh, K.; Howells, R. D., Structure and regulation of opioid receptors. *Biopolymers* **2000**, *55*, (4), 334-346.

53. Pogozeva, I. D.; Lomize, A. L.; Mosberg, H. I., Opioid receptor three-dimensional structures from distance geometry calculations with hydrogen bonding constraints. *Biophysical Journal* **1998**, *75*, (2), 612-634.
54. Filizola, M.; Laakkonen, L.; Loew, G. H., 3D modeling, ligand binding and activation studies of the cloned mouse delta, mu and kappa opioid receptors. *Protein Engineering* **1999**, *12*, (11), 927-942.
55. Surratt, C. K.; Adams, W. R., G protein-coupled receptor structural motifs: Relevance to the opioid receptors. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **2005**, *5*, (3), 315-324.
56. Gether, U.; Kobilka, B. K., G protein-coupled receptors - II. Mechanism of agonist activation. *Journal of Biological Chemistry* **1998**, *273*, (29), 17979-17982.
57. Ambrosio, M.; Zurn, A.; Lohse, M. J., Sensing G protein-coupled receptor activation. *Neuropharmacology* **2011**, *60*, (1), 45-51.
58. Gether, U., Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocrine Reviews* **2000**, *21*, (1), 90-113.
59. Hoffmann, C.; Zurn, A.; Bunemann, M.; Lohse, M. J., Conformational changes in G protein-coupled receptors - the quest for functionally selective conformations is open. *British Journal of Pharmacology* **2008**, *153*, S358-S366.
60. Li, J. H.; Han, S. J.; Hamdan, F. F.; Kim, S. K.; Jacobson, K. A.; Bloodworth, L. M.; Zhang, X. H.; Wess, J., Distinct structural changes in a g protein-coupled receptor caused by different classes of agonist ligands. *Journal of Biological Chemistry* **2007**, *282*, (36), 26284-26293.
61. Audet, N.; Gales, C.; Archer-Lahlou, E.; Vallieres, M.; Schiller, P. W.; Bouvier, M.; Pineyro, G., Bioluminescence resonance energy transfer assays reveal ligand-specific conformational changes within preformed signaling complexes containing delta-opioid receptors and heterotrimeric G proteins. *Journal of Biological Chemistry* **2008**, *283*, (22), 15078-15088.
62. Garzon, J.; Rodriguez-Munoz, M.; Sanchez-Blazquez, P., Morphine alters the selective association between mu-opioid receptors and specific RGS proteins in mouse periaqueductal gray matter. *Neuropharmacology* **2005**, *48*, (6), 853-868.
63. Dupre, D. J.; Robitaille, M.; Ethier, N.; Villeneuve, L. R.; Mamarbachi, A. M.; Hebert, T. E., Seven transmembrane receptor core signaling complexes are assembled prior to plasma membrane trafficking. *Journal of Biological Chemistry* **2006**, *281*, (45), 34561-34573.
64. Pineyro, G.; Archer-Lahlou, E., Ligand-specific receptor states: Implications for opiate receptor signalling and regulation. *Cellular Signalling* **2007**, *19*, (1), 8-19.
65. Seifert, R.; Wenzel-Seifert, K., Constitutive activity of G protein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **2002**, *366*, (5), 381-416.

66. Wang, D. X.; Surratt, C. K.; Sadee, W., Calmodulin regulation of basal and agonist-stimulated G protein coupling by the mu-opioid receptor (OP3) in morphine-pretreated cells. *Journal of Neurochemistry* **2000**, 75, (2), 763-771.
67. Williams, J. T.; Christie, M. J.; Manzoni, O., Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence. *Physiological Reviews* **2001**, 81, (1), 299-343.
68. Connor, M.; Christie, M. J., Opioid receptor signalling mechanisms. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* **1999**, 26, (7), 493-499.
69. Taylor, D. A.; Fleming, W. W., Unifying perspectives of the mechanisms underlying the development of tolerance and physical dependence to opioids. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2001**, 297, (1), 11-18.
70. Wang, D. X.; Sadee, W.; Quillan, J. M., Calmodulin binding to G protein-coupling domain of opioid receptors. *Journal of Biological Chemistry* **1999**, 274, (31), 22081-22088.
71. Mazarakou, G.; Georgoussi, Z., STAT5A interacts with and is phosphorylated upon activation of the mu-opioid receptor. *Journal of Neurochemistry* **2005**, 93, (4), 918-931.
72. Hanoune, J.; Pouille, Y.; Tzavara, E.; Shen, T. S.; Lipskaya, L.; Miyamoto, N.; Suzuki, Y.; Defer, N., Adenylyl cyclases: Structure, regulation and function in an enzyme superfamily. *Molecular and Cellular Endocrinology* **1997**, 128, (1-2), 179-194.
73. Tang, W. J.; Hurley, J. H., Catalytic mechanism and regulation of mammalian adenylyl cyclases. *Molecular Pharmacology* **1998**, 54, (2), 231-240.
74. Tso, P. H.; Yung, L. Y.; Wong, Y. H., Regulation of adenylyl cyclase, ERK1/2, and CREB by G(z) following acute and chronic activation of the delta-opioid receptor. *Journal of Neurochemistry* **2000**, 74, (4), 1685-1693.
75. Beedle, A. M.; Zamponi, G. W., Molecular determinants of opioid analgesia: Modulation of presynaptic calcium channels. *Drug Development Research* **2001**, 54, (3), 118-128.
76. Yamada, M.; Inanobe, A.; Kurachi, Y., G protein regulation of potassium ion channels. *Pharmacological Reviews* **1998**, 50, (4), 723-757.
77. Belcheva, M. M.; Clark, A. L.; Haas, P. D.; Serna, J. S.; Hahn, J. W.; Kiss, A.; Coscia, C. J., mu and kappa opioid receptors activate ERK/MAPK via different protein kinase C isoforms and secondary messengers in astrocytes. *Journal of Biological Chemistry* **2005**, 280, (30), 27662-27669.
78. Belcheva, M. M.; Szucs, M.; Wang, D. X.; Sadee, W.; Coscia, C. J., mu-opioid receptor-mediated ERK activation involves calmodulin-dependent epidermal growth factor receptor transactivation. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, 276, (36), 33847-33853.
79. Lefkowitz, R. J.; Rajagopal, K.; Whalen, E. J., New roles for beta-arrestins in cell signaling: Not just seven-transmembrane receptors. *Molecular Cell* **2006**, 24, (5), 643-652.

80. Zheng, H.; Loh, H. H.; Law, P. Y., beta-arrestin-dependent mu-opioid receptor-activated extracellular signal-regulated kinases (ERKs) translocate to nucleus in contrast to G protein-dependent ERK activation. *Molecular Pharmacology* **2008**, *73*, (1), 178-190.
81. Valverde, O.; Mantamadiotis, T.; Torrecilla, M.; Ugedo, L.; Pineda, J.; Bleckmann, S.; Gass, P.; Kretz, O.; Mitchell, J. M.; Schutz, G.; Maldonado, R., Modulation of anxiety-like behavior and morphine dependence in CREB-deficient mice. *Neuropsychopharmacology* **2004**, *29*, (6), 1122-1133.
82. Shaw-Lutchman, T. Z.; Barrot, M.; Wallace, T.; Gilden, L.; Zachariou, V.; Impey, S.; Duman, R. S.; Storm, D.; Nestler, E. J., Regional and cellular mapping of cAMP response element-mediated transcription during naltrexone-precipitated morphine withdrawal. *Journal of Neuroscience* **2002**, *22*, (9), 3663-3672.
83. Kam, A. Y. F.; Chan, A. S. L.; Wong, Y. H., Phosphatidylinositol-3 kinase is distinctively required for mu-, but not kappa-opioid receptor-induced activation of c-Jun N-terminal kinase. *Journal of Neurochemistry* **2004**, *89*, (2), 391-402.
84. McLennan, G. P.; Kiss, A.; Miyatake, M.; Belcheva, M. M.; Chambers, K. T.; Pozek, J. J.; Mohabbat, Y.; Moyer, R. A.; Bohn, L. M.; Coscia, C. J., Kappa opioids promote the proliferation of astrocytes via G beta gamma and beta-arrestin 2-dependent MAPK-mediated pathways. *Journal of Neurochemistry* **2008**, *107*, (6), 1753-1765.
85. Macey, T. A.; Lowe, J. D.; Chavkin, C., Mu opioid receptor activation of ERK1/2 is GRK3 and arrestin dependent in striatal neurons. *Journal of Biological Chemistry* **2006**, *281*, (45), 34515-34524.
86. Bruchas, M. R.; Macey, T. A.; Lowe, J. D.; Chavkin, C., Kappa opioid receptor activation of p38 MAPK is GRK3-and arrestin-dependent in neurons and astrocytes. *Journal of Biological Chemistry* **2006**, *281*, (26), 18081-18089.
87. Liu, N. J.; vonGizycki, H.; Gintzler, A. R., Phospholipase C beta 1 modulates pain sensitivity, opioid antinociception and opioid tolerance formation. *Brain Research* **2006**, *1069*, (1), 47-53.
88. Quillan, J. M.; Carlson, K. W.; Song, C. Y.; Wang, D. X.; Sadee, W., Differential effects of mu-opioid receptor ligands on Ca<sup>2+</sup> signaling. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2002**, *302*, (3), 1002-1012.
89. Berridge, M. J.; Lipp, P.; Bootman, M. D., The versatility and universality of calcium signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2000**, *1*, (1), 11-21.
90. Hofmann, T.; Schaefer, M.; Schultz, G.; Gudermann, T., Transient receptor potential channels as molecular substrates of receptor-mediated cation entry. *Journal of Molecular Medicine-Jmm* **2000**, *78*, (1), 14-25.
91. Sarne, Y.; Rubovitch, V.; Fields, A.; Gafni, M., Dissociation between the inhibitory and stimulatory effects of opioid peptides on cAMP formation in SK-N-SH neuroblastoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1998**, *246*, (1), 128-131.

92. Wang, D. X.; Tolbert, L. M.; Carlson, K. W.; Sadee, W., Nuclear Ca<sup>2+</sup>/calmodulin translocation activated by mu-opioid (OP3) receptor. *Journal of Neurochemistry* **2000**, 74, (4), 1418-1425.
93. Wang, D. X.; Sun, X. C.; Bohn, L. M.; Sadee, W., Opioid receptor homo- and heterodimerization in living cells by quantitative bioluminescence resonance energy transfer. *Molecular Pharmacology* **2005**, 67, (6), 2173-2184.
94. George, S. R.; Fan, T.; Xie, Z. D.; Tse, R.; Tam, V.; Varghese, G.; O'Dowd, B. F., Oligomerization of mu- and delta-opioid receptors - Generation of novel functional properties. *Journal of Biological Chemistry* **2000**, 275, (34), 26128-26135.
95. Hasbi, A.; Nguyen, T.; Fan, T.; Cheng, R.; Rashid, A.; Alijaniam, M.; Rasenick, M. M.; O'Dowd, B. F.; George, S. R., Trafficking of preassembled opioid mu-delta heterooligomer-Gz signaling complexes to the plasma membrane: Coregulation by agonists. *Biochemistry* **2007**, 46, (45), 12997-13009.
96. Pello, O. M.; Martinez-Munoz, L.; Parrillas, V.; Serrano, A.; Rodriguez-Frade, J. M.; Toro, M. J.; Lucas, P.; Monterrubio, M.; Martinez, C.; Mellado, M., Ligand stabilization of CXCR4/delta-opioid receptor heterodimers reveals a mechanism for immune response regulation. *European Journal of Immunology* **2008**, 38, (2), 537-549.
97. Mackie, K., Cannabinoid receptor homo- and heterodimerization. *Life Sciences* **2005**, 77, (14), 1667-1673.
98. Jordan, B. A.; Gomes, I.; Rios, C.; Filipovska, J.; Devi, L. A., Functional interactions between mu opioid and alpha(2A)-adrenergic receptors. *Molecular Pharmacology* **2003**, 64, (6), 1317-1324.
99. Pfeiffer, M.; Kirscht, S.; Stumm, R.; Koch, T.; Wu, D. F.; Laugsch, M.; Schroder, H.; Hollt, V.; Schulz, S., Heterodimerization of substance P and mu-opioid receptors regulates receptor trafficking and resensitization. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, 278, (51), 51630-51637.
100. Xie, G. X.; Palmer, P. P., How regulators of G protein signaling achieve selective regulation. *Journal of Molecular Biology* **2007**, 366, (2), 349-365.
101. Talbot, J. N.; Roman, D. L.; Clark, M. J.; Roof, R. A.; Tesmer, J. J. G.; Neubig, R. R.; Traynor, J. R., Differential modulation of mu-opioid receptor signaling to adenylyl cyclase by regulators of G protein signaling proteins 4 or 8 and 7 in permeabilised C6 cells is G alpha subtype dependent. *Journal of Neurochemistry* **2010**, 112, (4), 1026-1034.
102. Xie, Z. H.; Li, Z. S.; Guo, L.; Ye, C. Y.; Li, J. A.; Yu, X. L.; Yang, H. F.; Wang, Y. L.; Chen, C. G.; Zhang, D. C.; Liu-Chen, L. Y., Regulator of G protein signaling proteins differentially modulate signaling of mu and delta opioid receptors. *European Journal of Pharmacology* **2007**, 565, (1-3), 45-53.
103. Clark, M. J.; Harrison, C.; Zhong, H. L.; Neubig, R. R.; Traynor, J. R., Endogenous RGS protein action modulates mu-opioid signaling through G alpha(o) - Effects on adenylyl cyclase,

extracellular signal-regulated kinases, and intracellular calcium pathways. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, 278, (11), 9418-9425.

104. Johnson, E. A.; Oldfield, S.; Braksator, E.; Gonzalez-Cuello, A.; Couch, D.; Hall, K. J.; Mundell, S. J.; Bailey, C. P.; Kelly, E.; Henderson, G., Agonist-selective mechanisms of mu-opioid receptor desensitization in human embryonic kidney 293 cells. *Molecular Pharmacology* **2006**, 70, (2), 676-685.

105. Schmidt, H.; Schulz, S.; Klutzny, M.; Koch, T.; Handel, M.; Holtt, V., Involvement of mitogen-activated protein kinase in agonist-induced phosphorylation of the mu-opioid receptor in HEK 293 cells. *Journal of Neurochemistry* **2000**, 74, (1), 414-422.

106. Okura, T.; Varga, E. V.; Hosohata, Y.; Navratilova, E.; Cowell, S. M.; Rice, K.; Nagase, H.; Hruby, V. J.; Roeske, W. R.; Yamamura, H. I., Agonist-specific down-regulation of the human delta-opioid receptor. *European Journal of Pharmacology* **2003**, 459, (1), 9-16.

107. Cen, B.; Xiong, Y.; Ma, L.; Pei, G., Direct and differential interaction of beta-arrestins with the intracellular domains of different opioid receptors. *Molecular Pharmacology* **2001**, 59, (4), 758-764.

108. Celver, J.; Xu, M.; Jin, W. Z.; Lowe, J.; Chavkin, C., Distinct domains of the mu-opioid receptor control uncoupling and internalization. *Molecular Pharmacology* **2004**, 65, (3), 528-537.

109. Whistler, J. L.; von Zastrow, M., Morphine-activated opioid receptors elude desensitization by beta-arrestin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1998**, 95, (17), 9914-9919.

110. Borgland, S. L.; Connor, M.; Osborne, P. B.; Furness, J. B.; Christie, M. J., Opioid agonists have different efficacy profiles for G protein activation, rapid desensitization, and endocytosis of mu-opioid receptors. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, 278, (21), 18776-18784.

111. Bohn, L. M.; Dykstra, L. A.; Lefkowitz, R. J.; Caron, M. G.; Barak, L. S., Relative opioid efficacy is determined by the complements of the G protein-coupled receptor desensitization machinery. *Molecular Pharmacology* **2004**, 66, (1), 106-112.

112. Bohn, L. M.; Lefkowitz, R. J.; Gainetdinov, R. R.; Peppel, K.; Caron, M. G.; Lin, F. T., Enhanced morphine analgesia in mice lacking beta-arrestin 2. *Science* **1999**, 286, (5449), 2495-2498.

113. Claing, A.; Laporte, S. A.; Caron, M. G.; Lefkowitz, R. J., Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins. *Progress in Neurobiology* **2002**, 66, (2), 61-79.

114. Zhang, X.; Wang, F.; Chen, X.; Li, J.; Xiang, B.; Zhang, Y. Q.; Li, B. M.; Ma, L., beta-Arrestin1 and beta-arrestin2 are differentially required for phosphorylation-dependent and -independent internalization of delta-opioid receptors. *Journal of Neurochemistry* **2005**, 95, (1), 169-178.



115. Qiu, Y.; Law, P. Y.; Loh, H. H., mu-opioid receptor desensitization - Role of receptor phosphorylation, internalization, and resensitization. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278*, (38), 36733-36739.
116. Schulz, R.; Wehmeyer, A.; Schulz, K., Opioid receptor types selectively cointernalize with G protein-coupled receptor kinases 2 and 3. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2002**, *300*, (2), 376-384.
117. Groer, C. E.; Tidgewell, K.; Moyer, R. A.; Harding, W. W.; Rothman, R. B.; Priszano, T. E.; Bohn, L. M., An opioid agonist that does not induce mu-opioid receptor - Arrestin interactions or receptor internalization. *Molecular Pharmacology* **2007**, *71*, (2), 549-557.
118. Debic, H. H.; Kim, K. A.; Yu, Y. J.; von Zastrow, M., Morphine promotes rapid, arrestin-dependent endocytosis of mu-opioid receptors in striatal neurons. *Journal of Neuroscience* **2005**, *25*, (34), 7847-7857.
119. Koch, T.; Wu, D. F.; Yang, L. Q.; Brandenburg, L. O.; Holtt, V., Role of phospholipase D2 in the agonist-induced and constitutive endocytosis of G protein coupled receptors. *Journal of Neurochemistry* **2006**, *97*, (2), 365-372.
120. Xiang, B.; Yu, G. H.; Guo, J.; Chen, L.; Hu, W.; Pei, G.; Ma, L., Heterologous activation of protein kinase C stimulates phosphorylation of delta-opioid receptor at Serine 344, resulting in beta-arrestin- and clathrin-mediated receptor internalization. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*, (7), 4709-4716.
121. Marie, N.; Lecoq, I.; Jauzac, P.; Allouche, S., Differential sorting of human delta-opioid receptors after internalization by peptide and alkaloid agonists. *Journal of Biological Chemistry* **2003**, *278*, (25), 22795-22804.
122. Tsao, P. I.; von Zastrow, M., Type-specific sorting of G protein-coupled receptors after endocytosis. *Journal of Biological Chemistry* **2000**, *275*, (15), 11130-11140.
123. Hasbi, A.; Allouche, S.; Sichel, F.; Stanasila, L.; Massotte, D.; Landemore, G.; Polastron, J.; Jauzac, P., Internalization and recycling of delta-opioid receptor are dependent on a phosphorylation-dephosphorylation mechanism. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2000**, *293*, (1), 237-247.
124. Bailey, C. P.; Connor, M., Opioids: cellular mechanisms of tolerance and physical dependence. *Current Opinion in Pharmacology* **2005**, *5*, (1), 60-68.
125. Chaturvedi, K.; Bandari, P.; Chinen, N.; Howells, R. D., Proteasome involvement in agonist-induced down-regulation of mu and delta opioid receptors. *Journal of Biological Chemistry* **2001**, *276*, (15), 12345-12355.
126. Whistler, J. L.; Enquist, J.; Marley, A.; Fong, J.; Gladher, F.; Tsuruda, P.; Murray, S. R.; von Zastro, M., Modulation of postendocytic sorting of G protein coupled receptors. *Science* **2002**, *297*, (5581), 615-620.
127. Koch, T.; Holtt, V., Role of receptor internalization in opioid tolerance and dependence. *Pharmacology & Therapeutics* **2008**, *117*, (2), 199-206.

128. Grecksch, G.; Bartzsch, K.; Widera, A.; Becker, A.; Hollt, V.; Koch, T., Development of tolerance and sensitization to different opioid agonists in rats. *Psychopharmacology* **2006**, 186, (2), 177-184.
129. Koch, T.; Widera, A.; Bartzsch, K.; Schulz, S.; Brandenburg, L. O.; Wundrack, N.; Beyer, A.; Grecksch, G.; Hollt, V., Receptor endocytosis counteracts the development of opioid tolerance. *Molecular Pharmacology* **2005**, 67, (1), 280-287.
130. Schulz, S.; Mayer, D.; Pfeiffer, M.; Stumm, R.; Koch, T.; Hollt, V., Morphine induces terminal mu-opioid receptor desensitization by sustained phosphorylation of serine-375. *Embo Journal* **2004**, 23, (16), 3282-3289.
131. He, L.; Fong, J.; von Zastrow, M.; Whistler, J. L., Regulation of opioid receptor trafficking and morphine tolerance by receptor oligomerization. *Cell* **2002**, 108, (2), 271-282.
132. Finn, A. K.; Whistler, J. L., Endocytosis of the mu opioid receptor reduces tolerance and a cellular hallmark of opiate withdrawal. *Neuron* **2001**, 32, (5), 829-839.
133. Martini, L.; Whistler, J. L., The role of mu opioid receptor desensitization and endocytosis in morphine tolerance and dependence. *Current Opinion in Neurobiology* **2007**, 17, (5), 556-564.
134. He, L.; Whistler, J. L., An opiate cocktail that reduces morphine tolerance and dependence. *Current Biology* **2005**, 15, (11), 1028-1033.
135. Zhu, Y. X.; King, M. A.; Schuller, A. G. P.; Nitsche, J. F.; Reidl, M.; Elde, R. P.; Unterwald, E.; Pasternak, G. W.; Pintar, J. E., Retention of supraspinal delta-like analgesia and loss of morphine tolerance in delta opioid receptor knockout mice. *Neuron* **1999**, 24, (1), 243-252.
136. Zhang, L.; Zhao, H.; Qiu, Y.; Loh, H. H.; Law, P. Y., Src Phosphorylation of mu-Receptor Is Responsible for the Receptor Switching from an Inhibitory to a Stimulatory Signal. *Journal of Biological Chemistry* **2009**, 284, (4), 1990-2000.
137. Zhao, H.; Loh, H. H.; Law, P. Y., Adenylyl cyclase superactivation induced by long term treatment with opioid agonist is dependent on receptor localized within lipid rafts and is independent of receptor internalization. *Molecular Pharmacology* **2006**, 69, (4), 1421-1432.
138. Cao, J. L.; Vialou, V. F.; Lobo, M. K.; Robison, A. J.; Neve, R. L.; Cooper, D. C.; Nestler, E. J.; Han, M. H., Essential role of the cAMP-response-element binding protein pathway in opiate-induced homeostatic adaptations of locus coeruleus neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2010**, 107, (39), 17011-17016.
139. Li, P.; Maguma, H. T.; Thayne, K.; Davis, B.; Taylor, D. A., Correlation of the time course of development and decay of tolerance to morphine with alterations in sodium pump protein isoform abundance. *Biochemical Pharmacology* **2010**, 79, (7), 1015-1024.