

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Gergely Pallag

Molekulární mechanismy vzniku drogových závislostí
Molecular mechanisms engaged in the development of drug addiction

Bakalářská práce

Školitel: Doc. RNDr. Jiří Novotný, DSc.

Praha, 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem 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.

V Praze, 13.8.2015

.....
Gergely Pallag

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval svému školiteli Doc. RNDr. Jiřímu Novotnému, DSc. za cenné rady a ochotu, kterou mi během psaní věnoval. Dále chci poděkovat své rodině za podporu.

Abstrakt

Užívání drog je součástí lidského života už od starověku. Vedle jejich rekreačního užívání může dlouhodobé zneužívání těchto látek vést k vývoji drogové závislosti zejména u náchylných jedinců a působit tak vážné zdravotní a sociální problémy. Cílem této práce je stručně představit mozkové struktury, které jsou místem účinků návykových látek, dále popsat některé mechanismy a molekuly přispívající ke vzniku závislosti. Důležitý systém v CNS spojený s intoxikací je systém odměny s hlavním neuropřenašečem dopaminem. V neuronech tohoto systému se po opakovaném užívání drog hromadí určité molekuly a epigenetické změny, které podporují chronickou povahu závislosti. Zvláště významná je vysoce stabilní transkripční faktor Δ FosB, který ve spolupráci s dalšími molekulami podporuje recidivu po několik měsíců nebo i let po posledním užívání drog.

Klíčová slova: nucleus accumbens, ventrální tegmentální oblast, dopamin, GPCR, Δ FosB,

Abstract

Drug use is part of the human life from the ancient times. Besides their recreational utilization, sustained misuse of these substances can lead to the development of drug addiction especially in susceptible individuals and thus cause serious health and social problems. The aim of this thesis is to briefly introduce brain structures which are affected by addictive substances, and describe some of the mechanisms and molecules that contribute to addiction. A crucial brain structure which plays a role in drug addiction is the reward system, with dopamine as the main neurotransmitter. After repeated use of drugs, in neurons of this system certain molecules and epigenetic changes are accumulating that promote chronic nature of addiction. Especially important is the highly stable transcription factor Δ FosB, which in cooperation with other molecules promotes relapse even after several months or years of the last drug use.

Key words: nucleus accumbens, ventral tegmental area, dopamine, GPCR, Δ FosB

Seznam zkratk

AC	adenylátcykláza
AMG	amygdala
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CNS	centrální nervový systém
CREB	protein vázající se na element odezvy cAMP
CRF	faktor uvolňující kortikotropin
DAG	diacylglycerol
DA	dopamin
DAR	dopaminový receptor
DAT	dopaminový transportér
Dnmt	DNA metyltransferáza
ERK	extracelulárně regulovaná kináza
GDP	guanosindifosfát
GTP	guanosintrifosfát
GIRK	G proteinem aktivovaný dovnitř usměřující draslíkový kanál
GABA _A R	GABA _A receptor
HPA	osa hypotalamus – hypofýza – nadledvina
IP ₃	inositol 1,4,5-trisfosfát
LHb	laterální habenula
GRK	GPCRs kináza
GPCRs	receptory spřažené s G proteiny
MAPK	mitogenem aktivovaná proteinkináza
MSNs	střední trnité neurony
NFκB	nukleární faktor kappa B
OR	opioidní receptor
PKA	proteinkináza A
PKC	proteinkináza C
PLC	fosfolypáza C
PP-1	proteinfosfatáza-1
RMTg	rostromediální tegmentální jádro
vSub	ventrální subiculum
VTA	ventrální tegmentální oblast
NAc	nucleus accumbens

Obsah

1. Úvod.....	7
2. Základní pojmy...	8
3. Anatomické systémy související se vznikem závislosti	9
3.1. Systém odměny.....	9
3.1.1. Ventrální tegmentální oblast.	10
3.1.2. Nucleus accumbens.....	10
3.1.3. Amygdala.....	11
3.1.4. Hipokampus..	11
3.1.5. Frontální kůra	12
3.2. Systém kortikoliberinu.....	12
4. Molekulární mechanismy zapojené při akutním působení drog	13
4.1. Drogy působící na receptory spřažené s G proteiny.....	13
4.1.1. Opioidy.....	13
4.2. Drogy působící na ionotropní receptory.....	14
4.2.1. Barbituráty.....	14
4.3. Drogy působící na transportéry biogenních aminů	15
4.3.1. Kokain.....	15
4.3.2. Amfetamin.....	17
5. Molekulární mechanismy zapojené při chronickém působení drog.....	19
5.1. Receptorový signální systém.....	19
5.1.1. GPCRs.....	19
5.1.2. G proteiny.....	19
5.1.3. Efektory.....	20
5.1.4. Desensitizace	21

5.1.5. Dopaminové receptory a jejich signalizace při závislosti.....	22
5.2. Role transkripčních faktorů.	23
5.2.1. Δ FosB	23
5.2.2. CREB.....	24
5.2.3. NF κ B.....	25
5.3. Epigenetické regulace.....	25
5.3.1. Modifikace histonů.....	26
5.3.2. DNA metylace.....	27
6. Závěr.....	28
7. Seznam použité literatury	29
7.1. Internetové zdroje.....	38

1. Úvod

Závislost na návykových látkách v dnešní době patří mezi celosvětově nejrozšířenější problémy. Jde o chronické onemocnění centrální nervové soustavy (CNS). Postižený člověk postupně ztrácí kontrolu nad užíváním látky navzdory vážným negativním důsledkům. Přestane jevit zájem o dosud důležité činnosti, primárním cílem bude dosažení stavu povznesené nálady („high“) a slasti, případně zbavení se nepříjemných důsledků abstinčního syndromu vznikajícího po vysazení drogy. To má negativní dopad jak na jedince trpící závislostí, tak na prostředí okolo něho. Problém se dá řešit z biologického, psychologického i sociálního hlediska.

Ve své práci budu používat slovo drogy ve smyslu psychoaktivních látek, které jsou schopny ovlivnit mentální procesy a mají schopnost navodit závislost. Z chemického hlediska mohou být různé, avšak mají společnou vlastnost - ovlivňují fungování části mozku zvané systém odměny. Drogy působí na tento systém podobně jako podněty důležité pro přežití. Rozdíl je v síle stimulu. Po opakovaném užívání látky časem probíhají adaptační změny na úrovni neuronů až molekul, které zapříčiňují chronický charakter závislosti. Tím droga ovlivní chování člověka od úrovně molekul až po celé orgány.

Cílem této práce je (1) stručně popsat anatomické struktury, které hrají roli ve vzniku závislosti, (2) na vybraných drogách ukázat, jaké mechanismy se mohou odehrávat při akutním působení psychoaktivních látek a (3) popsat molekulární mechanismy, které vedou k chronické povaze závislosti.

2. Základní pojmy

Definice drogové závislosti podle Světové zdravotnické organizace (WHO) je opakované užívání psychoaktivních látek, jež vede k periodické nebo chronické intoxikaci. Vyznačuje se nutkavým pocitem požití preferované látky, potížemi se zbavením závislosti a snahou obstatat si látky téměř jakýmkoli způsobem.

Po dlouhodobém užívání se může vyvinout tolerance. Organismus vyžaduje stále vyšší dávky, aby dosáhl stejných efektů jako při podání nižší dávky. Přerušení nebo redukce opakovaného užívání psychoaktivních látek u závislých osob vyvolává abstinenční syndrom (World Health Organization [online]).

Páté vydání Diagnostického a statistického manuálu mentálních poruch (DSM-5), vydaného Americkou psychiatrickou společností (APA), používá namísto slova závislost širší pojem, a sice poruchy související s látkami (substance related disorders). Tyto poruchy se dělí na dvě skupiny: poruchy způsobené zneužíváním látek (substance use disorders, SUD) a poruchy vyvolané samotnými látkami (substance induced disorders, SID).

Zásadním rysem pro SUD je skupina kognitivních, behaviorálních a fyziologických symptomů, které naznačují, že jedinec užívá látky navzdory vážným problémům. Základem pro diagnózy SUD jsou patologické šablony v chování. Skupiny kritérií, podle kterých se stanoví diagnóza, jsou: oslabená kontrola užívání látek, zhoršení sociální situace, riskantní užívání látek a farmakologická kritéria. SID zahrnuje intoxikaci, syndrom z odnětí drogy a další mentální poruchy způsobené návykovými látkami (American Psychiatric Association, 2013).

Tolerance a abstinenční syndrom jsou charakteristické pro fyzickou závislost. Droga je opakovaně užívaná s cílem zbavit se nepříjemných pocitů. Při psychické závislosti se nevyvine tolerance a nedostaví se fyzické příznaky po vysazení drogy (Nutt et al., 2007).

Užívání drog má jak zdravotní, tak sociální následky. Podle odhadu v roce 2012 bylo hlášeno 187100 tisíc úmrtí souvisejících s drogami, přičemž počet jedinců s problémem užívání drog se pohybuje kolem 27 miliónů. Kromě toho se používáním kontaminovaných jehel také šíří HIV, hepatitis B a C (United Nations Office on Drugs and Crime [online]).

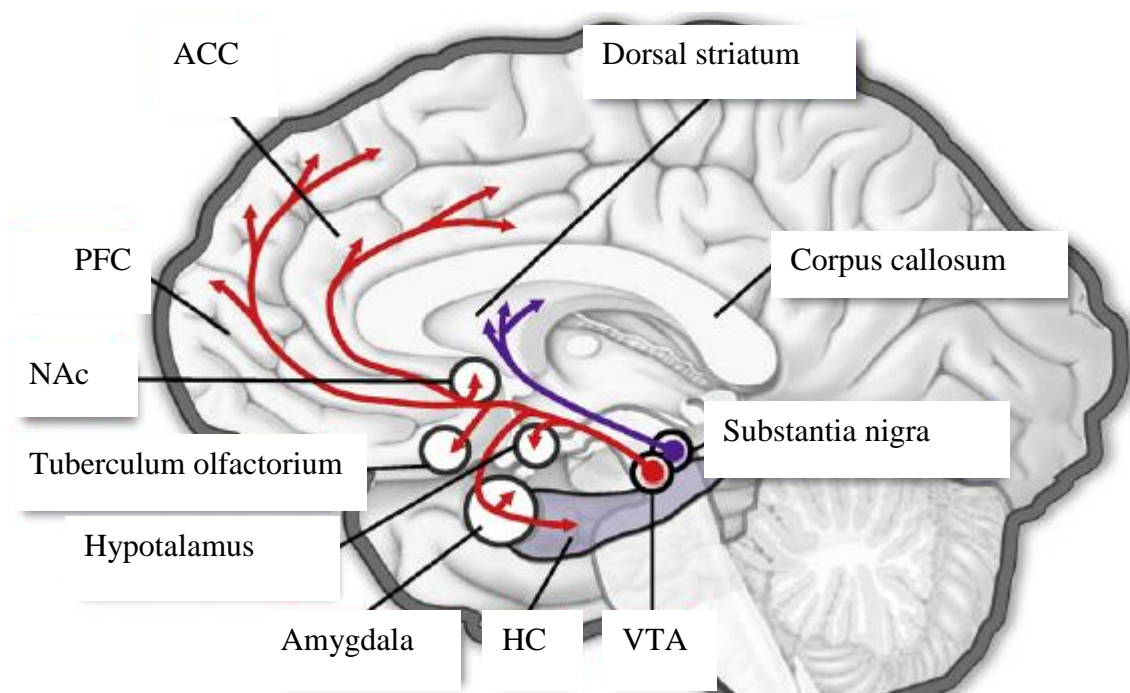
3. Anatomické systémy související se vznikem závislosti

3.1. Systém odměny

Místem účinků drog jsou struktury mozku, jejichž spojením vzniká systém odměny. Tyto struktury reagují za přirozených okolností na podněty důležité pro přežití jedince, jako jsou jídlo, pití a sexuální partner.

Nejdůležitějším neurotransmiterem spojeným se závislostí je dopamin (DA). Dopaminergní buňky jsou začleněny do několika okruhů, ze kterých jsou nejznámější nigrostriatální, mezolimbický a mezokortikální. První vede ze substantia nigra zona compacta a je spojený s motorickou funkcí. Mezolimbický a mezokortikální systémy mají začátek ve ventralní tegmentální oblasti (ventral tegmental area, VTA) a jsou důležité pro motivaci (Wise, 2004).

Schematické znázornění lokalizace a struktury systému odměny je uvedeno na obr. 1.



Obr. 1: Systém odměny. ACC – anteriorní cingulární kůra, HC – hipokampus, NAc – nucleus accumbens, PFC – prefrontální kůra, VTA – ventrální tegmentální oblast, (upraveno podle Perogamvros & Schwartz, 2012)

3.1.1. Ventrální tegmentální oblast

Drogy patřící do různých farmakologických skupin se podílejí na vyvolání odměny. To se přednostně děje zvýšením koncentrace DA v nucleus accumbens (NAc) (Di Chiara & Imperato, 1988). Zdrojem dopaminergních neuronů vedoucích do NAc a dalších částí limbického systému je ventrální tegmentální oblast (VTA). Jde o strukturu nacházející se ve středním mozku. VTA je heterogenní směs dopaminergních (cca 65 %), GABAergních (cca 30 %) a glutamatergních (cca 5 %) neuronů. Vstupy přijímá z různých struktur, včetně kůry, bazálního předního mozku, hypotalamu a mozkového kmenu. Výstupy jsou rovněž hojné, vedou hlavně do NAc, tuberculum olfactorium, ale také do orbitofrontálního a motorického kortexu, striata, laterálního septa, ventrálního pallida a hipokampu (Yeatnikoff *et al.*, 2014).

Husté seskupení GABA neuronů v rostrální části VTA je označováno jako rostromediální tegmentální jádro (rostromedial tegmental nucleus, RMTg). RMTg vytváří nepřímé spojení mezi glutamátovými neurony laterální habenuly (LHb) a DA neurony VTA. Takto vytvořená disynaptická dráha přispívá k regulaci DA neuronů VTA z LHb (Balcita-Pedicino *et al.*, 2011). Pokusy na zvířatech ukázaly, že spojení mezi GABA neurony pomocí štěrbinových spojů (vytvářených connexinem-36) může ovlivnit odměnu vůči drogám. Myši postrádající tuto bílkovinu konzumovaly významně méně alkoholu než divoké typy (Steffensen *et al.*, 2011).

3.1.2. Nucleus accumbens

NAc je součástí koncového mozku, patří k bazálním gangliím. Tato struktura je složena ze dvou funkčně odlišných částí, z jádra a kůry. Kůra je silně propojena s hypotalamem a VTA, přičemž reciproční DA inervace s VTA jsou důležité pro modulaci motivace a přispívají k založení získaných asociací mezi motivující událostí a současnými jevy z prostředí. Jádro je spojeno s anteriorním cingulárním a orbitofrontálním kortexem. Zprostředkuje vyjádření naučeného chování v závislosti na podnětech, které předpovídají události významné pro motivaci (Kalivas & Volkow, 2005). Charakteristickými buňkami NAc jsou GABAergní střední trnité neurony (MSNs) exprimující D1 nebo D2 dopaminové receptory (DAR). Změna v hustotě a struktuře jejich dendritických trnů je důsledkem opakovaného užívání psychostimulantů (Robinson & Kolb, 1997).

3.1.3. Amygdala

Amygdala (AMG) je jádro mandlovitého tvaru ležící ve spánkovém laloku před hipokampem. Anatomicky patří k bazálním gangliím, funkčně je součástí limbického systému. Je složena z menších podjader, která mají odlišné funkce a spojení (Bzdok *et al.*, 2013). Hlavní skupiny jader jsou kortikomediální, centrální a bazolaterální. AMG je asociována s řadou kognitivních funkcí jako jsou emoce, učení, pamatování, pozornost a vnímavost (Baxter *et al.*, 2002). Je spojená i s tužbami. V pokusu při promítání filmu týkajícího se kokainu se zvýšila aktivita AMG a předního cingulárního kortexu u pacientů se zkušeností s kokainem. Zároveň se objevila touha po droze a euforický stav. Tyto změny ale nebyly pozorovány u pacientů, kteří se s kokainem ještě nesetkali (Childress *et al.*, 1999). Ukázalo se, že odpovědi na pozitivní a na negativní vizuální stimuly jsou kódované různými populacemi buněk AMG (Paton *et al.*, 2006). Kromě toho je rozdíl i mezi pravou a levou AMG. Zatímco negativní emoce jsou vyvolané elektrickou stimulací pravé i levé amygdaly, pozitivní pouze stimulací levé amygdaly (Lanteaume *et al.*, 2007).

Neuroanatomická struktura označovaná jako rozšířená AMG může představovat společný anatomický substrát pro akutní drogovou odměnu. Zahrnuje centrální jádro AMG, bed nucleus stria terminalis a mediální oblast NAc. Tyto oblasti sdílejí určité cytoarchitektonické podobnosti. Rozšířená AMG přijímá četné aferentace z limbických struktur, jako jsou bazolaterální AMG a hipokampus, a posílá eferentními neurony informace do mediální části ventrálního pallida a laterálního hypotalamu (Heimer & Alheid 1991; cit. dle Koob & Zorrilla, 2010).

3.1.4. Hipokampus

Hipokampus leží v mediálním temporálním laloku. Je důležitý pro získání nových faktických informací a vytváření vzpomínek o osobně prožitých událostech. Souvisí se ztrátou paměti při Alzheimerově chorobě (Adinoff, 2004). Eferenty z dolní části hipokampu - ventrálního subicula (vSub) - mohou zvýšit hladinu DA v NAc různými způsoby. Brudzynski a Gibson (1997) ukázali, že glutamátové neurony z vSub přímo aktivují vylití DA v NAc. Kromě toho existuje i nepřímý způsob aktivace skrze VTA (Legault *et al.*, 2000). Zároveň vSub kontroluje DA neurony VTA skrze glutamátovou projekci do NAc (Floresco *et al.*, 2001). Ukázal se jeho význam v relapsu vyvolaném prostředím (Bossert & Stern, 2012). To potvrzuje, že prostředí nějak související s užíváním látky často vyvolává relaps u bývalých narkomanů.

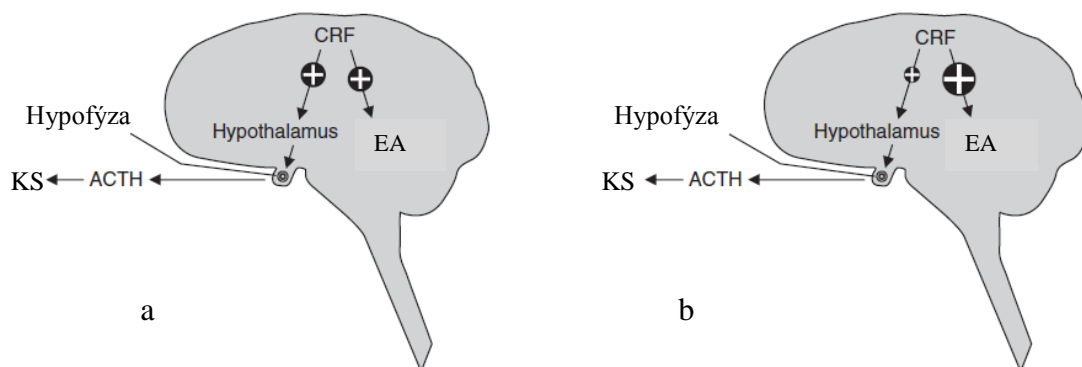
3.1.5. Frontální kůra

Mezokortikální dopaminová dráha, která zahrnuje prefrontální kůru, orbitofrontální kůru a anteriorní cingulu, pravděpodobně ovlivňuje uvědomování si zážitků intoxikace, očekávání drog či toužení po droze a nutkavé požití drog (Goldstein & Volkow, 2002).

3.2. Systém kortikoliberinů

Faktor uvolňující kortikotropin (corticotropin-releasing factor, CRF) je neuropeptid produkovaný primárně paraventriculárním jádrem hypothalamu. CRF je důležitým regulátorem odpovědi na stresové situace, aktivuje osu hypothalamus – hypofýza – nadledvina (hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA) navázáním se na CRF receptor v hypofýze. Jeho role se ukázala i v řízení příjmu potravy a pocitu nasycení, motility gastrointestinální soustavy, cévního tonu a srdečné funkce (Bale & Vale, 2004). Váže se na dvě skupiny receptorů spřažených s G proteiny (G protein-coupled receptor, GPCRs), CRF1 a CRF2 receptory, které jsou v mozku heterogenní jak v rozšíření, tak ve funkci (Chalmers *et al.*, 1995).

Akutní expozice zneužívaným drogám aktivuje osu HPA přes zvýšení produkce CRF v hypothalamu. Také se zvýší syntéza a vylití CRF v rozšířené amygdale (obr. 2a). Během pozdější abstinence je aktivace HPA snížena oproti normálnímu stavu, zatímco v rozšířené amygdale je syntéza a vylití CRF zvýšena a objevují se abstinenční syndromy (obr. 2b) (Logrip *et al.*, 2011).



Obr. 2: Časově závislé uvolnění CRF. ACTH – adrenokortikotropní hormon, CRF - faktor uvolňující kortikotropin, EA – rozšířená amygdala, KS - kortikosteroidy (upraveno podle Logrip *et al.*, 2011).

4. Molekulární mechanismy zapojené při akutním působení drog

Drogy můžeme rozdělit podle různých hledisek. Jelikož lze obecně říci, že každá zneužívaná droga zvýší koncentraci DA v mesokortikolimbickém systému, jedním z kritérií může být způsob, jak zmíněné látky vyvolávají dané zvýšení koncentrace. Z tohoto hlediska lze drogy zařadit do tří skupin:

1. Drogy působící na receptory spřažené s G proteiny
2. Drogy působící na ionotropní kanály
3. Drogy působící na transportéry biogenních aminů

Počáteční účinky vedoucí k závislosti zahrnují akutní působení látek na cílových receptorech a v jednotlivých neuronech exprimujících tyto bílkoviny (Lüscher & Ungless, 2006).

4.1. Drogy působící na receptory spřažené s G proteiny

4.1.1. Opioidy

Opioidy jsou nejúčinnější analgetika. Jelikož disponují odměňujícími účinky, jejich dlouhodobé užívání může vyvolat závislost. Zneužívané opioidy se váží na receptory endogenních opioidů, jako jsou endorfin, enkefalin, dynorfin, endomorfin.

Opioidní receptory (OR) patří do skupiny GPCRs. Jsou spojeny s pertussis toxin senzitivním G_i/G_o proteinem (Law *et al.*, 2000). Byly identifikovány tři hlavní skupiny OR – μ (μ , MOR), kappa (κ , KOR) a delta (δ , DOR). OR můžeme nalézt jak v CNS, tak v periferních tkáních. Distribuce a počet jednotlivých typů v různých tkáních je však proměnlivá (Wittert *et al.*, 1996; Peng *et al.*, 2012). Jsou přítomné i na buňkách locus coeruleus, hlavním noradrenergním jádru mozku. Je to struktura s relativně homogenními, dobře charakterizovatelnými buňkami, proto slouží jako model pro zkoumání opioidů (Nestler, 1996). Pokusy na myších modelech postrádajících MOR ukázaly, že tento typ OR je nejdůležitější pro vývoj závislosti na opioidech (Matthes *et al.*, 1996).

Účinky opioidů na neuronech VTA jsou příkladem nepřímého ovlivnění mesokortikolimbické DA dráhy. Hyperpolarizace GABAergních inhibičních interneuronů

vede k disinhibici DA neuronů a zvýšenému vyplavení DA v NAc (Johnson & North, 1992). Mohou rovněž přímo ovlivnit buňky v NAc aktivací OR na povrchu těchto buněk.

Po navázání opioidů na receptor můžeme sledovat následující účinky:

a/ Inhibice adenylátcyklázy (AC) vede ke snížení počtu cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP). Snížená hladina cAMP už nedokáže regulovat neselektivní napěťově závislý kationtový kanál. Výsledkem je zmenšená amplituda otevření kanálů a pokles excitability.

b/ Opioidy aktivují různé draslíkové kanály, z kterých je nejvíce prozkoumaný G proteinem aktivovaný dovnitř usměřující draslíkový kanál (GIRK). Aktivace GIRK hyperpolarizuje membránu a snižuje excitabilitu buňky.

c/ Inhibice vápníkových kanálů blokuje uvolnění neurotransmiterů.

d/ Aktivace fosfolipázy C (PLC) nebo A_2 spustí kaskádu vedoucí k uvolnění vápníku z vnitrobuněčných zásob nebo k aktivaci proteinkinázy C (PKC).

e/ Existují různé dráhy po navázání ligandu na OR, které se sbíhají v aktivaci mitogenem aktivované proteinkinázy (MAPK). Jedna z nich postupuje přes fosfatidylinositol 3-kinázu, která sérií fosforylačních kroků zahrnujících i c-Src aktivuje MAPK. Jiná může vést po fosforylaci receptoru k internalizaci v klatrinovém váčku. Tento komplex aktivuje MAPK (Williams *et al.*, 2001; Allouche *et al.*, 2014).

4.2. Drogy působící na ionotropní receptory

4.2.1. Barbituráty

Barbituráty jsou deriváty kyseliny barbiturové, působí tlumivě na CNS. Původně se používaly kvůli uklidňujícím účinkům jako léky na spaní, sedativa a součásti analgetik. Časem se ukázaly vedlejší účinky, mezi které patří psychická i fyzická závislost, proto byly postupně nahrazeny benzodiazepiny. Některé se používají v medicíně ještě dodnes, třeba v léčbě epileptických záchvatů nebo při anestezii.

V roce 1980 bylo popsáno, že jejich vazebné místo se nachází na $GABA_A$ ionotropním receptoru ($GABA_{AR}$). Barbituráty ovlivňují GABA odpověď vazbou na alosterické místo (Leeb-Lundberg *et al.*, 1980), po navázání zvyšují dobu otevření chloridového kanálu (Macdonald *et al.*, 1989).

Návykové mechanismy látek působících na $GABA_{AR}$ jsou málo známy, ale nedávná zjištění naznačují, že mohou vyvolat aberantní neuroadaptace v okruzích systému odměny.

Tyto látky, ať už jsou spojené se synaptickým nebo extrasynaptickým GABA_AR, inhibují interneurony, a tak aktivují VTA DA neurony disinhbicí (Vashchinkina *et al.*, 2014).

GABA_AR jsou receptory pro hlavní inhibiční neuropřenašeč, γ -aminomáselnou kyselinu. Patří do superrodiny Cys-loop pentamerních ligandem řízených iontových kanálů. Podjednotky GABA_AR spadají do různých tříd (α , β , γ , δ , ϵ , π , θ), nejčastěji jsou složené z 2α , 2β a 1γ (Barnard *et al.*, 2008). Pro vazby barbiturátů jsou význačně důležité β podjednotky. To potvrdil Cestari a jeho spolupracovníci v roce 1996 pokusem, kde uměle vytvořený homomerní GABA_AR skládající se pouze z β podjednotek reagoval na pentobarbital, ačkoliv zůstal necitlivý vůči GABA (Cestari *et al.*, 1996). Novější výzkumy naznačují, že jde nejspíš o vazebnou kapsu, kde β podjednotka interaguje s α anebo γ podjednotkami (Chiara *et al.*, 2013).

Vedle posílení GABA_A receptorem zprostředkované odpovědi mohou mít barbituráty inhibiční účinek na AMPA a kainátové glutamátové receptory (Nardou *et al.*, 2011) a rovněž na napěťově ovládané vápenaté kanály typu P/Q (Schober *et al.*, 2010). Tyto účinky také přispívají k výsledné disinhbici DA neuronů.

4.3. Drogy působící na transportéry biogenních aminů

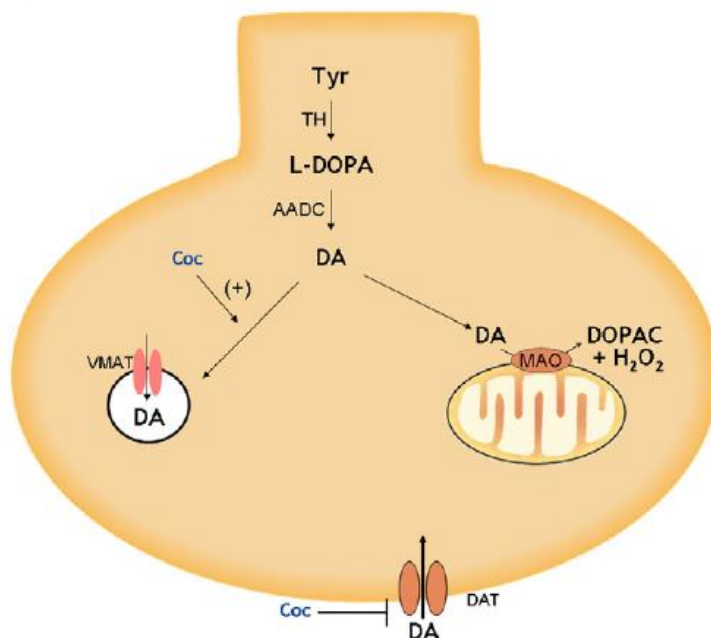
Komunikace mezi buňkami CNS vyžaduje precizní kontrolu nad trváním a intenzitou působení neurotransmiterů. Po vyplavení a aktivaci receptorů musí být signální molekuly degradovány nebo aktivně vychytávány do presynaptického neuronu, kde mohou být opakovaně transportovány do vezikul. Selhání této regulace může vést až k neurologickým a psychiatrickým syndromům, jako jsou deprese, Parkinsonova nemoc, epilepsie nebo závislost (Masson *et al.*, 1999).

4.3.1. Kokain

Kokain je psychoaktivní alkaloid z rostliny *Erythroxylon coca*. Jedná se o bílou, krystalickou látku se stimulačním, anestetickým účinkem. Navozuje euforii a vzrušení, může však mimo jiné vést k vyvolání pocitu hladu, halucinací či deprese.

Kokain vytváří odměňující účinek především navázáním na DA transportér (DAT) a jeho blokováním (Ritz *et al.*, 1987). Funguje jako kompetitivní inhibitor, jehož vazebné místo uvnitř molekuly se překrývá s vazebným místem pro DA (Beuming *et al.*, 2008) (obr. 3).

Novější práce popisují kokain jako inverzního agonistu. V tomto modelu navázáním na DAT nejenom blokuje transport neurotransmiteru, ale konformační změnou transportéru obrací směr přenosu a umožňuje pasivní proudění DA do extracelulárního prostoru (Heal *et al.*, 2014).



Obr. 3: Přímé efekty kokainu v dopaminergních nervových zakončeních. Tyr – tyrosin, TH – tyrosin hydroxyláza, L-DOPA – L-dihydroxyfenylalanin, AADC – dekarboxyláza aminokyselin, Coc – kokain, DAT – dopaminový transportér, MAO – monoaminoxidáza, VMAT – vezikulární monoaminový transportér, DOPA-C – dihydroxyfenyloctová (převzato z Cunha-Oliveira *et al.*, 2008).

DAT patří do neurotransmitter/ Na^+ symportér rodiny, kam se také řadí serotonin, norepinefrin, glycin a GABA transportér. Je lokalizovaný v presynaptické membráně a řídí ukončení signalizace zpětným vychytáváním DA. Jeho fungování závisí na Na/K -ATPáze, využívá sílu iontového gradientu, aby mohl transportovat DA ze synaptické štěrby do presynaptického terminálu. Pozitivně nabitý DA je kotransportován se dvěma ionty Na^+ a jedním Cl^- (Heal *et al.*, 2014). Dvanáct transmembránových segmentů vytváří jednu molekulu DAT (Giros *et al.*, 1991). Experimenty naznačují, že transportéry této rodiny mohou být zakotveny v membráně a také fungovat jako oligomery (Zhen *et al.*, 2015).

Klíčovou roli DAT v kokainové závislosti potvrdily i experimenty na geneticky modifikovaných myších s chybějícími DAT. Podávání kokainu a amfetaminu u nich už totiž nezměnilo pohybovou aktivitu ani hladinu DA v synaptické štěrbině (Giros *et al.*, 1996).

4.3.2. Amfetamin

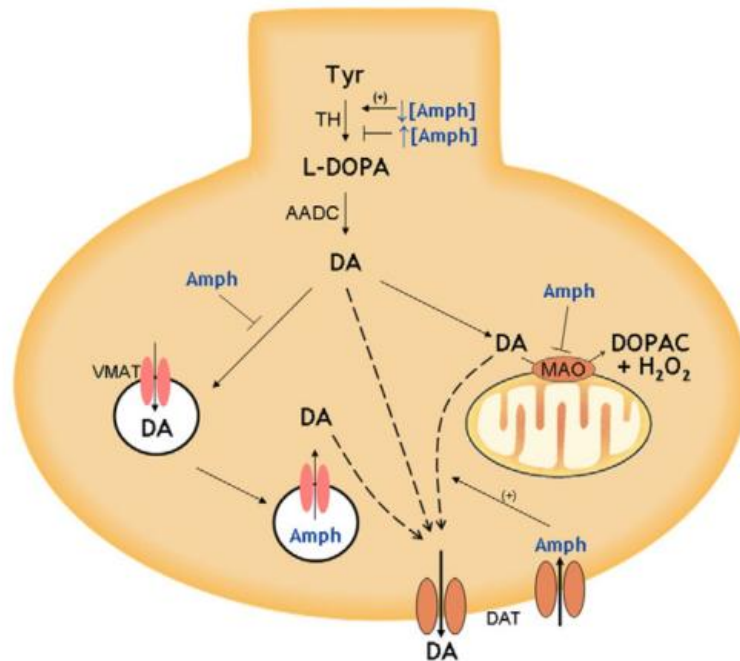
Amfetaminy jsou psychoaktivní látky se stimulačním, euforickým a anorektickým účinkem, v některých případech mají empatogenní a halucinogenní vlastnosti. Látky s amfetaminovou strukturou jsou odvozeny od β -fenyletylaminu. (Carvalho *et al.*, 2012). Přestože jde o látku s adiktivním potenciálem, její cílené farmaceutické využití v budoucnosti může sloužit jako terapie pro převrácení změn v dopaminergních terminálech způsobených kokainem (Ferris *et al.*, 2015).

Podobně jako kokain, také amfetamin ovlivňuje monoaminový transportér a zvyšuje vylití DA. Má však odlišný mechanismus, vzhledem k strukturální podobnosti s monoaminovými neurotransmitery funguje jako substrát pro transportéry. DAT je v tomto případě využíván pro proniknutí amfetaminu z extracelulárního prostoru do DA neuronu. Ústřední význam účinku amfetaminu je čerpání DA ze sekrečních váček a jeho obrácený transport do extracelulárního prostoru zprostředkovaný DAT. Jelikož prvně zmíněný proces trvá až pětkrát déle, můžeme je považovat za krok omezující rychlost působení amfetaminu (Sulzer *et al.*, 1995; Jones *et al.*, 1998) (obr. 4).

V cytoplazmě se amfetamin interaguje s vezikulárním monoaminovým transportérem (v CNS převážně typ 2, VMAT2) v membráně synaptických váček. V přirozených podmínkách VMAT2 pumpuje dopamin a další monoaminy do vezikul na základě protonového gradientu. Existují dvě hypotézy, jak dochází k uvolnění DA ze synaptických váček. První je založena na slabé bazicitě amfetaminu. Po difuzi do kyselého váčku váže H^+ ionty, čímž se sníží protonový gradient, který akumuluje neurotransmitery ve váčku (Sulzer & Rayport, 1990 citován dle David Sulzer 2011). Druhá hypotéza předpokládá, že amfetamin ve váčku vyčerpá zásoby neurotransmiterů obrácením aktivity transportéru (Partilla *et al.*, 2006). Zvýšené množství DA potom opustí buňku pomocí DAT dvěma způsoby. DAT buď spustí molekuly urychleně jako kanál nebo pomalým transportem (Kahlig *et al.*, 2005).

Nové poznatky ukazují, že užívání amfetaminu ovlivní i fosforylaci DAT proteinkinázou $C\beta$ nebo proteinkinázou II závislou na komplexu vápníku s kalmodulinem, což může přispívat k regulaci transportu DAT a zároveň pohybové aktivitě pokusných zvířat (Chen *et al.*, 2009; Pizzo *et al.*, 2014).

Ačkoliv primárním místem účinků amfetaminů jsou monoaminové transportéry, jsou známé i jejich interakce s receptorem pro stopové aminy, který je spojen s G proteinem (Bunzow *et al.*, 2001).



Obr. 4: Přímé efekty amfetaminu v dopaminergních nervových zakončeních. Tyr – tyrosin, TH – tyrosin hydroxyláza, L-DOPA – L-dihydroxyfenylalain, AADC – dekarboxyláza aminokyselin, Coc – kokain, DAT – dopaminový transportér, MAO – monoaminoxidáza, VMAT – vezikulární monoaminový transportér, DOPA-C – dihydroxyfenyloctová (převzato z Cunha-Oliveira *et al.*, 2008).

5. Molekulární mechanismy zapojené při chronickém působení drog

5.1. Receptorový signální systém

5.1.1. GPCRs

GPCRs patří mezi nejhojněji se vyskytující receptory. Jde o polypeptidový řetězec, které sedmkrát prochází plazmatickou membránou. Další charakteristickou vlastností je spojení s heterotrimerním G proteinem po aktivaci receptoru ligandem (Morris & Malbon, 1999). Ligandy pro GPCRs mají obrovskou variabilitu, zahrnují mimo jiné ionty, organické odoranty aminy, peptidy, bílkoviny, lipidy, nukleotidy. Na základě sekvenční podobnosti lze lidský GPCRs dělit do pěti hlavních rodin a jejich celkový počet převyšuje 800 (Fredriksson *et al.*, 2003).

Jsou to integrální membránové proteiny, jejichž struktura může být rozdělena do tří částí. Extracelulární oblast sestává z N-konce a tří extracelulárních smyček (ECL1-ECL3). Obsahuje vstup pro vazebnou kapsu, která se nachází v transmembránové oblasti. Ačkoliv všechny ligandy mají vazebnou kapsu na extracelulární straně transmembránových helixů, různé ligandy pronikají do různých hloubek v rámci této kapsy. Transmembránová oblast se skládá ze sedmi α -šroubovic (TM1-TM7). Slouží jako komunikační spojení mezi kapsou vázající ligand a intracelulární oblasti asociované s G proteinem. Vzhledem ke stabilitě receptoru mají významnou roli disulfidické můstky v extracelulární oblasti, nejspíše vysoce konzervovaný můstek mezi extracelulární konci TM3 a ECL2. Intracelulární oblast obsahuje tři intracelulární smyčky (ICL1-ICL3), intracelulární amfipatický helix a C-konec. Účinkuje ve spojení s efektorovými molekulami, jako jsou G proteiny, arrestin nebo kinázy. (Venkatakrisnan *et al.*, 2013).

Ačkoliv zmíněná skupina receptorů typicky přenáší signál na G protein, našly se i GPCR zprostředkované signalizační dráhy nezávislé na této molekule (Sun *et al.*, 2007).

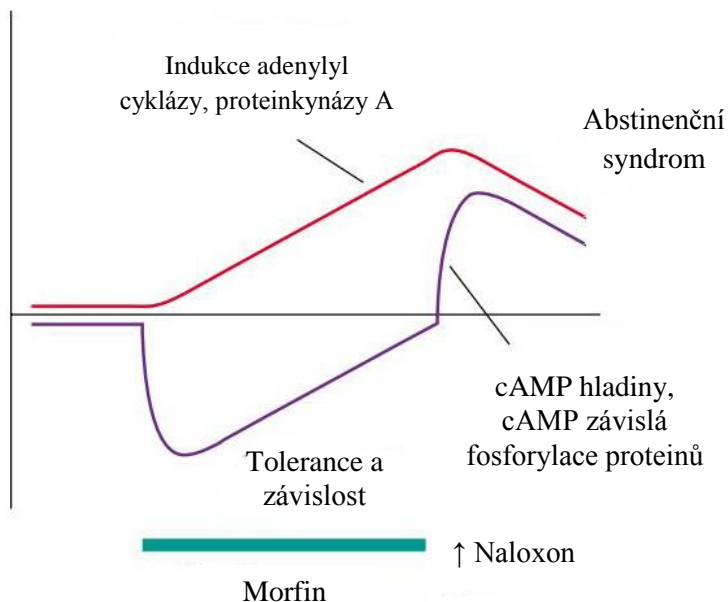
5.1.2. G protein

G proteiny jsou členy superrodiny GTPáz. Rodina G proteinů spojující receptor s vnitrobuněčnou signalizací má heterotrimerní složení a je spojená s plazmatickou membránou. Tyto proteiny se skládají ze tří podjednotek α , β a γ , poslední dvě vytvářejí komplex $\beta\gamma$. G proteiny jsou proteiny vázající guaninové nukleotidy, přičemž α podjednotka má schopnost vázat molekulu guanosintrifosfátu (GTP) a hydrolyzovat ji pomocí své

GTPázové domény na guanosindifosfát (GDP). (Neves *et al.*, 2002). Na této vlastnosti je založena přepínací funkce proteinu. Aktivace receptoru agonistou a jeho konformační změna indukuje vytváření komplexu receptor-G protein. Tím se aktivuje i G protein a disociuje G_{α} od $G_{\beta\gamma}$. Nejprve GDP opustí α podjednotku, na kterou se poté naváže GTP. Obě části proteinu mohou následovně ovlivnit efektory. Po určité době α podjednotka štěpí GTP a dochází ke znovuspojení s $\beta\gamma$ dimerem. Komplex se odpojí od GPCR, inaktivuje se a čeká na další stimulus (Morris & Malbon, 1999; Roux & Cottrell, 2014).

5.1.3. Efekторы

Mezi nejčastější efekторы G proteinů patří AC a PLC. PLC C hydrolyzuje fosfatidylinositol 4,5-bisfosfát na inositol 1,4,5-trisfosfát (IP_3) a diacylglycerol (DAG), které slouží v buňce jako druzí poslové. IP_3 se váže na Ca^{2+} kanál na povrchu endoplazmatického retikula a způsobí uvolnění Ca^{2+} , který může aktivovat další enzymy. DAG zůstává ukotven na membráně. Aktivuje mimo jiné PKC, která fosforylací dalších proteinů přenáší signál dále (Rebecchi & Pentylala, 2000). AC katalyzuje přeměnu adenosintrifosfátu na cyklický cAMP. Tento druhý posel má široký význam, typicky aktivuje protein kinázu A (PKA). Opioidy akutně inhibují funkční aktivitu cAMP dráhy (indikováno buněčnými hladinami cAMP a cAMP-závislé fosforylace proteinů).

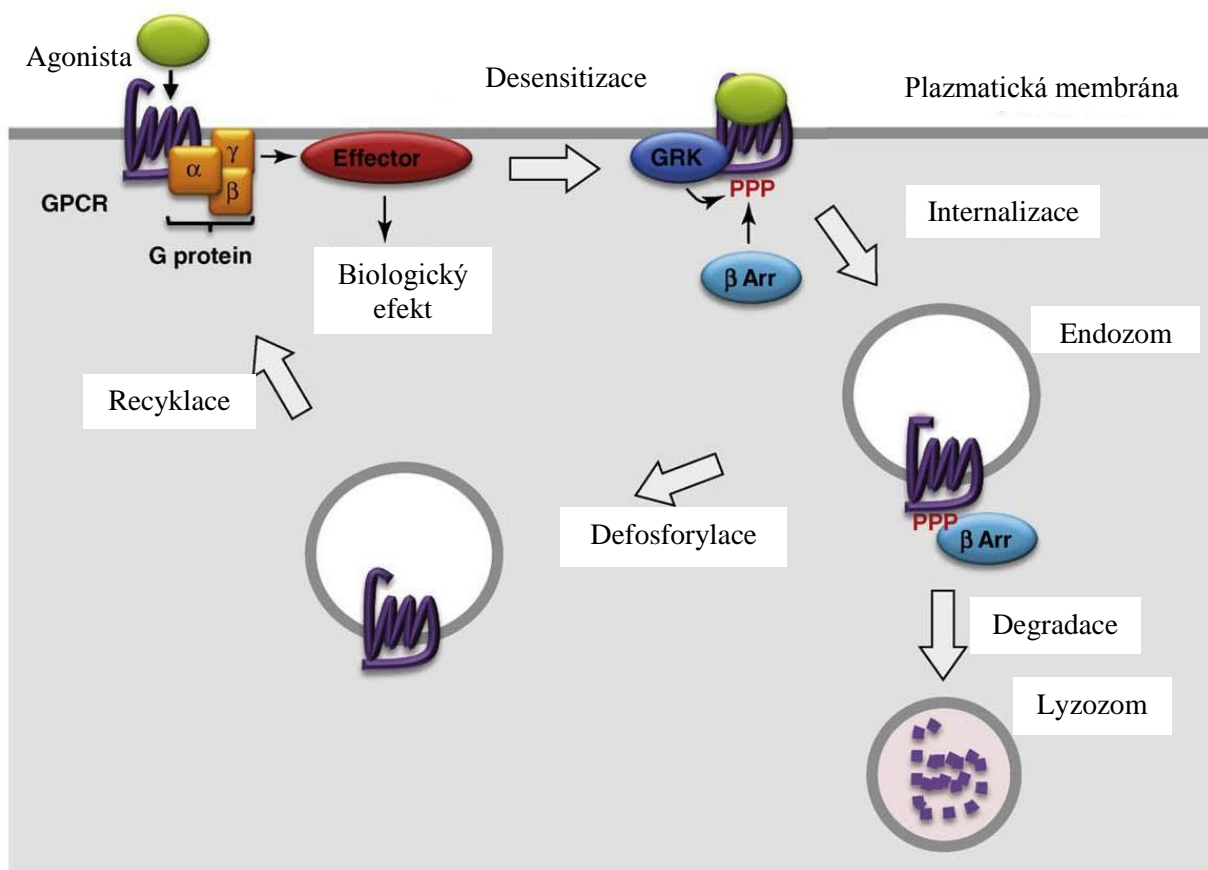


Obr. 5: Up-regulace cAMP dráhy jako mechanismus opiátové tolerance a závislosti (upraveno podle Nestler, 2004).

S pokračující expozici se funkční aktivita cAMP dráhy postupně obnoví. Po odstranění opiátů (podáním antagonistu naloxonu) se zvyšuje aktivita daleko nad kontrolní hladiny. Tyto změny ve funkčním stavu cAMP dráhy jsou zprostředkovány indukcí AC a PKA v reakci na chronické podávání opiátů. Indukce těchto enzymů je zodpovědná za postupné obnovení funkční aktivity cAMP dráhy počas chronické expozice opiátem (tolerance, závislost) a za aktivace, která se objeví při odnětí opiátů (abstinenční syndrom) (Nestler, 2004) (obr. 5).

5.1.4. Desensitizace

Schopnost receptorů přenášet signál může být regulována na úrovni jejich počtu nebo účinnosti. Jedním důležitým rysem signalizačních systémů používajících G protein je, že nejsou konstantní, ale zaznamenají dřívější aktivaci nebo sílu signálu. Zvýšená aktivace receptoru vede ke snížení schopnosti být stimulován (desensitizace), zatímco snížená aktivace vede ke zvýšené schopnosti být stimulován (sensitizace) (Gainetdinov *et al.*, 2004).



Obr. 6: GPCR signalizace a desensitizace. β Arr – β -arrestin, GRK – GPCR kináza, GPCR – receptor spřažené s G proteiny (upraveno podle Calebiro *et al.*, 2010).

Desensitizace byla původně sledovaná na β -adrenergním receptoru, ale časem se ukázal její význam ve vzniku tolerance po opakovaném užívání návykových látek (Bohn et al. 2000). Dva proteiny tvoří základ pro proces desensitizace: GPCRs kináza (GRK) a β -arrestin.

Konformační změna GPCR po aktivaci agonistou způsobí, že receptor se stane substrátem pro GRK. Tato serin/threonin kináza fosforyluje aminokyseliny na C-konci GPCR, což vyvolá vazbu β -arrestinu. Navázaná molekula β -arrestinu zabraňuje spojení G proteinu s receptorem a znemožní další signalizaci (Lohse et al. 1992; Lohse et al. 1990).

Desensitizace receptoru může vést až k jeho internalizaci. Vazba β -arrestinu s klatrinovým váčkem usnadňuje endocytózu receptoru (Goodman *et al.*, 1996), ale je známa i internalizace GPCR nezávislá na spojení s β -arrestinem (Zhang *et al.*, 1996). Sílu vazby mezi receptorem a β -arrestinem zvyšuje konzervovaný motiv na karboxylovém konci GPCR, který zajistí stabilitu komplexu uvnitř buňky a ovlivňuje kinetiku resensitizace receptoru (Oakley *et al.*, 2001) (Obr. 6).

5.1.5. Dopaminové receptory a jejich signalizace při závislosti

Extracelulární koncentrace DA je význačně důležitá v systému odměny, a proto i v averzivních nebo odměňujících podnětech. Kvůli tomu jsou jedním z nejdůležitějších GPCRů v průběhu vzniku závislosti DAR.

Účinek DA je zprostředkován rodinami GPCRů kódovanými nejméně pěti DAR geny (D1-D5). Na základě sekvenčních a farmakologických podobností jsou zařazeny do podtypů D1 (kam patří D1 a D5) a D2 (D2-D4). Ve striatu jsou lokalizovány převážně postsynapticky na dendritických trnech středních trnitých neuronů (Levey *et al.*, 1993). Podtypy D1 jsou spojené s $G\alpha_{s/olf}$ proteinem, stimulují produkci cAMP. Receptory podtypu D2 jsou naopak spojené s $G\alpha_{i/o}$ a negativně regulují cAMP syntézu (Beaulieu & Gainetdinov, 2011).

Jednou z centrálních molekul v DAR signální kaskádě je protein DARPP-32. Vysokou koncentraci této molekuly můžeme nalézt v MSNs (Ouimet *et al.*, 1998). Dopamin působící na D1 receptor vede k aktivaci PKA s následnou fosforylací DARPP-32 na aminokyselině Thr34. Ve fosforylované podobě DARPP-32 účinně inhibuje proteinfosfatázu-1 (PP-1). PP-1 ovlivní aktivitu různých proteinů včetně receptorů, kanálů a transkripčních faktorů. U myších modelů s chybějícím genem pro DARPP-32 kokain nestimuluje lokomoční aktivitu, myši ani nemají zvýšenou hladinu Δ FosB ve striatu, charakteristickou pro chronické podávání drog (Fienberg *et al.*, 1998). DARPP-32 také ovlivní dvě protichůdné formy synaptické plasticity, dlouhodobou depresi a potenciaci (Calabresi *et al.*, 2000). Aktivace D2R může vést k

inaktivaci DARPP-32. Signální kaskáda PLC – IP₃ – uvolnění Ca²⁺ aktivuje Ca²⁺/kalmomodulin-dependentní proteinfosfatázu kalcineurin, která defosforyluje DARPP-32 (Nishi *et al.*, 1997). Na signalizaci má inhibiční účinek i fosforylace Cdk5 kinázou na místě Thr75, která přemění DARPP-32 na PKA inhibitor (Bibb *et al.*, 1999)

Dalším proteinem, který je po užívání návykových látek hojně aktivovaný v neuronech přijímajících DA, je extracelulárně regulovaná kináza (extracellular signal-regulated kinase, ERK). ERK má významnou roli v synaptické plasticitě, stejně jako v učení a paměti. Aktivovaný ERK může ovlivnit expresi bezprostředně časných genů, jako jsou c-fos, zif268, Nurr77 nebo JunB prostřednictvím fosforylace transkripčních faktorů CREB nebo Elk-1 (Valjent *et al.*, 2004). Produkty těchto genů mohou být spojeny s odměňujícími účinky a dlouhodobými behaviorálními změnami (Valjent *et al.*, 2006).

5.2. Role transkripčních faktorů

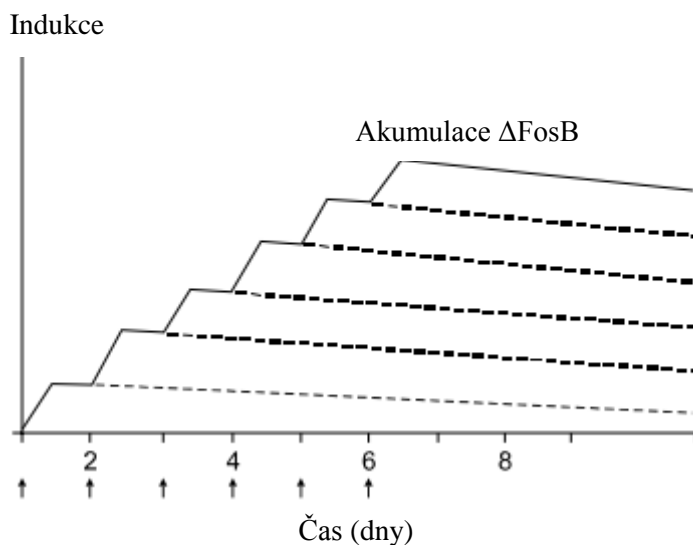
Transkripční faktory jsou proteiny, které se váží na responzivní elementy v promotorové oblasti cílových genů a regulují genovou expresi. Častými cíli jsou geny kódující neurotrofní faktory, které jsou zahrnuty v remodelaci neuronů po chronickém užívání návykových látek (Russo, Mazei-Robison, *et al.*, 2009).

5.2.1. ΔFosB

Přirozené a drogami navozené odměny sdílejí společné mechanismy neurální plasticity, v čem má významnou roli aktivace D1R v NAc a transkripční faktor ΔFosB. Jestliže jedinec ztrácí přirozené podněty vyvolávající odměnu, může dojít ke zvýšení náchylnosti k závislosti. Klíčovou roli v tomto procesu má ΔFosB a produkty jeho cílových genů (Pitchers *et al.*, 2013). Na základě předchozích výzkumů se dá předpokládat, že ΔFosB je nutná a postačující podmínka pro mnoho změn, které jsou způsobeny chronickým užíváním drog (Robison & Nestler, 2011).

Protein ΔFosB patří do Fos rodiny transkripčních faktorů kódovaných *FosB* genem. Každý představitel této skupiny je rychle a přechodně indukován v NAc a dalších mozkových strukturách při akutním působení mnoha drog. Jedině ale ΔFosB má schopnost se akumulovat po opakovaném užívání psychoaktivních látek (obr. 7). Tuto stabilitu získává po fosforylaci na aminokyselině Ser27 (Ulery-Reynolds *et al.*, 2009) a alternativním štěpením, které

odstraňuje destabilizující část aminokyselinové sekvence na C-konci (Carle *et al.*, 2007). Koncentrace Δ FosB se také zvýší v mozku po chronickém stresu (Perrotti *et al.*, 2004). Zdá se, že v odměňujících účincích kokainu je důležitá i N-koncová část proteinu. Alternativní produkt *fosB* genu, $\Delta 2\Delta$ FosB postrádající tuto část nezvyší odměňující účinky kokainu u pokusných zvířat (Ohnishi *et al.*, 2015). Na základě zmíněných vlastností lze považovat Δ FosB za trvalý molekulární přepínač, který pomáhá udržet stav závislosti (Nestler *et al.*, 2001). Ke stabilitě Δ FosB přispívá i vzájemná kontrola s CaMKII kinázou. Po zvýšení indukce kinázy v kůře NAc dochází k fosforylaci Δ FosB, který se tak ještě více hromadí v buňce (Robison *et al.*, 2013). Δ FosB se spojí s proteinem JunD a tvoří heterodimerní transkripční faktor AP-1. Komplex AP-1 zvyšuje nebo potlačuje exprese genů s AP-1 sekvencí v promotoru. Jejich produkty mohou hrát roli v synaptické plasticitě a dalších regulacích (Nestler, 2008).



Obr. 7: Akumulace Δ FosB. Při opakované stimulaci (zvislé šípky) indukuje každý podnět určitou nízkou hladinu Δ FosB (upraveno podle Nestler, 2012).

5.2.2. CREB

Protein vázající se v genomu na element odezvy cAMP (cAMP response element binding-protein, CREB) patří mezi nejvíce prostudované transkripční faktory. Po fosforylaci se CREB spojí s jaderným proteinem zvaným CBP (CREB-binding protein) (Chrivia *et al.*, 1993). CBP funguje jako koaktivátor. Po svém spojení mohou tyto proteiny aktivovat transkripci cílových genů, které v regulační oblasti obsahují CRE (cAMP-responsive element) místo o vysoce

konzervované sekvenci. Vazbu komplexu fosfo-CREB:CBP na CRE umožní motiv zinkového prstu na CBP (Montminy *et al.*, 1986; Kwok *et al.*, 1994). CREB aktivita v kůře NAc reguluje senzitivitu vůči odměňujícím i averzivním stimulům. Zvýšená CREB aktivita snižuje reakce pokusného zvířete na stimuly, zatímco snížení aktivity má opačný výsledek (Barrot *et al.*, 2002).

Důležitým proteinem regulovaným pomocí CREB je neurotrofní faktor BDNF, který po intoxikaci drogami může indukovat morfologické změny, jako jsou arborizace a polymerizace aktinu. Tyto změny mohou být základem pro trvalé zvýšení motivace pro kokain (Graham *et al.*, 2007). Podobně jako Δ FosB, i CREB ovlivní expresi dynorfinu. Má ale opačný efekt, stimuluje jeho syntézu, která poté silně inhibuje uvolnění DA z VTA (Carlezon *et al.*, 1998). CREB aktivita je spojená i s excitabilitou MSNs v NAc, s jeho zvyšující se expresí se zvýší i excitabilita buněk (Dong *et al.*, 2006).

CREB může aktivovat geny po chronickém užívání drog i ve VTA, a to různou měrou v jejích různých částech. Můžeme sem řadit geny pro tyrosinhydroxylázu a pro GluR1 subjednotku AMPA receptoru (Olson *et al.*, 2005).

5.2.3. NF κ B

Nukleární faktor kappa B (NF κ B) patří mezi cílová místa transkripčního faktoru Δ FosB. (Ang *et al.*, 2001). Ukázalo se, že kokain „up-reguluje“ NF κ B signalizaci v NAc a tato signální dráha je rozhodující pro řízení morfologie NAc neuronů, jakož i v sensitizaci odměňujících účinků kokainu. Zvýšená hustota dendritických trnů po spuštění NF κ B dráhy vyplývá ze schopnosti NF κ B aktivovat exprese genu pro BDNF (Russo, Wilkinson, *et al.*, 2009).

5.3. Epigenetické regulace

Epigenetiku můžeme definovat jako sérii biochemických procesů, jejichž prostřednictvím jsou změny v genové expresi dosažitelné během celého životního cyklu organismu beze změny v sekvenci DNA. Některé epigenetické změny jsou velice stabilní, což jim umožní zprostředkovat adaptační změny v mozku a náchylnost ke drogám (Nestler, 2014).

5.3.1. Modifikace histonů

DNA v buňce je organizována do struktury zvané chromatin. Jeho funkční jednotka je nukleosom skládající se z úseku DNA s délkou 147 nukleotidů ovinutého kolem histonového oktameru. Obsahuje oktamer basických proteinů H2A, H2B, H3, H4, které mohou být posttranslačně modifikovány na N-koncové části. Kovalentní vazba různých funkčních skupin změní vlastnosti proteinů a jejich interakce s DNA, takže i pravděpodobnost transkripce. Co se týče závislosti, nejrozsáhleji studované modifikace histonů jsou acetylace a metylace (Walker *et al.*, 2015).

Připojením acetylové skupiny na aminokyselinu lysin dekondukuje určitý úsek DNA a umožňuje transkripci. Enzym vykonávající tuto vazbu je histon acetyltransferáza, opačný úkol má histon deacetyláza (Kouzarides, 2007). Opakovaná expozice různým návykovým látkám zvýší hladinu acetylace ve strukturách systému odměny. V pokusu s kokainem se ukázalo, že akutní působení zvýšilo v NAc acetylaci H4, čímž ovlivnilo geny *cFos* a *FosB*. Chronické efekty byly omezeny na H3, kde ze sledovaných genů byly aktivovány *FosB*, *Cdk5* a *BDNF*. Výsledky ukazují, že v případě *FosB* promotoru dochází k přepínání z acetylace H4 na H3 po chronické expozici. Postupné hromadění Δ FosB, jako reakce na opakované užívání kokainu, přitahuje k cílovým genům chromatin remodelující faktory, které usnadňují transkripci. Takto způsobená dlouhodobá remodelace genů, jakými jsou *Cdk5* a *BDNF* může vést k neurální a behaviorální plasticitě (Kumar *et al.*, 2005). Expresí proteinů SIRT1 a SIRT2 je také zvýšená acetylací po opakované intoxikaci kokainem. Jelikož jde o deacetylázy, dále mohou regulovat syntézu proteinů a zesilovat odměňující účinky (Renthal *et al.*, 2009).

Methylace histonů může buď zvýšit nebo potlačit genovou aktivitu v závislosti na části, která je metylována. Histonmetyltransferáza katalyzuje napojení metylové skupiny, histondemetyláza její odstranění (Nestler, 2014). Nedávný výzkum ukázal, že kokain může vyvolat odlišný stupeň metylace v různých částech genomu v NAc (Feng *et al.*, 2014).

Zajímavým enzymem v regulaci je histonmethyltransferáza G9a. Katalyzuje dimetylací H3 na místě lysin9 (H3K9me2), čímž inhibuje expresi proteinů hrajících roli v dendritické plasticitě. Zvýšená hladina Δ FosB po chronické konzumaci kokainu „down-reguluje“ G9a. Tím také reguluje geny, které jsou cílem pro G9a, kam patří i *FosB*. Následkem potlačení G9a je růst hustoty dendritických trnů a dendritická plasticita (Maze *et al.*, 2010). Funkce G9a má dopad i na vznikající subtypy striatálních MSNs během vývoje, což může ovlivnit i kokain (Maze *et al.*, 2014). Acetylace a metylace se mohou vzájemně ovlivňovat a tímto způsobem kontrolovat sensitivitu vůči psychostimulantům (Kennedy *et al.*, 2013).

5.3.2. DNA metylace

DNA metylace je epigenetický mechanismus, při kterém dochází k přenosu metylové skupiny do C5 polohy cytosinu za vzniku 5-metylcytosinu. Je katalyzována DNA metyltransferázou (Dnmt), většinou na CpG dinukleotidech. DNA metylace reguluje expresi genu proteiny zapojených do represe genu nebo inhibicí vazby transkripčních faktorů (Moore *et al.*, 2012).

Nadměrná exprese enzymu Dnmt3a v NAc vyvolává podobné zvýšení hustoty dendritických trnů jako kokain, kdežto jeho inhibice blokuje působení kokainu (LaPlant *et al.*, 2010). Enzymy TET zprostředkují přeměnu 5-metylcytosinu na 5-hydroxymetylcytosin, což je krok směrem k demetylaci. Po opakovaném užívání kokainu se snížila jejich exprese v NAc. V případě typu TET1 pokleslá hladina přispívá k zesílení behaviorálních odpovědí vůči droze. Byla sledována i pozměněná úroveň 5-hydroxymetylcytosinu, genové exprese a alternativního sestřihu u genů účinkujících ve vzniku závislosti (Feng *et al.*, 2015).

Transkripční faktor protein 2 vázající methyl-CpG (MeCP2) se váže na metylovaný cytosin, rekrutuje histon deacetylázy a další represory transkripce, aby utlumil cílové geny (Im *et al.*, 2010). Jeho interakce s mikroRNA miR-212 vedoucí k regulaci genů *BDNF* ve striatu a motivačního charakteru kokainu dobře ukazuje, jak složité mohou být molekulární děje, které vedou k synaptické plasticitě a závislosti (Im *et al.*, 2010).

6. Závěr

Mým cílem v této bakalářské práci bylo popsat dosud známé důležité molekulární mechanismy, které hrají roli ve vzniku závislosti. Protože působení návykových látek je komplexní děj na úrovni organismu, buňky i DNA, bylo také nezbytné zmínit některé mozkové struktury a membránové proteiny, které jsou zapojené při intoxikaci. Proteiny Δ FosB, CREB a NF κ B jsou příklady už známých transkripčních faktorů, které význačně přispívají k opakovanému užívání drog. V budoucnosti může být jedním z cílů objevení dalších regulačních proteinů a hlavně zjistit jejich cílové geny. V každém případě musíme lépe porozumět kaskádě zprostředkovávající signály od aktivace neuronů drogami až k modifikaci DNA. Výzkum molekulárních mechanismů vedoucích ke vzniku závislosti přispívá k rozpoznání pochodů, které se mohou objevit i v dalších fyziologických nebo patologických procesech.

7. Seznam použité literatury

- Adinoff, B. (2004) Neurobiologic processes in drug reward and addiction. *Harv. Rev. Psychiatry*, **12**, 305–320.
- Allouche, S., Noble, F., & Marie, N. (2014) Opioid receptor desensitization: mechanisms and its link to tolerance. *Front. Pharmacol.*, **5**, 1–20.
- American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition. Arlington, VA, American Psychiatric Association, 2013.
- Ang, E., Chen, J., Zagouras, P., Magna, H., Holland, J., Schaeffer, E., & Nestler, E.J. (2001) Induction of nuclear factor-kappaB in nucleus accumbens by chronic cocaine administration. *J. Neurochem.*, **79**, 221–224.
- Balcita-Pedicino, J.J., Omelchenko, N., Bell, R., & Sesack, S.R. (2011) The inhibitory influence of the lateral habenula on midbrain dopamine cells: Ultrastructural evidence for indirect mediation via the rostromedial mesopontine tegmental nucleus. *J. Comp. Neurol.*, **519**, 1143–1164.
- Bale, T.L. & Vale, W.W. (2004) CRF and CRF receptors: role in stress responsivity and other behaviors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **44**, 525–557.
- Barnard, E. a, Skolnick, P., Olsen, R.W., Mohler, H., Sieghart, W., Biggio, G., Braestrup, C., Bateson, a N., & Langer, S.Z. (2008) International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol. Rev.*, **60**, 243–260.
- Barrot, M., Olivier, J.D. a, Perrotti, L.I., DiLeone, R.J., Berton, O., Eisch, A.J., Impey, S., Storm, D.R., Neve, R.L., Yin, J.C., Zachariou, V., & Nestler, E.J. (2002) CREB activity in the nucleus accumbens shell controls gating of behavioral responses to emotional stimuli. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**, 11435–11440.
- Baxter, M.G., Murray, E. a, & Hall, W.J. (2002) The amygdala and reward. *Nat. Rev. Neurosci.*, **3**, 563–573.
- Beaulieu, J.-M. & Gainetdinov, R.R. (2011) The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol. Rev.*, **63**, 182–217.
- Beuming, T., Kniazeff, J., Bergmann, M.L., Shi, L., Gracia, L., Raniszewska, K., Newman, A.H., Javitch, J. a, Weinstein, H., Gether, U., & Loland, C.J. (2008) The binding sites for cocaine and dopamine in the dopamine transporter overlap. *Nat. Neurosci.*, **11**, 780–789.
- Bibb, J. a, Snyder, G.L., Nishi, a, Yan, Z., Meijer, L., Fienberg, a a, Tsai, L.H., Kwon, Y.T., Girault, J. a, Czernik, a J., Haganir, R.L., Hemmings, H.C., Nairn, a C., & Greengard, P. (1999) Phosphorylation of DARPP-32 by Cdk5 modulates dopamine signalling in neurons. *Nature*, **402**, 669–671.

- Bohn, L.M., Gainetdinov, R.R., Lin, F.T., Lefkowitz, R.J., & Caron, M.G. (2000) Mu-opioid receptor desensitization by beta-arrestin-2 determines morphine tolerance but not dependence. *Nature*, **408**, 720–723.
- Bossert, J.M. & Stern, A.L. (2012) Role of ventral subiculum in context-induced reinstatement of heroin seeking in rats. *Addict. Biol.*, **1**, 338–342.
- Brudzynski, S & Gibson, C. (1997) Release of dopamine in the nucleus accumbens caused by stimulation of the subiculum in freely moving rats. *Brain Research Bulletin*, **42**, 303-308
- Bunzow, J.R., Sonders, M.S., Arttamangkul, S., Harrison, L.M., Zhang, G., Quigley, D.I., Darland, T., Suchland, K.L., Pasumamula, S., Kennedy, J.L., Olson, S.B., Magenis, R.E., Amara, S.G., & Grandy, D.K. (2001) Amphetamine, 3,4-methylenedioxymethamphetamine, lysergic acid diethylamide, and metabolites of the catecholamine neurotransmitters are agonists of a rat trace amine receptor. *Mol. Pharmacol.*, **60**, 1181–1188.
- Bzdok, D., Laird, A.R., Zilles, K., Fox, P.T., & Eickhoff, S.B. (2013) An investigation of the structural, connectional, and functional subspecialization in the human amygdala. *Hum. Brain Mapp.*, **34**, 3247–3266.
- Calabresi, P., Gubellini, P., Centonze, D., Picconi, B., Bernardi, G., Chergui, K., Svenningsson, P., Fienberg, a a, & Greengard, P. (2000) Dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein 32 kDa controls both striatal long-term depression and long-term potentiation, opposing forms of synaptic plasticity. *J. Neurosci.*, **20**, 8443–8451.
- Calebiro, D., Nikolaev, V.O., Persani, L., & Lohse, M.J. (2010) Signaling by internalized G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol. Sci.*, **31**, 221–228.
- Carle, T.L., Ohnishi, Y.N., Ohnishi, Y.H., Alibhai, I.N., Wilkinson, M.B., Kumar, A., & Nestler, E.J. (2007) Proteasome-dependent and -independent mechanisms for FosB destabilization: Identification of FosB degron domains and implications for Δ FosB stability. *Eur. J. Neurosci.*, **25**, 3009–3019.
- Carlezon, W. a, Thome, J., Olson, V.G., Lane-Ladd, S.B., Brodtkin, E.S., Hiroi, N., Duman, R.S., Neve, R.L., & Nestler, E.J. (1998) Regulation of cocaine reward by CREB. *Science*, **282**, 2272–2275.
- Carvalho, M., Carmo, H., Costa, V.M., Capela, J.P., Pontes, H., Remião, F., Carvalho, F., & De Lourdes Bastos, M. (2012) Toxicity of amphetamines: An update. *Arch. Toxicol.*, **86**, 1167–1231.
- Cestari I, Uchida Ichiro, Li Li, Burt David, Y.J. (1996) The agonistic action of pentobarbital on GABAA β -subunit homomeric receptors. *Neuroreport*, **7**, 943-947.
- Chalmers, D.T., Lovenberg, W., & Souza, E.B. De (1995) Localization of Novel Corticotropin-Releasing Factor Receptor (CRF2) mRNA Expression to Specific Subcortical Nuclei in Rat Brain: Comparison with CRF1 Receptor mRNA Expression. *J. Neurosci.*, **15**, 6340–6350.

- Chen, R., Furman, C. a, Zhang, M., Kim, M.N., Gereau, R.W., Leitges, M., & Gnegy, M.E. (2009) Protein kinase C β is a critical regulator of dopamine transporter trafficking and regulates the behavioral response to amphetamine in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **328**, 912–920.
- Chiara, D.C., Jayakar, S.S., Zhou, X., Zhang, X., Savechenkov, P.Y., Bruzik, K.S., Miller, K.W., & Cohen, J.B. (2013) Specificity of intersubunit general anesthetic-binding sites in the transmembrane domain of the human $\alpha 1\beta 3\gamma 2$ α -aminobutyric acid type A (GABAA) receptor. *J. Biol. Chem.*, **288**, 19343–19357.
- Childress, A.R., Mozley, P.D., McElgin, W., Fitzgerald, J., Reivich, M., & O'Brien, C.P. (1999) Limbic activation during cue-induced cocaine craving. *Am. J. Psychiatry*, **156**, 11–18.
- Chrivia, J.C., Kwok, R.P., Lamb, N., Hagiwara, M., Montminy, M.R., & Goodman, R.H. (1993) Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature*, **365**, 855–859.
- Cunha-Oliveira, T., Rego, A.C., & Oliveira, C.R. (2008) Cellular and molecular mechanisms involved in the neurotoxicity of opioid and psychostimulant drugs. *Brain Res. Rev.*, **58**, 192–208.
- Di Chiara, G. & Imperato, A. (1988) Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **85**, 5274–5278.
- Dong, Y., Green, T., Saal, D., Marie, H., Neve, R., Nestler, E.J., & Malenka, R.C. (2006) CREB modulates excitability of nucleus accumbens neurons. *Nat. Neurosci.*, **9**, 475–477.
- Feng, J., Shao, N., Szulwach, K.E., Vialou, V., Huynh, J., Zhong, C., Le, T., Ferguson, D., Cahill, M.E., Li, Y., Koo, J.W., Ribeiro, E., Labonte, B., Laitman, B.M., Estey, D., Stockman, V., Kennedy, P., Couroussé, T., Mensah, I., Turecki, G., Faull, K.F., Ming, G., Song, H., Fan, G., Casaccia, P., Shen, L., Jin, P., & Nestler, E.J. (2015) Role of Tet1 and 5-hydroxymethylcytosine in cocaine action. *Nat. Neurosci.*, **18**, 536–544.
- Feng, J., Wilkinson, M., Liu, X., Purushothaman, I., Ferguson, D., Vialou, V., Maze, I., Shao, N., Kennedy, P., Koo, J., Dias, C., Laitman, B., Stockman, V., Laplant, Q., Cahill, M., Nestler, E.J., & Shen, L. (2014) Chronic cocaine-regulated epigenomic changes in mouse nucleus accumbens. *Genome Biol.*, **15**, R65.
- Ferris, M.J., Calipari, E.S., Rose, J.H., Siciliano, C.A., Sun, H., Chen, R., & Jones, S.R. (2015) A single amphetamine infusion reverses deficits in dopamine nerve-terminal function caused by a history of cocaine self-administration. *Neuropsychopharmacology*, **40**, 1826–1836.
- Fienberg, A.A., Hiroi, N., Mermelstein, P.G., Song, W., Snyder, G.L., Nishi, A., Cheramy, A., O'Callaghan, J.P., Miller, D.B., Cole, D.G., Corbett, R., Haile, C.N., Cooper, D.C., Onn, S.P., Grace, A.A., Ouimet, C.C., White, F.J., Hyman, S.E., Surmeier, D.J., Girault, J., Nestler, E.J., & Greengard, P. (1998) DARPP-32: regulator of the efficacy of dopaminergic neurotransmission. *Science*, **281**, 838–842.

- Floresco, S.B., Todd, C.L., & Grace, A.A. (2001) Glutamatergic afferents from the hippocampus to the nucleus accumbens regulate activity of ventral tegmental area dopamine neurons. *J. Neurosci.*, **21**, 4915–4922.
- Fredriksson, R., Lagerström, M.C., Lundin, L.-G., & Schiöth, H.B. (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogue groups, and fingerprints. *Mol. Pharmacol.*, **63**, 1256–1272.
- Gainetdinov, R.R., Premont, R.T., Bohn, L.M., Lefkowitz, R.J., & Caron, M.G. (2004) Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions. *Annu. Rev. Neurosci.*, **27**, 107–144.
- Giros, B., El Mestikawy, S., Bertrand, L., & Caron, M.G. (1991) Cloning and functional characterization of a cocaine-sensitive dopamine transporter. *FEBS Lett.*, **295**, 149–154.
- Giros, B., Jaber, M., Jones, S.R., Wightman, R.M., & Caron, M.G. (1996) Hyperlocomotion and indifference to cocaine and amphetamine in mice lacking the dopamine transporter. *Nature*, **379**, 606–612.
- Goldstein, R.Z. & Volkow, N.D. (2002) Drug addiction and its underlying neurobiological basis: neuroimaging evidence for the involvement of the frontal cortex. *Am. J. Psychiatry*, **159**, 1642–1652.
- Goodman, O.B., Krupnick, J.G., Santini, F., Gurevich, V. V, Penn, R.B., Gagnon, A.W., Keen, J.H., & Benovic, J.L. (1996) Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature*, **383**, 447–450.
- Graham, D.L., Edwards, S., Bachtell, R.K., DiLeone, R.J., Rios, M., & Self, D.W. (2007) Dynamic BDNF activity in nucleus accumbens with cocaine use increases self-administration and relapse. *Nat. Neurosci.*, **10**, 1029–1037.
- Heimer, L. & Alheid G.F. (1991) Piecing together the puzzle of basal forebrain anatomy. *Adv Exp Med Biol.*, **295**, 1–42.
- Heal, D.J., Gosden, J., & Smith, S.L. (2014) Dopamine reuptake transporter (DAT) “inverse agonism” - A novel hypothesis to explain the enigmatic pharmacology of cocaine. *Neuropharmacology*, **87**, 19–40.
- Im, H.-I., Hollander, J. A, Bali, P., & Kenny, P.J. (2010) MeCP2 controls BDNF expression and cocaine intake through homeostatic interactions with microRNA-212. *Nat. Neurosci.*, **13**, 1120–1127.
- Johnson, S.W. & North, R. a (1992) Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *J. Neurosci.*, **12**, 483–488.
- Jones, S.R., Gainetdinov, R.R., Wightman, R.M., & Caron, M.G. (1998) Mechanisms of amphetamine action revealed in mice lacking the dopamine transporter. *J. Neurosci.*, **18**, 1979–1986.

- Kahlig, K.M., Binda, F., Khoshbouei, H., Blakely, R.D., McMahon, D.G., Javitch, J. A, & Galli, A. (2005) Amphetamine induces dopamine efflux through a dopamine transporter channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **102**, 3495–3500.
- Kalivas, P.W. & Volkow, N.D. (2005) The Neural Basis of Addiction:A Pathology of Motivation and Choice. *Am. J. Psychiatry*, **162**, 1403–1413.
- Kennedy, P.J., Feng, J., Robison, A., Maze, I., Badimon, A., Mouzon, E., Chaudhury, D., Damez-Werno, D., Haggarty, S., Han, M.-H., Bassel-Duby, R., Olson, E., & Nestler, E. (2013) Class I HDAC inhibition blocks cocaine-induced plasticity by targeted changes in histone methylation. *Nat. Neurosci.*, **16**, 434–440.
- Koob, G.F. & Zorrilla, E.P. (2010) Neurobiological mechanisms of addiction: focus on corticotropin-releasing factor. *Curr. Opin. Investig. Drugs*, **11**, 63–71.
- Kouzarides, T. (2007) Chromatin Modifications and Their Function. *Cell*, **128**, 693–705.
- Kumar, A., Choi, K.H., Renthal, W., Tsankova, N.M., Theobald, D.E.H., Truong, H.T., Russo, S.J., LaPlant, Q., Sasaki, T.S., Whistler, K.N., Neve, R.L., Self, D.W., & Nestler, E.J. (2005) Chromatin Remodeling Is a Key Mechanism Underlying Cocaine-Induced Plasticity in Striatum. *Neuron*, **48**, 303–314.
- Kwok, R.P., Lundblad, J.R., Chrivia, J.C., Richards, J.P., Bächinger, H.P., Brennan, R.G., Roberts, S.G., Green, M.R., & Goodman, R.H. (1994) Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *Nature*, **370**, 223–226.
- Lanteaume, L., Khalfa, S., Régis, J., Marquis, P., Chauvel, P., & Bartolomei, F. (2007) Emotion induction after direct intracerebral stimulations of human amygdala. *Cereb. Cortex*, **17**, 1307–1313.
- LaPlant, Q., Vialou, V., Covington, H.E., Dumitriu, D., Feng, J., Warren, B.L., Maze, I., Dietz, D.M., Watts, E.L., Iñiguez, S.D., Koo, J.W., Mouzon, E., Renthal, W., Hollis, F., Wang, H., Noonan, M. A, Ren, Y., Eisch, A.J., Bolaños, C. A, Kabbaj, M., Xiao, G., Neve, R.L., Hurd, Y.L., Oosting, R.S., Fan, G., Morrison, J.H., & Nestler, E.J. (2010) Dnmt3a regulates emotional behavior and spine plasticity in the nucleus accumbens. *Nat. Neurosci.*, **13**, 1137–1143.
- Law, P., Wong, Y.H., & Loh, H.H. (2000) Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **40**, 389–430.
- Leeb-Lundberg, F., Snowman, a, & Olsen, R.W. (1980) Barbiturate receptor sites are coupled to benzodiazepine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **77**, 7468–7472.
- Legault, M., Rompré, P.P., & Wise, R. a (2000) Chemical stimulation of the ventral hippocampus elevates nucleus accumbens dopamine by activating dopaminergic neurons of the ventral tegmental area. *J. Neurosci.*, **20**, 1635–1642.
- Levey, a I., Hersch, S.M., Rye, D.B., Sunahara, R.K., Niznik, H.B., Kitt, C. a, Price, D.L., Maggio, R., Brann, M.R., & Ciliax, B.J. (1993) Localization of D1 and D2 dopamine

- receptors in brain with subtype-specific antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **90**, 8861–8865.
- Logrip, M.L., Koob, G.F., & Zorrilla, E.P. (2011) Role of corticotropin-releasing factor in drug addiction: Potential for pharmacological intervention. *CNS Drugs*, **25**, 271–287.
- Lohse, M., Benovic, J., Codina, J., Caron, M., & Lefkowitz, R. (1990) beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science*, **248**, 1547-1550.
- Lohse MJ, Andexinger S, Pitcher J, Trukawinski S, Codina J, Faure JP, Caron MG, L.R. (1992) Receptor-specific Desensitization with Purified Proteins. *J Biol Chem*, **267**, 8558–8564.
- Lüscher, C. & Ungless, M.A. (2006) The mechanistic classification of addictive drugs. *PLoS Med.* **3**, 2005-2010.
- Macdonald, B.Y.R.L., Rogers, C.J., & Twyman, R.O.Y.E. (1989) Barbiturate regulation of kinetic properties of the GABAA receptor channel of mouse spinal neurones in culture. *J. Physiol.*, **417**, 483–500.
- Masson, J., Sagné, C., Hamon, M., & El Mestikawy, S. (1999) Neurotransmitter transporters in the central nervous system. *Pharmacol. Rev.*, **51**, 439–464.
- Matthes, H., Maldonado, R., Simonin, F., Valverde, O., Slowe, S., Kitchen, I., Befort, K., Dierich, A., Le Meur, M., Dollé, P., Tzavara, E., Hanoune, J., Roques, B., & Kieffer, B. (1996) Loss of morphine induced analgesia, reward effect and withdrawal. *Nature*, **383**, 819-823.
- Maze, I., Chaudhury, D., Dietz, D.M., Von Schimmelmann, M., Kennedy, P.J., Lobo, M.K., Sullivan, S.E., Miller, M.L., Bagot, R.C., Sun, H., Turecki, G., Neve, R.L., Hurd, Y.L., Shen, L., Han, M.-H., Schaefer, A., & Nestler, E.J. (2014) G9a influences neuronal subtype specification in striatum. *Nat. Neurosci.*, **17**, 533–539.
- Maze, I., Iii, H.E.C., Dietz, D.M., Laplant, Q., Renthal, W., Russo, S.J., Mechanic, M., Mouzon, E., Neve, R.L., Stephen, J., Ren, Y., Sampath, S.C., Hurd, Y.L., Greengard, P., Tarakhovskiy, A., Schaefer, A., & Nestler, E.J. (2010) Essential Role of the Histone Methyltransferase G9a in Cocaine Induced Plasticity. *Science (80-.)*, **327**, 213–216.
- Montminy, M.R., Sevarino, K.A., Wagnertt, J.A., Mandel, G., & Goodman, R.H. (1986) Identification of a cyclic-AMP-responsive element within the rat somatostatin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **83**, 6682–6686.
- Moore, L.D., Le, T., & Fan, G. (2012) DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacology*, **38**, 23–38.
- Morris, a J. & Malbon, C.C. (1999) Physiological regulation of G protein-linked signaling. *Physiol. Rev.*, **79**, 1373–1430.
- Nardou, R., Yamamoto, S., Bhar, A., Burnashev, N., Ben-Ari, Y., & Khalilov, I. (2011) Phenobarbital but Not Diazepam Reduces AMPA/kainate Receptor Mediated Currents

- and Exerts Opposite Actions on Initial Seizures in the Neonatal Rat Hippocampus. *Front. Cell. Neurosci.*, **5**, 16.
- Nestler, E.J. (1996) Under siege: The brain on opiates. *Neuron*, **16**, 897–900.
- Nestler, E.J. (2004) Historical review: Molecular and cellular mechanisms of opiate and cocaine addiction. *Trends Pharmacol. Sci.*, **25**, 210–218.
- Nestler, E.J. (2008) Review. Transcriptional mechanisms of addiction: role of Δ FosB. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **363**, 3245–3255.
- Nestler, E.J. (2012) Transcriptional mechanisms of drug addiction. *Clin. Psychopharmacol. Neurosci.*, **10**, 136–143.
- Nestler, E.J. (2014) Epigenetic mechanisms of drug addiction. *Neuropharmacology*, **76**, 259–268.
- Nestler, E.J., Barrot, M., & Self, D.W. (2001) DeltaFosB: a sustained molecular switch for addiction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **98**, 11042–11046.
- Neves, S.R., Ram, P.T., & Iyengar, R. (2002) G protein pathways. *Science*, **296**, 1636–1639.
- Nishi, a, Snyder, G.L., & Greengard, P. (1997) Bidirectional regulation of DARPP-32 phosphorylation by dopamine. *J. Neurosci.*, **17**, 8147–8155.
- Nutt, D., King, L. a., Saulsbury, W., & Blakemore, C. (2007) Development of a rational scale to assess the harm of drugs of potential misuse. *Lancet*, **369**, 1047–1053.
- Oakley, R.H., Laporte, S. a., Holt, J. a., Barak, L.S., & Caron, M.G. (2001) Molecular Determinants Underlying the Formation of Stable Intracellular G Protein-coupled Receptor- β -Arrestin Complexes after Receptor Endocytosis. *J. Biol. Chem.*, **276**, 19452–19460.
- Ohnishi, Y.N., Ohnishi, Y.H., Vialou, V., Mouzon, E., LaPlant, Q., Nishi, A., & Nestler, E.J. (2015) Functional role of the N-terminal domain of Δ FosB in response to stress and drugs of abuse. *Neuroscience*, **284**, 165–170.
- Olson, V.G., Zabetian, C.P., Bolanos, C. a, Edwards, S., Barrot, M., Eisch, A.J., Hughes, T., Self, D.W., Neve, R.L., & Nestler, E.J. (2005) Regulation of drug reward by cAMP response element-binding protein: evidence for two functionally distinct subregions of the ventral tegmental area. *J. Neurosci.*, **25**, 5553–5562.
- Ouimet, C.C., Langley-Gullion, K.C., & Greengard, P. (1998) Quantitative immunocytochemistry of DARPP-32-expressing neurons in the rat caudatoputamen. *Brain Res.*, **808**, 8–12.
- Partilla, J.S., Dempsey, A.G., Nagpal, A.S., Blough, B.E., Baumann, M.H., & Rothman, R.B. (2006) Interaction of amphetamines and related compounds at the vesicular monoamine transporter. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **319**, 237–246.

- Paton, J.J., Belova, M. A, Morrison, S.E., & Salzman, C.D. (2006) The primate amygdala represents the positive and negative value of visual stimuli during learning. *Nature*, **439**, 865–870.
- Peng, J., Sarkar, S., & Chang, S.L. (2012) Opioid receptor expression in human brain and peripheral tissues using absolute quantitative real-time RT-PCR. *Drug Alcohol Depend.*, **124**, 223–228.
- Perogamvros, L. & Schwartz, S. (2012) The roles of the reward system in sleep and dreaming. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **36**, 1934–1951.
- Perrotti, L.I., Hadeishi, Y., Ulery, P.G., Barrot, M., Monteggia, L., Duman, R.S., & Nestler, E.J. (2004) Induction of Δ FosB in reward-related brain structures after chronic stress. *J. Neurosci.*, **24**, 10594–10602.
- Pitchers, K.K., Vialou, V., Nestler, E.J., Laviolette, S.R., Lehman, M.N., & Coolen, L.M. (2013) Natural and drug rewards act on common neural plasticity mechanisms with Δ FosB as a key mediator. *J. Neurosci.*, **33**, 3434–3442.
- Pizzo, A. B., Karam, C.S., Zhang, Y., Ma, C.L., McCabe, B.D., & Javitch, J. A. (2014) Amphetamine-induced behavior requires CaMKII-dependent dopamine transporter phosphorylation. *Mol. Psychiatry*, **19**, 279–281.
- Rebecchi, M.J. & Pentylala, S.N. (2000) Structure , Function , and Control of Phosphoinositide-Specific Phospholipase C. *Physiol. Rev.*, **80**, 1291–1335.
- Renthal, W., Kumar, A., Xiao, G., Wilkinson, M., Covington, H.E., Maze, I., Sikder, D., Robison, A.J., LaPlant, Q., Dietz, D.M., Russo, S.J., Vialou, V., Chakravarty, S., Kodadek, T.J., Stack, A., Kabbaj, M., & Nestler, E.J. (2009) Genome-wide Analysis of Chromatin Regulation by Cocaine Reveals a Role for Sirtuins. *Neuron*, **62**, 335–348.
- Ritz, M.C., Lamb, R.J., Goldberg, S.R., & Kuhar, M.J. (1987) Cocaine receptors on dopamine transporters are related to self-administration of cocaine. *Science*, **237**, 1219–1223.
- Robinson, T.E. & Kolb, B. (1997) Persistent structural modifications in nucleus accumbens and prefrontal cortex neurons produced by previous experience with amphetamine. *J. Neurosci.*, **17**, 8491–8497.
- Robison, A.J. & Nestler, E.J. (2011) Transcriptional and epigenetic mechanisms of addiction. *Nat. Rev. Neurosci.*, **12**, 623–637.
- Robison, A.J., Vialou, V., Mazei-Robison, M., Feng, J., Kourrich, S., Collins, M., Wee, S., Koob, G., Turecki, G., Neve, R., Thomas, M., & Nestler, E.J. (2013) Behavioral and structural responses to chronic cocaine require a feedforward loop involving DeltaFosB and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in the nucleus accumbens shell. *J. Neurosci.*, **33**, 4295–4307.
- Roux, B.T. & Cottrell, G.S. (2014) *G Protein-Coupled Receptors: What a Difference a “Partner” Makes.* *International Journal of Molecular Sciences*, **15**, 1112-1142.

- Russo, S.J., Mazei-Robison, M.S., Ables, J.L., & Nestler, E.J. (2009) Neurotrophic factors and structural plasticity in addiction. *Neuropharmacology*, **56**, 73–82.
- Russo, S.J., Wilkinson, M.B., Mazei-Robison, M.S., Dietz, D.M., Maze, I., Krishnan, V., Renthal, W., Graham, A., Birnbaum, S.G., Green, T. a, Robison, B., Lesselyong, A., Perrotti, L.I., Bolaños, C. a, Kumar, A., Clark, M.S., Neumaier, J.F., Neve, R.L., Bhakar, A.L., Barker, P. a, & Nestler, E.J. (2009) Nuclear factor kappa B signaling regulates neuronal morphology and cocaine reward. *J. Neurosci.*, **29**, 3529–3537.
- Schober, a., Sokolova, E., & Gingrich, K.J. (2010) Pentobarbital inhibition of human recombinant α 1A P/Q-type voltage-gated calcium channels involves slow, open channel block. *Br. J. Pharmacol.*, **161**, 365–383.
- Steffensen, S.C., Bradley, K.D., Hansen, D.M., Wilcox, J.D., Wilcox, R.S., Allison, D.W., Merrill, C.B., & Edwards, J.G. (2011) The role of connexin-36 gap junctions in alcohol intoxication and consumption. *Synapse*, **65**, 695–707.
- Sulzer, D. (2011) How Addictive Drugs Disrupt Presynaptic Dopamine Neurotransmission. *Neuron*, **69**, 628–649.
- Sulzer, D., Chen, T.K., Lau, Y.Y., Kristensen, H., Rayport, S., & Ewing, a (1995) Amphetamine redistributes dopamine from synaptic vesicles to the cytosol and promotes reverse transport. *J. Neurosci.*, **15**, 4102–4108.
- Sulzer, D. & Rayport, S. (1990) Amphetamine and other psychostimulants reduce pH gradients in midbrain dopaminergic-neurons and chromaffin granules - a mechanism of action. *Neuron*, **5**, 797-808.
- Sun, Y., Huang, J., Xiang, Y., Bastepe, M., Jüppner, H., Kobilka, B.K., Zhang, J.J., & Huang, X.-Y. (2007) Dosage-dependent switch from G protein-coupled to G protein-independent signaling by a GPCR. *EMBO J.*, **26**, 53–64.
- Ulery-Reynolds, P.G., Castillo, M. a., Vialou, V., Russo, S.J., & Nestler, E.J. (2009) Phosphorylation of Δ FosB mediates its stability in vivo. *Neuroscience*, **158**, 369–372.
- Valjent, E., Aubier, B., Corbillé, A.-G., Brami-Cherrier, K., Caboche, J., Topilko, P., Girault, J.-A., & Hervé, D. (2006) Plasticity-associated gene Krox24/Zif268 is required for long-lasting behavioral effects of cocaine. *J. Neurosci.*, **26**, 4956–4960.
- Valjent, E., Pagès, C., Hervé, D., Girault, J.A., & Caboche, J. (2004) Addictive and non-addictive drugs induce distinct and specific patterns of ERK activation in mouse brain. *Eur. J. Neurosci.*, **19**, 1826–1836.
- Vashchinkina, E., Panhelainen, A., Aitta-aho, T., & Korpi, E.R. (2014) GABAA receptor drugs and neuronal plasticity in reward and aversion: focus on the ventral tegmental area. *Front. Pharmacol.*, **5**, 1–12.
- Venkatakrishnan, a J., Deupi, X., Lebon, G., Tate, C.G., Schertler, G.F., & Babu, M.M. (2013) Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature*, **494**, 185–194.

- Walker, D.M., Cates, H.M., Heller, E. a, & Nestler, E.J. (2015) Regulation of chromatin states by drugs of abuse. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **30**, 112–121.
- Williams, J.T., Christie, M.J., & Manzoni, O. (2001) Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence. *Physiol. Rev.*, **81**, 299–343.
- Wise, R. a (2004) Dopamine, learning and motivation. *Nat. Rev. Neurosci.*, **5**, 483–494.
- Wittert, G., Hope, P., & Pyle, D. (1996) Tissue distribution of opioid receptor gene expression in the rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **218**, 877–881.
- Yetnikoff, L., Lavezzi, H.N., Reichard, R. a., & Zahm, D.S. (2014) An update on the connections of the ventral mesencephalic dopaminergic complex. *Neuroscience*, **282**, 23–48.
- Zhang, J., Ferguson, S.S., Barak, L.S., Ménard, L., & Caron, M.G. (1996) Dynamin and beta-arrestin reveal distinct mechanisms for G protein-coupled receptor internalization. *J. Biol. Chem.*, **271**, 18302–18305.
- Zhen, J., Antonio, T., Cheng, S.-Y., Ali, S., Jones, K.T., & Reith, M.E. A. (2015) Dopamine transporter oligomerization: impact of combining protomers with differential cocaine analog binding affinities. *J. Neurochem.*, **113**, 167–173.

7.1. Internetové zdroje

World Health Organization. Lexicon of Alcohol and Drug Terms. Geneva: World Health Organisation; 1994. [cit.2015.08.12] Dostupné z: http://www.who.int/substance_abuse/terminology/who_ladt/en/

United Nations Office on Drugs and Crime. World drug report 2015. [cit.2015.08.12] Dostupné z: https://www.unodc.org/documents/wdr2015/World_Drug_Report_2015.pdf