



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2023년 8월

박사학위 논문

삼환계 항우울제의  
오피오이드 수용체 자극에 의한  
**TRPC4** 이온통로의 활성화 연구

조선대학교 대학원

의 학 과

정 지 연

삼환계 항우울제의  
오피오이드 수용체 자극에 의한  
**TRPC4** 이온통로의 활성화 연구

**The study on the action of tricyclic antidepressants  
in TRPC4 channel activation by stimulating opioid receptors**

2023년 8월 25일

조선대학교 대학원

의 학 과

정 지 연

삼환계 항우울제의  
오피오이드 수용체 자극에 의한  
**TRPC4** 이온통로의 활성화 연구

지도교수    홍 찬 식

이 논문을 의학 박사학위 신청 논문으로 제출함

2023년 4월

조선대학교 대학원

의 학 과

정 지 연

## 정지연의 박사학위논문을 인준함

위원장	조선대학교	교수	<u>전제열</u> (인)
위원	전남대학교	교수	<u>정용연</u> (인)
위원	조선대학교	교수	<u>김진호</u> (인)
위원	조선대학교	교수	<u>김후원</u> (인)
위원	조선대학교	교수	<u>홍찬식</u> (인)

2023년 6월

조선대학교 대학원

## 목 차

<b>List of figures</b> .....	<b>iii</b>
<b>List of tables</b> .....	<b>vi</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>vii</b>
<b>제 1 장. 서 론</b> .....	<b>1</b>
제 1 절 오피오이드 수용체의 생리적 기전 .....	1
제 2 절 삼환계 항우울제의 기전과 부작용 .....	9
제 3 절 비 선택적 양이온 통로 TRPC4 .....	11
<b>제 2 장. 연구 재료 및 방법</b> .....	<b>15</b>
제 1 절 세포 배양 및 발현 .....	15
제 2 절 실험 용액 및 시약 .....	16
제 3 절 단일세포 막전압 고정법 .....	19
제 4 절 통계 및 유의성 평가 .....	20

**제 3 장. 결 과 ..... 21**

제 1 절 오피오이드 수용체에 의한 TRPC4 이온통로의 활성화 ..... 21

제 2 절 오피오이드 수용체에 의존적으로 TRPC4 이온통로의 활성을 유발하는 삼환계 항우울제 ..... 26

1. 삼환계 항우울제에 의한 TRPC4 이온통로의 억제 ..... 26

2.  $\mu$ OR에 의존적인 아미트립틸린에 의한 TRPC4 이온통로의 활성화 ..... 31

3.  $\delta$ OR와  $\kappa$ OR에 의존적인 삼환계 항우울제에 의한 TRPC4 이온통로의 활성화 ..... 35

4. 농도에 따라 TRPC4 활성화에 이상 효과를 보이는 삼환계 항우울제 ..... 42

5.  $G_i$ -pathway의 선택적 억제에 따른 삼환계 항우울제의 TRPC4 활성화 효과 상실 ..... 48

제 3 절 오피오이드 수용체의 삼환계 항우울제 결합 부위 56

1. 오피오이드 수용체의 리간드 결합 부위와 편향된 작용성 ..... 56

2. Asp 잔기의 돌연변이에 따른 아미트립틸린에 의한 TRPC4 활성화 억제 ..... 58

**제 4 장. 고 찰 ..... 72**

**참고 문헌 ..... 77**

## LIST OF FIGURES

Figure 1.	Distribution of opioid peptides and their receptors in the CNS .....	3
Figure 2.	Types of opioid receptors .....	4
Figure 3.	Types of G-protein signaling pathways .....	6
Figure 4.	Biased agonism and functional selectivity of opioid agonists .....	7
Figure 5.	Molecular structure of TCAs .....	10
Figure 6.	Schematic representation of the TRP superfamily of ion channels .....	12
Figure 7.	TRPC4 $\beta$ current is increased by DAMGO treatment depending on $\mu$ OR co-expression .....	23
Figure 8.	TRPC4 $\beta$ current is increased by DPDPE treatment depending on $\delta$ OR co-expression .....	24
Figure 9.	TRPC4 $\beta$ current is increased by U50488 treatment depending on $\kappa$ OR co-expression .....	25
Figure 10.	GTP $\gamma$ S-induced TRPC4 $\beta$ current is inhibited by AMI treatment .....	28
Figure 11.	GTP $\gamma$ S-induced TRPC4 $\beta$ current is inhibited by DES treatment .....	29
Figure 12.	GTP $\gamma$ S-induced TRPC4 $\beta$ current is inhibited by IMI treatment .....	30
Figure 13.	TRPC4 $\beta$ current is increased by AMI treatment depending on $\mu$ OR co-expression .....	32
Figure 14.	TRPC4 $\beta$ current is increased by DES treatment depending on $\mu$ OR co-expression .....	33



Figure 15.	TRPC4 $\beta$ current is increased by IMI treatment depending on $\mu$ OR co-expression .....	34
Figure 16.	TRPC4 $\beta$ current is increased by AMI treatment depending on $\delta$ OR co-expression .....	36
Figure 17.	TRPC4 $\beta$ current is increased by DES treatment depending on $\delta$ OR co-expression .....	37
Figure 18.	TRPC4 $\beta$ current is increased by IMI treatment depending on $\delta$ OR co-expression .....	38
Figure 19.	TRPC4 $\beta$ current is increased by AMI treatment depending on $\kappa$ OR co-expression .....	39
Figure 20.	TRPC4 $\beta$ current is increased by DES treatment depending on $\kappa$ OR co-expression .....	40
Figure 21.	TRPC4 $\beta$ current is increased by IMI treatment depending on $\kappa$ OR co-expression .....	41
Figure 22.	TRPC4 $\beta$ current is not affected by 0.1 $\mu$ M AMI treatment, regardless of $\mu$ OR co-expression. ....	43
Figure 23.	TRPC4 $\beta$ current is increased by 1 $\mu$ M AMI treatment depending on $\mu$ OR co-expression .....	44
Figure 24.	TRPC4 $\beta$ current is increased by 10 $\mu$ M AMI treatment depending on $\mu$ OR co-expression .....	45
Figure 25.	TRPC4 $\beta$ current is not affected by 50 $\mu$ M AMI treatment, regardless of $\mu$ OR co-expression .....	46
Figure 26.	The increase in TRPC current due to MOR modulation exhibits a biphasic effect, dependent on the concentration of AMI .....	47
Figure 27.	PTX pre-treatment blocks the AMI-induced activation of TRPC4, which is modulated by $\mu$ OR .....	50
Figure 28.	PTX pre-treatment blocks the AMI-induced activation of TRPC4, which is modulated by $\delta$ OR .....	51
Figure 29.	PTX pre-treatment blocks the AMI-induced activation of TRPC4, which is modulated by $\kappa$ OR .....	52
Figure 30.	Dominant negative mutant of G $\alpha_{i2}$ inhibits AMI-induced activation of TRPC4, which was modulated by $\mu$ OR modulation .....	53

Figure 31.	Dominant negative mutant of $G\alpha_{i2}$ inhibits AMI-induced activation of TRPC4, which was modulated by $\delta$ OR modulation .....	54
Figure 32.	Dominant negative mutant of $G\alpha_{i2}$ inhibits AMI-induced activation of TRPC4, which was modulated by $\kappa$ OR modulation .....	55
Figure 33.	The sequence alignment of OR subtypes .....	57
Figure 34.	The $\mu$ OR(D147R) mutant did not alter DAMGO-induced TRPC4 activation. ....	50
Figure 35.	The $\delta$ OR(D128R) mutant did not alter DPDPE-induced TRPC4 activation .....	61
Figure 36.	The $\kappa$ OR(D138R) mutant did not alter U50488-induced TRPC4 activation .....	62
Figure 37.	The increase in TRPC4 current triggered by AMI did not occur in $\mu$ OR(D147R) .....	63
Figure 38.	The increase in TRPC4 current triggered by AMI did not occur in $\delta$ OR(D128R) .....	64
Figure 39.	The increase in TRPC4 current triggered by AMI did not occur in $\kappa$ OR(D138R) .....	65
Figure 40.	The $\mu$ OR(D147R) mutation induces diminished activation of TRPC4 by AMI .....	66
Figure 41.	The $\delta$ OR(D128R) mutation induces diminished activation of TRPC4 by AMI .....	67
Figure 42.	The $\kappa$ OR(D138R) mutation induces diminished activation of TRPC4 by AMI .....	68
Figure 43.	The $\mu$ OR(D147R) mutation induces diminished activation of TRPC4 by DAMGO .....	69
Figure 44.	The $\delta$ OR(D128R) mutation induces diminished activation of TRPC4 by DPDPE .....	70
Figure 45.	The $\kappa$ OR(D138R) mutation induces diminished activation of TRPC4 by AMI .....	71

## LIST OF TABLES

Table 1.	Substance of solution for patch clamping .....	17
Table 2.	Chemical information .....	18

## Abstract

### **The study on the action of tricyclic antidepressants in TRPC4 channel activation by stimulating opioid receptors**

Ji Yeon Chung

Advisor: Prof. Chansik Hong

Department of Medicine

Graduate School of Chosun University

The transient receptor potential canonical 4 (TRPC4) ion channel is a non-selective cation channel involved in cellular electrical signaling and homeostasis. It plays a crucial role in various physiological processes, including neurotransmission, cellular growth, and cardiovascular function. The activation of TRPC4 is influenced by its interaction with G protein-coupled receptors (GPCRs), particularly through the  $G_i$  signaling pathway. In this study, we aimed to investigate the interplay between TRPC4 and opioid receptor modulation, with a specific focus on the impact of tricyclic antidepressants (TCAs). TCAs are widely used in the treatment of depressive disorders and are known to modulate opioid receptors. However, the precise mechanisms underlying their effects on TRPC4 ion channel activity remain unclear. Our results demonstrate that TRPC4 activity is dependent on the  $G_i$  signaling pathway, indicating the involvement of intracellular signaling in TRPC4 gating. Furthermore, we observed that perturbation of  $G_i$  protein function or mutation of key residues within TRPC4 impairs its activation by TCAs and opioid receptor agonists. This suggests that TRPC4 ion channel activity is regulated by the  $G_i$  signaling pathway and can be modulated by TCA treatment. Importantly, the bidirectional effects of TCAs on TRPC4 activity, depending on their concentration and opioid receptor modulation, raise questions about the potential signaling complexities and the underlying mechanisms contributing to the side effects associated with TCA therapy.

Overall, our findings highlight the intricate relationship between TRPC4 ion channel

activity,  $G_i$  signaling pathway, and opioid receptor modulation, emphasizing the role of TCAs in this interplay. Understanding the regulatory mechanisms of TRPC4 and its modulation by TCAs and opioid receptors provides valuable insights for the development of novel therapeutic strategies targeting TRPC4 for conditions such as depression, neuropathic pain, and other TRPC4-related disorders.

# 제 1 장. 서 론

## 제 1 절. 오피오이드 수용체의 생리적 기전

오피오이드 수용체 (opioid receptor) 는 뇌와 척수, 말초 감각신경 말단에서 발견되는 수용체 중 하나로, [1, 2] 오피오이드 약물과 베타엔돌핀과 같은 염기성 펩타이드 (peptides)와의 상호작용을 통해 다양한 생리학적 효과를 조절한다 [3]. 오피오이드 수용체는 뇌와 척수뿐만 아니라 호흡기계, 소화기계, 심혈관계 등 여러 신체 부위에 존재하며 (Fig. 1), 통증과 기분조절 뿐 아니라 식욕, 호흡 및 심장기능, 면역반응, 신경내분비조절 등의 중요한 생리적 과정에도 관여한다 [4]. 오피오이드 약물이 오피오이드 수용체에 작용하면 통증완화, 우울증 완화, 감정 조절, 보상, 식욕 조절 등 다양한 생리적 기능을 조절하게 된다. 그러나 이와 함께 중독과 관련한 부작용도 유발할 수 있다 [5]. 오피오이드가 약리학적 효과를 오피오이드 수용체와의 결합을 통해 나타낸다는 것은 1960년대 처음 알려졌고 [6], 엔케팔린 (Enkephalin)을 처음 발견한 이후로, 20여 가지 이상의 오피오이드 리간드가 확인되었다. 오피오이드 간의 교차 내성 (cross tolerance) 발견을 통해 다양한 유형의 오피오이드 수용체가 존재한다는 것을 알게 되었다 [7]. 가장 잘 알려진 세 가지 유형의 오피오이드 수용체는 주로  $\mu$ -,  $\delta$ -,  $\kappa$ -로 분류되는 세 가지 주요 하위 유형으로 구분된다 (Fig. 2) [1, 2, 8]. 이들 수용체는 각각 고유한 분자 구조를 가지고 있으며, 진통효과는 대부분  $\mu$  수용체를 통해 나타나는 것으로 알려졌다 [9].

내인성 오피오이드 시스템 (endogenous opioid system)은 통증 인지를 조절하는 기능적 역할을 하며, 오피오이드 작용제 (opioid agonist)는 강력한 진통 효과를 발휘한다 [10]. 오피오이드 수용체는 체내에서 생산되는 내인성 오피오이드 펩타이드 유전자의 산물들에 의해 생리적으로 활성화되는데, 이러한 산물의 종류들로는 프로엔케팔린 (proenkephalin), 프로디놀핀 (prodynorphin), 프로오피멜라노코르틴 (pro-opiomelanocortin)과 프로노시셉틴 (pronociceptin) 등이 있고 [11] 통증 조절을 위해 사용되는 합성 오피오이드로는 대표적으로 몰핀(morphine), 코데인(codeine), 펜타닐(fentanyl) 등이 있다 [12]. 오피오이드는 진통 조절에 효과적인 약물이지만 의존성, 중독성 및 과량 복용에 따른 구역, 구토, 호흡저하등의 심각한 부작용을 유발할

수 있으며, 이러한 이유로 여러 통증 관련 학회에서는 오피오이드의 사용에 대해 신중히 접근하고 필요한 경우에만 제한적으로 처방할 것을 권장 하고 있다 [3, 5, 8]. 특히 2022년 개정된 American Academy of Neurology (AAN) 가이드라인 에서는 당뇨 신경통증 (painful diabetic polyneuropathy: PDN) 환자 치료에 있어서 오피오이드 사용을 반대하는 새로운 지침을 발표하였다. 오피오이드는 단기 통증 감소 효과는 입증된 반면 장기간 투약시 과다복용에 의한 사망위험이 있고, 투약 후 수주 이내에 의존도가 생길 수 있기 때문이다 [13]. 대신 삼환계 항우울제 (tricyclic antidepressant: TCA), 가바펜티노이드, 세로토닌 노르에피네프린 재흡수 억제제 (SNRI), 나트륨 채널차단제까지 4개 계열만 진통목적으로 사용하도록 권고하였다. [14]

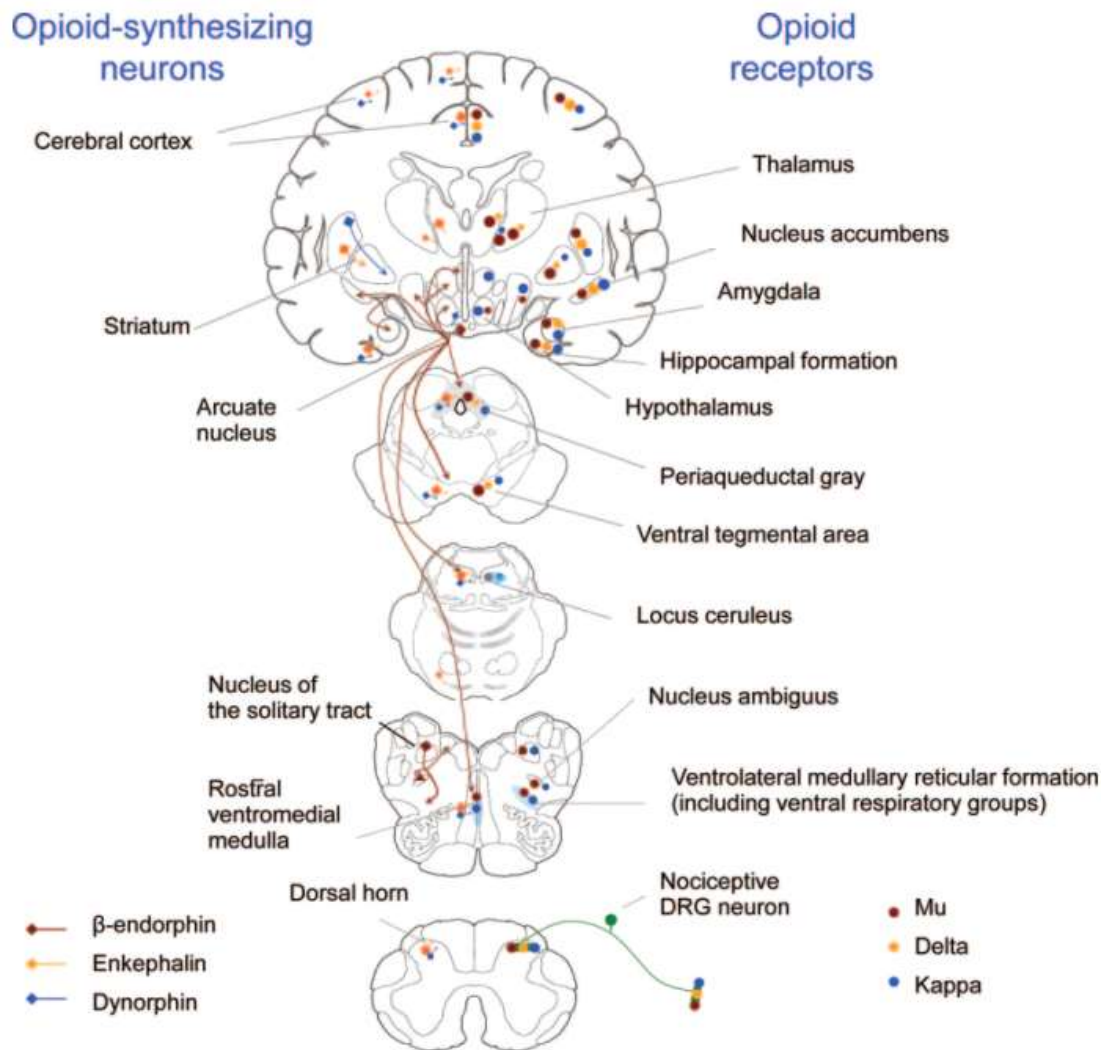


Figure 1. Distribution of opioid peptides and their receptors in the CNS [15]



	$\mu$	$\delta$	$\kappa$
<b>Alternative nomenclature</b>	MOR, MOP, OP3	DOR, DOP, OP1	KOR, KOP, OP2
<b>Main distribution</b>	Cerebral cortex	Cerebral cortex	Hippocampus
	Brainstem	Thalamus	Striatum
	Dorsal horn	Striatum	Hypothalamus
	DRG neurons	Dorsal horn	Brainstem
		DRG neurons	Dorsal horn
<b>Main endogenous agonist</b>	$\beta$ -Endorphin (Met-enkephalin)	Enkephalins	Dynorphin A
<b>Effect in analgesia</b>	Supraspinal and spinal analgesia	Supraspinal and spinal analgesia	Spinal analgesia
	Acute and chronic pain	Moderate in chronic pain	Hyperalgesia
<b>Effect on reward mechanisms and drug addiction</b>	Facilitates	Facilitates	Inhibits
<b>Behavioral effects</b>	Sedation	Sedation	Psychotomimetic
	Euphoria	Antidepressant	Sedation
			Dysphoria
<b>Other effects</b>	Respiratory depression <sup>a</sup>	Neuroprotection	Seizure protection?
	Miosis <sup>a</sup>		
	Vomiting <sup>a</sup>		
	Urinary retention		
	Constipation		

**Figure 2. Types of opioid receptors [15]**

오피오이드 수용체는 G-단백질 결합 수용체 (G-protein coupled receptor : GPCR)의 일종으로, GPCR의 활성화는 세포 내 신호 전달 경로의 활성화로 이어진다. GPCR은 세포막 표면에 위치한 수용체로서, 외부 환경 신호를 감지하고 세포 내부에 전달하는 역할을 담당한다. 오피오이드 수용체는 신경세포의 시냅스 전 및 후 활동억제를 매개하는  $G_i$  (inhibitory) 결합 수용체이다 (Fig. 3). 오피오이드 수용체는 특정한 리간드와의 결합에 의해 G-단백질 서브유닛과 상호작용하면서 활성화되며, 이로 인해 특정 신호전달 경로가 개시된다. G-단백질 서브유닛은  $G_\alpha$ ,  $G_\beta$ ,  $G_\gamma$  세 가지 하위 유닛으로 구성되며, 이들은 수용체의 내부 영역과 결합하여 신호전달 경로를 유도한다. 특히, 오피오이드 수용체의  $G_\alpha$  서브유닛은 다양한 하류 (downstream) 신호전달 경로를 조절하는 역할을 한다. 오피오이드  $G_i$  결합 수용체가 활성화되면 고리형 아데노신 모노인산(cyclic AMP: cAMP)의 생성이 억제되고, 내향성 칼슘 통로가 활성화되며, 전압 조절 칼슘 통로가 억제되어 신경전달물질의 분비가 감소되고 통증 신호의 전달이 감소하게 되어 진통 효과가 발생하게 된다 [16]. 즉 오피오이드 수용체의 시냅스 전 활성화는 신경전달물질 방출을 억제한다. 이러한 작용으로 인해 오피오이드 수용체는 다양한 세포 내 신호전달 기전을 조절하며, 이는 신경전달물질의 방출, 이온 통로의 활성 조절, 세포 내 두뇌 영역 간 신호 전달 등 다양한 생리적 프로세스에 영향을 준다 [17].

최근 수십 년간 오피오이드 수용체의 활성화가 어떻게 아편-매개 (opioid-mediated) 약리 반응을 complex group을 통해 세포 내부로 전달하는지 밝혀내기 위한 여러 연구들이 진행되었다. 오피오이드 수용체는 세포외 리간드에 의해 활성화되어 두 가지 종류의 세포 내 신호전달 경로인  $G_{i/o}$  또는 베타아레스틴 ( $\beta$ -arrestin) 경로로 이어지는 것으로 잘 알려져 있다 [18]. 최근 연구들에서, 오피오이드 수용체가 매개하는 부작용에 편향 메커니즘 (biased mechanism)에 대해 몇 가지 논란이 제기되었고 [19], 이로 인해 오피오이드 수용체 작용제의 생리학적 기전을 명확히 이해하는 것이 더욱 중요해졌다. 특히 오르토스테릭 (orthosteric) 리간드에 대한 분자재배열에 따른 우위적인 신호전달 경로를 유도하는 능력, 즉 ‘편향 작용(biased agonism)’ 또는 ‘기능 선택성 (functional selectivity)’은 수용체의 구조적 변화와 (conformational alteration) 결합 잔기 (binding residue)에 따라 좌우되는 것으로 보인다 [20-21].

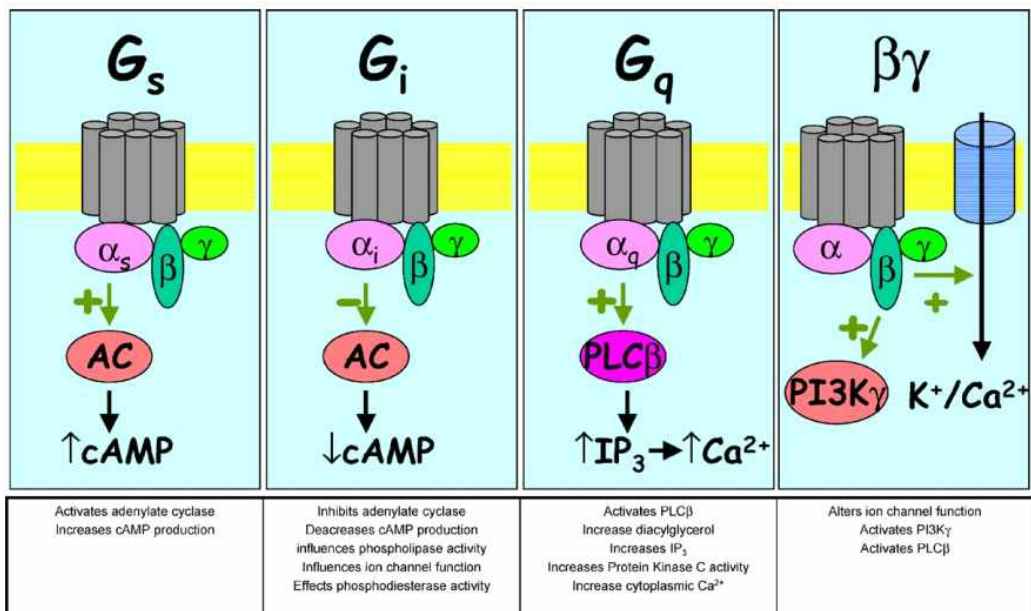
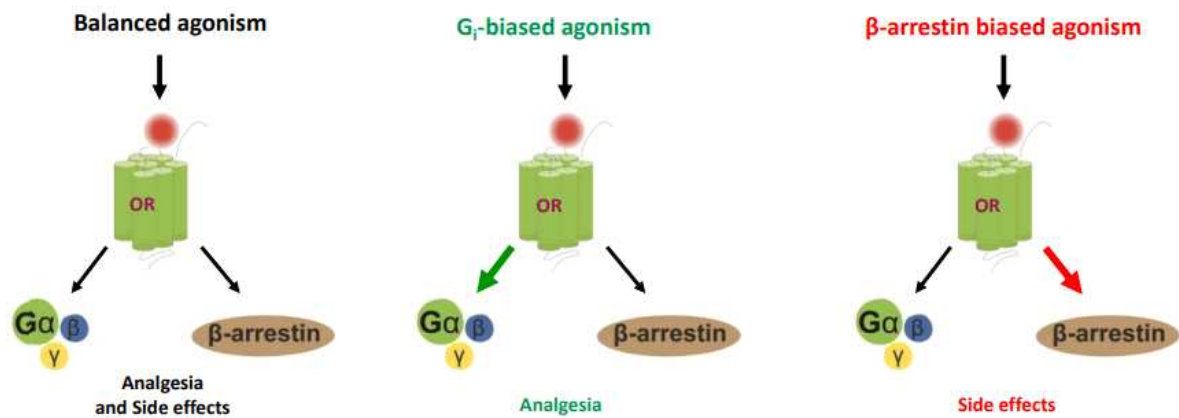


Figure 3. Types of G-protein signaling pathways [22]



**Figure 4. Biased agonism and functional selectivity of opioid agonists**

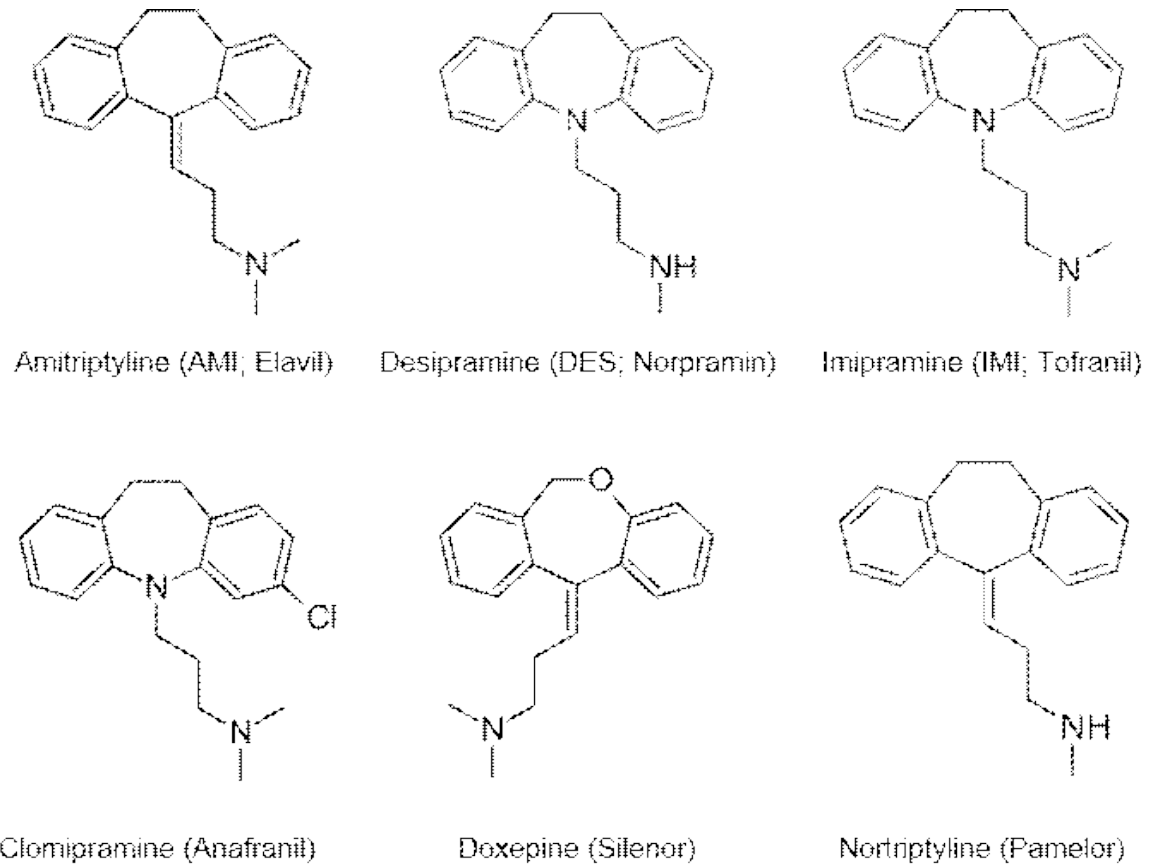
Biased agonism and functional selectivity of opioid agonists enable the selective activation of specific signaling pathways, allowing for targeted analgesic effects while minimizing side effects associated with traditional opioid activation. [44]

오피오이드 수용체는 아데닐사이클레이스 (adenylyl cyclase)를 억제하는 중요한 세포 내 기전을 가지고 있을 뿐만 아니라, 세포막에 존재하는 G-단백 결합 내측 정류 (G-protein coupled inwardly-rectifying) K<sup>+</sup> 채널 (GIRK)과 같은 이온통로의 개폐작용을 조절한다. 이를 통해 세포막 전위 (membrane potential) 변화와 세포 내 이온 조성을 조절하는 역할을 한다 [23]. 오피오이드 수용체는 신경의 수상 돌기 (dendrite)에 많이 분포되어 있으며 [24], 내인성 (endogenous) 아편계 신경전달물질들, 예를 들어  $\beta$ -endorphine, met-enkephain, leu-enkephalin 등이 리간드 (ligand)로 작용하여 활성화 되고, 신경의 재분극 (hyperpolarization)을 유도하거나 자발적 활성 (spontaneous activity)을 억제하는 역할을 한다. 오피오이드 수용체는 세포 내에서 cAMP에 의해 활성화 되는 신호 전달을 차단하거나 [20, 23-24], 세포 밖으로 유출되는 칼륨 이온통로 (outwardly potassium channel)를 활성화 하는 역할을 한다. 이러한 기전으로 신경의 전반적인 활성을 감소시키는 것으로 일반적으로 알려져 있다. 그러나 최근에는, 오피오이드 수용체와 같은 억제성 G-단백질 결합 수용체 (inhibitory G protein coupled receptor, GiPCR)의 영향으로 활성화 되는 비선택적 양이온 투과성 이온통로 (non-selectivity permeable cation channel)인 TRPC4가 주목받고 있다 [25, 26]. 본 연구는 드물게 억제성 G 단백질 연결 수용체에 의해 활성화되는 내측 정류 양이온 통로 (inwardly rectifying cation channel)인 TRPC4의 생리적 기전과 삼환계 항우울제에 의한 약리적 반응을 탐구하는 것을 목표로 한다.

## 제 2 절. 삼환계 항우울제의 기전과 부작용

삼환계 항우울제는 우울증 치료에 널리 사용되는 약물이다. 그러나 최근의 연구에서는 삼환계 항우울제가 우울증 외에도 통증을 완화하는데 효과적일 수 있다는 발견이 있었다 [27]. 이러한 발견은 삼환계 항우울제의 다양한 생리적 효과와 진통 메커니즘에 대한 이해를 더욱 중요하게 만들었다. 비암성 (non cancer) 신경병성 통증 (neuropathic pain) 등 일부 경우에는 삼환계 항우울제나 가바펜틴류 약물 (gabapentinoid)이 오피오이드보다 더 강력한 진통효과를 보일 수 있다고 보고하였다 [28]. 최근 대부분의 신경병성통증 치료 지침에서 아미트립틸린 (amitriptyline : AMI), 이미프라민 (imipramine : IMI), 데시프라민 (desipramine : DES)과 같은 삼환계 항우울제, 그리고 가바펜틴 (gabapentin) 및 프레가발린 (pregabalin) 과 같은 항경련제를 1차 선택 약으로 권장하고 있다 [29]. 또한, 한 가지 약제를 단독으로 사용하는 것보다 더 적은 용량으로 병용 치료 (combination therapy) 하는 것이 더 이점이 많다는 연구 결과도 있다 [30]. 이렇게 하면 부작용을 최소화하면서 치료 효과를 극대화 할 수 있다. 삼환계 항우울제의 진통 효과는 다양한 메커니즘에 기인할 수 있는데, 이 중 하나는 중추신경계에서 통증 전달 경로를 조절하는 신경전달물질인 세로토닌과 노르에피네프린의 재흡수를 억제함으로써 통증을 완화하는 것이다 [31].

삼환계 항우울제는 우울증 치료에서 항콜린성 부작용 때문에 사용을 피하는 경향이 있지만 [32], 임상적 효과가 우수하여 때로 2차 선택 약으로 선호되는 경우가 많다. 삼환계 항우울제는 소장에서 흡수되어 간에서 1차 대사를 거친 후, 전신 순환계로 넓게 퍼지면서 중추 신경계로 유입된다. 삼환계 항우울제는 세 개 또는 네 개의 고리를 가진 화합물로서 알킬아민 (alkylamine)이 결합되어 있어 친유성이 높고 (highly lipophilic), 다른 단백질에 광범위 하게 결합 할수 있는 화학적 반응성을 가진다 (Fig. 5) [33]. 여러 연구에서 삼환계 항우울제가 특정 오피오이드 수용체들과 결합하여 활성화 한다는 사실이 여러 연구들에서 밝혀졌다 [34]. 그러나 물리적인 상호작용 (physical interaction)의 직접적인 근거는 아직 밝혀지지 않았다.



**Figure 5. Molecular structure of TCAs**

### 제 3 절. 비 선택적 양이온 통로 TRPC4

TRP (transient receptor potential) channel은  $Ca^{2+}$ ,  $Na^{+}$ ,  $K^{+}$  등 다양한 양이온을 통과시키는 비 선택적 양이온 (cation) 통로로써 [35] 다양한 조직과 세포에서 발견되며, 세포의 전기 활동과 신경 전달, 세포 성장 및 분화, 혈액 순환 등 여러 생리적 과정에 핵심적인 역할을 하는 이온 통로이다 [36, 37]. TRP channel은 90년대 중반에 초파리의 시각계에 존재하는 광수용체 (photoreceptor)로 처음 발견되었으며 [38], 이후 사람을 포함한 고등동물의 세포에도 존재함이 알려지면서 연구가 가속화되고 있다. TRP channel 들은 현재까지 30여 가지가 알려져 있고 생리적 기능도 각각 다르지만 종류와 관계없이 두 가지의 유사성을 가지고 있다. 첫째, TRP channel은 비 선택적 양이온 통로이면서 주로 칼슘이온에 대한 세포내 통로로 작용한다. 칼슘 이온의 세포내 유입은 해당 세포들의 탈분극 및 활성화를 유도하게 된다. 둘째, TRP channel을 활성화 시킬 수 있는 자극의 종류가 매우 다양하다. 이는 전달 물질로서 작용하는 작용제 (agonist)외에도 빛 자극, 진동이나 접촉 같은 기계적 자극, 온도 변화, 화학적 자극, 삼투압의 변화 등을 포함한다. 이러한 이유로 2000년대 초반부터 다양한 TRP channel 이 연구의 대상이 되었다. 이들 대부분은 개체의 외부 자극이나 체내의 국지적인 세포환경의 변화를 감지하는 수용체 역할을 하거나 신호전달체계에서의 전달자 역할을 한다. TRP channel은 서열 유사성에 따라 6개의 subfamily 로 구분된다. (Fig. 6) 이 단백질들은 구조적으로 유사성을 공유하고 있지만 subtype에 따라 기능이 다르다 [39, 40]. 예를 들어 TRPM2 (melastin related TRP)는 대식세포에서 redox 센서 역할을 하며 [41], TRPM7은 장 상피세포에서 주요한 마그네슘 ( $Mg^{2+}$ ) 흡수경로를 제공한다고 알려져 있다. TRPM8은 감각뉴런에서 추위와 멘톨을 감지한다 [42]. TRPC4 (TRP canonical)는 마우스를 이용한 행동학적 연구에서 불안과 우울증과 관련이 있음이 밝혀졌고 [25], 중독 치료에서도 유용하게 사용될 가능성이 제시되었다[43].



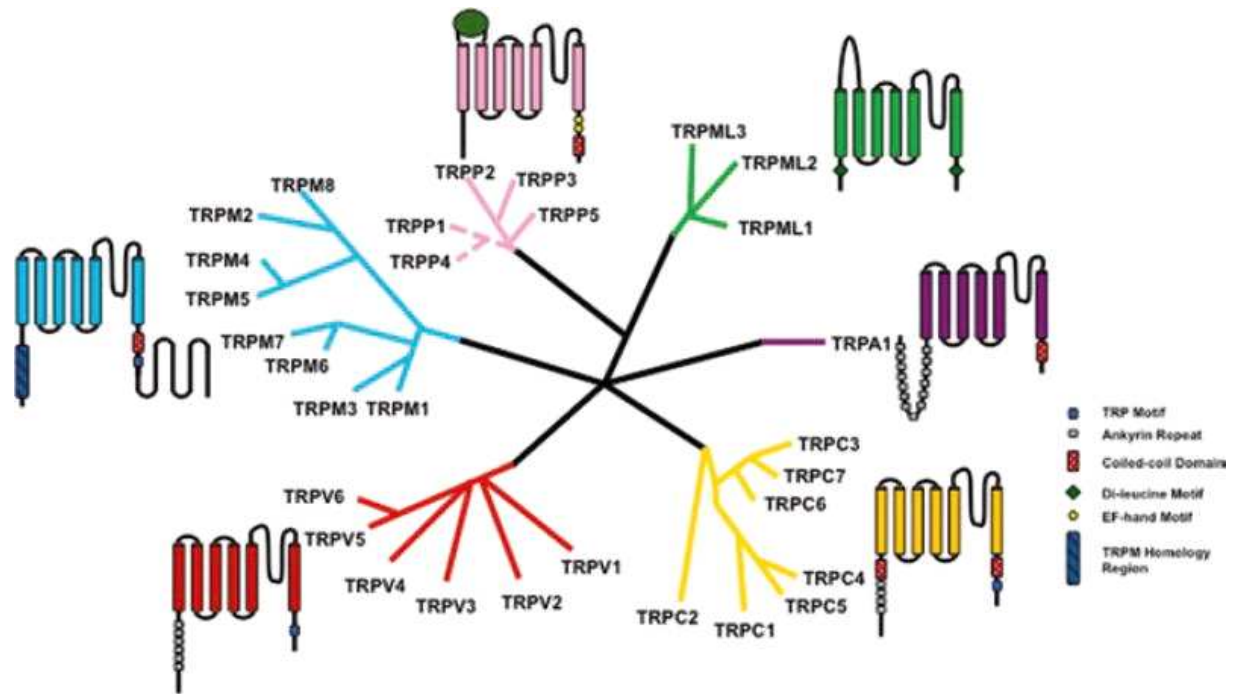


Figure 6. Schematic representation of the TRP superfamily of ion channels [39]

삼환계 항우울제가 유발하는 오피오이드 수용체 활성화 하류 신호전달 경로에서 어떤 편향성(bias)을 나타내는지에 대해서는 아직 완전히 알려지지 않았다. 그러나 이전 연구들에서는 삼환계 항우울제가 오피오이드 수용체를 활성화 하는 기전을  $G_i$  단백질 경로를 중심으로 설명하였다 [23]. 최근, 오피오이드 수용체 의존성  $G_{i/o}$  신호전달에 중요한 하류 신호전달 경로가 TRPC4 이온 통로의 개폐 조절에 관여하는 것으로 알려졌다. 모든 포유류에서의 일반적인 TRPC 유형은 수용체에 의해 작동되는 (receptor-operated)  $Ca^{2+}$  침투성 비 선택적 양이온 통로로,  $G_{q/11}$  단백/PLC 경로에 의해 일차적으로 활성화된다 [45]. 그러나 Insuk So [25, 46] 와 Mike Zhu [47] 연구 그룹은  $G_{i/o}$ -결합 수용체 자극이  $G_{i/o}$  를 매개로 TRPC4 기능을 활성화 하는 것을 일관되게 주장해왔다. 2012년에 TRPC4 이온 통로가  $G_{\alpha_{i2}}$  단백질과의 직접적인 상호작용으로 활성화된다는 연구결과가 보고된 이후, 이는 최근까지도 PLC 경로와  $G_{i/o}$  에 의한 TRPC4의 동시 활성화 과정의 일반적인 기전으로 설명되고 있다.

위장관 운동이나 방광의 배뇨근 수축은 콜린성으로 작동하는데, 이 과정에서 TRPC4 채널은  $G_{i/o}$ -coupled M2 와  $G_{q/11}$ -coupled M3 수용체를 자극하여 무스카린성 양이온 전류 (muscarinic cation current: mIcat) 를 매개하는 역할을 한다 [48, 49]. TRPC4 전류는 후각구 과립세포에서 느린 시냅스 전달과정과 측면격벽뉴런 (lateral septal neuron)에서 발생하는 돌발성 뇌전증 발작 (epileptiform burst)과 같은 과정에서 역할을 한다. 이는 대사지향성 (metabotropic) 글루탐산 수용체 (mGluR1 또는 mGluR5)를 자극하여 일시적인 세포막 전류의 상승을 일으키는 역할을 담당한다. TRPC4 유전자가 제거된 쥐 동물실험에서 불안 행동의 감소와 내장 통증에 대한 내성 증가가 관찰되었는데, 이러한 변화는 각각 편도체와 척수 후각에서의  $G_q$ -의존성 TRPC4 활성화와 연관되어 있음을 보여준다. 현재로서는 TRPC4 채널이 신경병성 통증에서  $G_{i/o}$  신호전달과 어떤 연관이 있는지는 명확히 알려지지 않았지만, TRPC4 이온통로가 모르핀 (morphine) 의 진통효과나 [50] 오피오이드 시스템에 대한 삼환계 항우울제의 직접적인 작용을 조절할 수 있을 가능성이 제시되고 있다.

본 연구에서는, 삼환계 항우울제가 오피오이드 수용체 리간드로서 작용하고, 이를 통해  $G_i$ -매개 TRPC4 이온통로를 어떻게 조절하는지에 대한 기전을 조사하였다. 또한, 분자 도킹 시뮬레이션을 활용하여 오피오이드 수용체의 모르핀 결합 구조를 기반으로 삼환계 항우울제와 상호작용하는 결정적인 잔기를 예측해 보았다. 삼환계 항우울제의 용량에 따른 진통 효과와 부작용을 고려하면, TRPC4 채널은 삼환계 항

우울제 작용을 조절하는데 있어 잠재적인 표적 단백질로서의 역할을 할 가능성이 있다. 이는 TRPC4 이온통로가 통증 경로에서 중요한 역할을 수행할 수 있다는 가능성을 시사한다.

## 제 2 장. 연구 재료 및 방법

### 제 1 절. 세포 배양 및 발현

Human embryonic kidney 293 (HEK293) 세포는 공급업체의 권장에 따라 (ATCC, USA) 유지되었다. 일시적인 전사(transient transfection)를 위해 전사 유전자(FuGENE 6, Promega, U.S.A.) 및 전기생리학 실험을 위해 X-tremeGENE (Sigma, U.S.A) 전사 시약을 사용하였고, 제조업체의 권장 프로토콜에 따라 진행하였다. 모든 실험은 전사 후 24-48 시간 내에 수행되었다. Human opioid receptor 를 위한 cDNA clone 은 cDNA Resource Center (U.S.A.)로부터 얻었다. Opioid receptor vector 는 Gibson assembly 를 사용하여 cloning 되었고, 모든 돌연변이는 missense primers 와 PrimeSTAR HS DNA polymerase system (Takara Bio, Japan)을 사용하여 site-directed mutagenesis 를 수행하였다. TRPC4 $\beta$  유전자는 우리 연구실에서 pEGFP-N1 vector 에 cloning 하였다. 모든 실험은 전사 후 24-48 시간에 수행되었다. DAMGO (Tocris, U.K.)를 제외한 대부분의 화학 물질은 Sigma Aldrich 에서 구입하였으며 3.D.W 용매에 녹여 사용하였다. DES 는 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 용매로 사용하여 녹여 사용하였다.

## 제 2 절. 실험 용액 및 시약

Whole cell patch clamp 에 사용한 용액의 조성 및 농도는 table 1 에 수록했다. 형질주입 된 HEK293 세포와 생쥐 평활근 세포에서 각각 다른 조성으로 유리전극 내 용액 (pipette solution)이 사용되었고, 세포 외 관류 용액 (bath solution)은 normal Tyrode (NT)와 NT 용액의 1 가 양이온을 cesium 으로 대체한 Cs<sup>+</sup>-rich 용액을 사용하였다.

실험에 사용한 모든 화학품에 대한 정보는 table 2 에 수록했다.

Substance of pipette solution (mM)
<b>Recording in HEK293</b>
140 CsCl
0.5 EGTA
10 HEPES
3 Mg-ATP
0.2 Tris-GTP
pH 7.2 with CsOH

Substance of bath solution (mM)	
Normal Tyrode solution	Cs <sup>+</sup> -rich solution
135 NaCl	140 CsCl
5 KCl	
10 HEPES	10 HEPES
10 Glucose	10 Glucose
2 CaCl <sub>2</sub>	2 CaCl <sub>2</sub>
1 MgCl <sub>2</sub>	1 MgCl <sub>2</sub>
pH 7.4 with NaOH	pH 7.4 with CsOH

**Table 1. Substance of solution for patch clamping**

Chemical			
Chemical	Abbreviation	Company	Function
Amitriptyline	AMI	Sigma (U.S.A.)	Antidepressant
Desipramine	DES	Sigma (U.S.A.)	Antidepressant
Imipramine	IMI	Sigma (U.S.A.)	Antidepressant
DAMGO	DAMGO	Tocris (U.K.)	$\mu$ -opioid receptor agonist
DPDPE	DPDPE	Sigma (U.S.A.)	$\delta$ -opioid receptor agonist
U50488	U50488	Sigma (U.S.A.)	$\kappa$ -opioid receptor agonist
GTP $\gamma$ S	GTP $\gamma$ S	Sigma (U.S.A.)	G-protein-activating analog of GTP

**Table 2. Chemical information**

### 제 3 절. 단일세포 막전압 고정법

단일 세포주에 대한 전류측정을 위해 단일세포 막전압 고정법 (whole cell patch clamping, whole cell clamp)를 사용하였다. 12 well plate 에서 분리된 세포들은 도립현미경 재물대의 chamber 에 옮겨진 후 실온에서 10 분 뒤 측정되었다. 유리전극은 2~3 MΩ 의 저항을 사용하였다. Whole cell 전류 반응을 측정하기 위해 전압 램프를 10 초마다 +100 에서 -100 mV 까지 0.5 초 동안 가해주었으며, 막전압은 -60 mV 로 고정하였다. 이를 위해 Axopatch 200B amplifier (Axon Instruments, U.S.A), Digidata 1550B Interface (Axon Instruments)가 사용되었다. 전류의 기록 및 저장은 pCLAMP software 를 이용하였고, OriginPro 8 (OriginLab Co., U.S.A.)으로 분석하였다.

단일세포 막전압 고정법 (whole cell patch clamping, whole cell clamp)는 borosilicate glass capillaries 에 의해 room temperature 에서 기록되었다. PC-10 puller 를 사용하여 3-4 MΩ 의 저항 이내로 사용하였다. 전류는 Axopatch 200B amplifier, Digidata 1550B interface 를 사용하여 기록되었으며 OriginPro 8 에서 분석되었다.

Cs<sup>+</sup> rich solution 은 동일한 몰 농도의 CsCl 로 일가 양성 이온 (NaCl 및 KCl)을 교체하여 제조하였다. -60 mV 의 holding potential 로 유지된 상태에서 0.5 초 동안 +100 에서 -100 mV 의 voltage ramp pulse 가 10 초마다 적용되었다. 전류 (I)-전압(V) 곡선의 전류 시점은 이탤릭체 로마 숫자로 표시되었다.



## 제 4 절. 통계 및 유의성 평가

모든 실험 결과는 평균값  $\pm$  표준오차 (mean  $\pm$  S.E.M)의 바 그래프로 표기되었으며, 통계 분석은 Prism 5.0 (GraphPad, U.S.A.)을 이용하여 계산되었다. 대부분의 실험에서 Student's t-test 를 사용하여 유의성을 검증하였다. 확률치 (probability value, P-value)가 0.05 보다 낮을 때 통계적으로 유의한 것으로 하였다. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  and \*\*\* $P < 0.001$ , n.s. non-significant.

## 제 3 장. 결 과

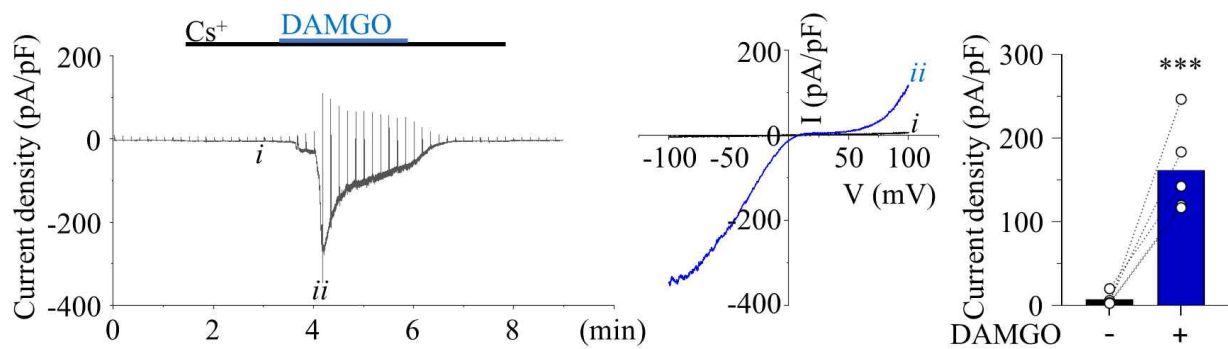
### 제 1 절. 오피오이드 수용체에 의한 TRPC4 이온통로의 활성화

오피오이드 수용체와 TRPC4 이온통로간의 상호작용에 대한 연구는 최근 활발히 진행되고 있다. 이전 연구에서는 TRPC4 이온통로가  $G_q$ -PLC 경로와 세포 내  $Ca^{2+}$  조절과 같은 하류 신호전달 경로에 의해 조절된다고 알려져 왔으나, 최근 연구에서는 TRPC4 이온통로 활성이 억제성 G-단백 결합 수용체인  $G_i$ PCR에 의해 조절된다는 사실이 밝혀졌다. 또한,  $G_{i/o}$  단백질과의 직접적인 결합이 TRPC4 이온통로 뿐만 아니라  $G_i$ PCR의 하류 신호전달 경로를 활성화하는 중요한 세포 내 기전으로 제시되고 있다.

이러한 연구 동향을 바탕으로, 삼환계 항우울제로 인한 오피오이드 수용체 활성화가  $G_i$ -단백질의 하류 신호전달 경로에 의존적으로 TRPC4 전류를 증가시킬 것으로 예측하였다. 본 연구에서는 삼환계 항우울제에 의한 오피오이드 수용체의 영향에 관한 본 연구의 가설을 검증하기 전에, 먼저 오피오이드 수용체의 활성이 TRPC4 이온통로의 활성을 어떻게 조절하는지에 대한 기본적인 생리 기전을 먼저 확인하고자 하였다. 이전 연구에서 TRPC4 이온통로가  $\mu$ -오피오이드 수용체 (mu-opioid receptor,  $\mu$ OR)의 선택적 작용제인 DAMGO ([D-Ala<sup>2</sup>, NMe-Phe<sup>4</sup>, Gly-ol<sup>5</sup>]-enkephalin)에 의해서 활성화 된다는 것이 보고되었지만, 다른 종류의 오피오이드 수용체에 관해서는 알려진 바가 적다. 따라서, 대표적인 3가지 타입의 오피오이드 수용체에 대해 TRPC4의 활성 조절 여부를 확인하기 위해, HEK293 세포에서 TRPC4 $\beta$  이온통로와 3가지 type의 오피오이드 수용체,  $\mu$ OR, 델타 오피오이드 수용체 (delta-opioid receptor :  $\delta$ OR), 카파 오피오이드 수용체 (kappa-opioid receptor :  $\kappa$ OR)를 공동 발현시키고, 단일세포 막전압 고정법을 이용하여 세포 전체의 전류 변화를 확인하였다. 전류 측정에는 세포 외 용액은 TRPC4 이온통로에서  $Na^+$ 보다 큰 투과성을 가지는  $Cs^+$ -rich 용액을 사용하여 각각의 선택적 작용제를 세포 외부에 노출 시켰을 때, 세포 전체 전류의 변화를 측정하였다.

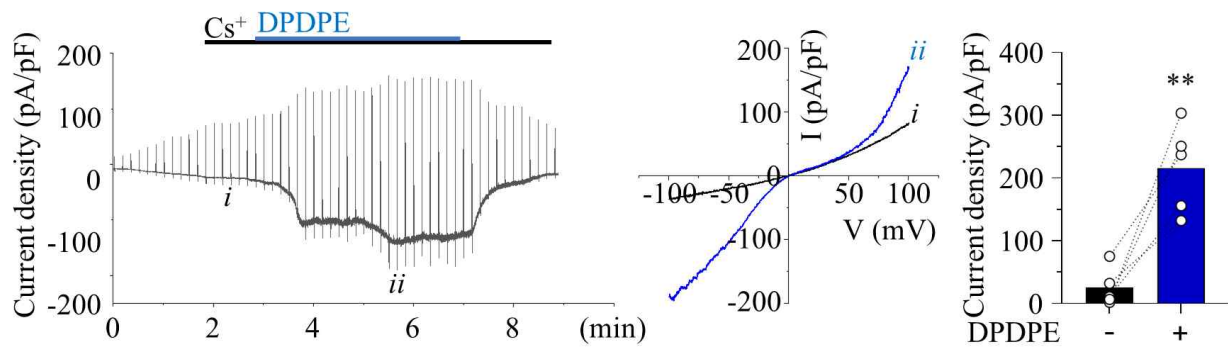
$\mu$ OR과 TRPC4 $\beta$ 를 공동 발현한 세포에  $\mu$ OR의 선택적 작용제인 50 nM DAMGO를 노출 시켰을 때,  $6.85 \pm 3.38$  pA/pF였던 TRPC4 $\beta$ 의 전류가  $161.8 \pm 24.32$  pA/pF로 증가되었다 (Fig. 7). TRPC4에 의한 전류에서 특수하게 보이는 이중 정류 I-V curve (double rectifying IV curve)가 명확하게 나타났으며, TRPC4 $\beta$  이온통로의 활성이 막 전위 상승에 우세하게 작용했음을 확인하였다. 이러한 TRPC4 $\beta$  전류의 상승은  $\delta$ OR의 선택적 작용제 DPDPE 에 의해서도  $25.33 \pm 13.53$  pA/pF에서  $215.9 \pm 31.55$  pA/pF로 역시 유사하게 나타났으며 (Fig. 8),  $\kappa$ OR의 선택적 작용제 U50488 에 의해서도  $41.27 \pm 13.51$  pA/pF에서  $175.3 \pm 26.98$  pA/pF로 증가 양상을 보였다 (Fig. 9).

예상대로, 억제성 G-단백질의 세포 내 신호 기전을 가지는 3가지 타입의 오피오이드 수용체의 활성은 모두 TRPC4 $\beta$  이온통로 과발현 세포의 막 전위 상승을 유발하였다.



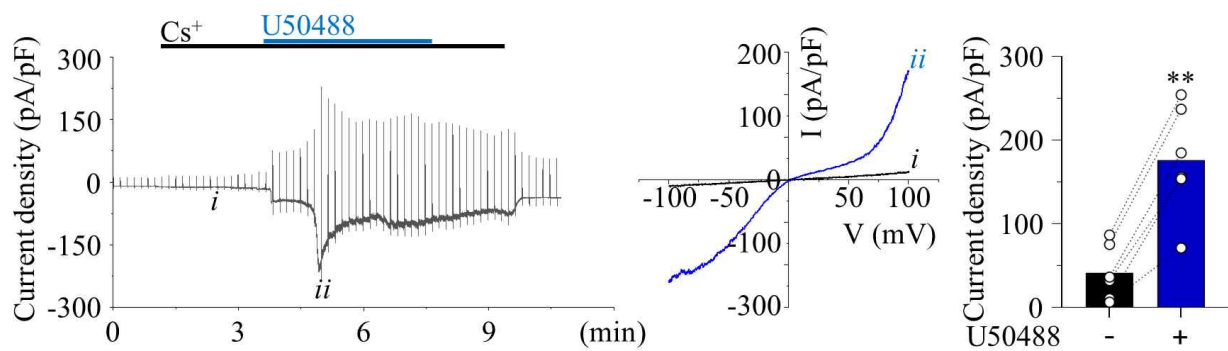
**Figure 7. TRPC4 $\beta$  current is increased by DAMGO treatment**  
**depending on  $\mu$ OR co-expression.**

Representative current trace (*left*) and I-V curve (*middle*) of  $\mu$ OR-coexpressed TRPC4 $\beta$  current to 50 nM DAMGO treatment. Summarized bar graph (*right*) of current density (pA/pF) before (black) and after (blue) treatment with DAMGO. Mean values are shown (n=4). \*\*\* p < 0.001.



**Figure 8. TRPC4 $\beta$  current is increased by DPDPE treatment**  
**depending on  $\delta$ OR co-expression.**

Representative current trace (*left*) and I-V curve (*middle*) of  $\delta$ OR-coexpressed TRPC4 $\beta$  current to 0.1  $\mu\text{M}$  DPDPE treatment. Summarized bar graph (*right*) of current density (pA/pF) before (black) and after (blue) treatment with DPDPE, Mean values are shown (n=5). \*\*  $p < 0.01$ .



**Figure 9. TRPC4 $\beta$  current is increased by U50488 treatment depending on  $\kappa$ OR co-expression.**

Representative current trace (*left*) and I-V curve (*middle*) of  $\kappa$ OR-coexpressed TRPC4 $\beta$  current to 10  $\mu$ M U50488 treatment. Summarized bar graph (*right*) of current density (pA/pF) before (black) and after (blue) treatment with U50488, Mean values are shown (\*\* p < 0.01).

## 제 2 절. 오피오이드 수용체에 의존적으로 TRPC4 이온통로의 활성을 유발하는 삼환계 항우울제

### 1. 삼환계 항우울제에 의한 TRPC4 이온통로의 억제

이전 우리 그룹의 보고에서는 삼환계 항우울제가 평활근 세포의 흥분성을 감소시키는데 관여하는 TRPC4 이온통로를 직접 억제하는 것을 확인하였다 [26]. 연구 결과에서 삼환계 항우울제는 세포 외부에서 작용하여 TRPC4 이온통로의 전류를 억제하고, 무스카리닉 아세틸콜린 수용체 타입 2 (muscarinic acetylcholine receptor type 2, M<sub>2</sub>R)와 타입 3 (M<sub>3</sub>R) 에 의해 증가된 TRPC4의 mIcat (muscarinic cation current) 도 억제하였다. 이로 인해 대장 평활근 세포의 흥분이 감소하고, 대장 평활근 세포에서 TRPC4 이온통로가 기능하지 않으면 아세틸콜린 자극에 의한 효과도 나타나지 않으며, 삼환계 항우울제에 의한 억제도 나타나지 않았다. 이를 통해 삼환계 항우울제가 TRPC4 이온통로를 통해 대장 운동을 조절하는데 중요한 역할을 할수 있고, 과민성 대장 증후군 (irritable bowel syndrome, IBS) 치료에도 활용될 가능성이 있음을 제시하였다.

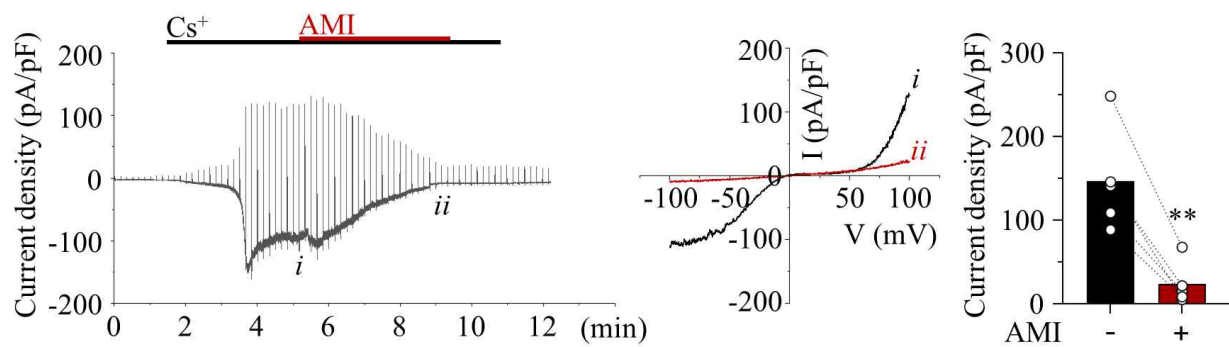
HEK293 세포주에 TRPC4 $\beta$  만을 과발현하고 세포 전체의 전류 변화를 확인하였다. TRPC4 이온통로의 전류 감소를 더 명확하게 관찰하기 위해 세포 내 용액에 200  $\mu$ M GTP $\gamma$ S를 주입 시켜 내인성 (endogenous) G-단백질 활성을 통해 기저 전류 (basal current)를 증가시켰고, Cs<sup>+</sup>-rich 용액에 삼환계 항우울제를 해리시켜 사용하였다. 세포의 초기 전류 크기를 측정된 후 삼환계 항우울제를 노출시키는 것으로 TRPC4 $\beta$ 의 전류 변화를 확인하였다.

삼환계 항우울제 중 가장 대표적으로 많이 사용되었던 아미트립틸린 (AMI) 을 10  $\mu$ M로 세포 외부에 노출시켰을 때,  $146.5 \pm 27.47$  pA/pF였던 TRPC4 $\beta$ 의 전류가  $23.71 \pm 11.38$  pA/pF로 크게 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 10). 다른 타입의 삼환계 항우울제인 10  $\mu$ M의 데시프라민 (DES) 에서도  $5.728 \pm 1.213$  pA/pF에서  $121.9 \pm 15.39$  pA/pF로 감소하는 것을 확인 할 수 있었으며 (Fig. 11), 10  $\mu$ M의 이미프라민 (IMI) 역시  $129.2 \pm 17.34$  pA/pF에서  $49.79 \pm 11.53$  pA/pF로

유사한 TRPC4 전류의 감소 경향성을 확인할 수 있었다 (Fig. 12).

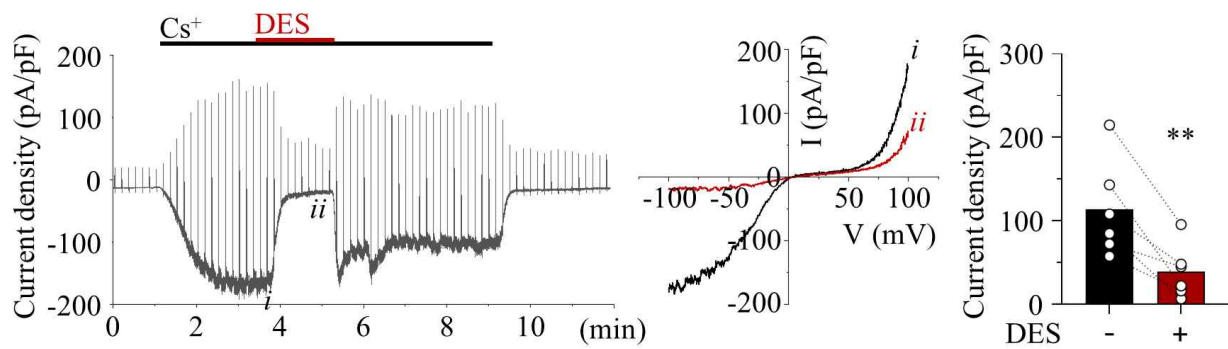
결과적으로 TRPC4 $\beta$  이온통로의 개폐를 직접적으로 감소시키는 삼환계 항우울제의 효과를 확인하였다. 이러한 효과가 오피오이드 수용체가 유발하는 세포 내 신호전달에 의한 TRPC4의 활성화 기전에 영향을 주는지를 판단하고자 하였다.





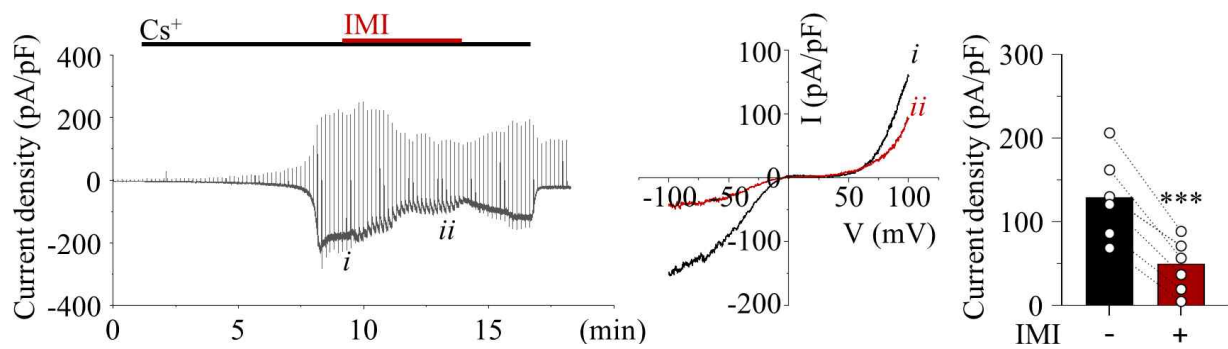
**Figure 10. GTP $\gamma$ S-induced TRPC4 $\beta$  current is inhibited by AMI treatment.**

Representative current trace (*left*) and I-V curve (*middle*) of 200  $\mu$ M GTP $\gamma$ S-activated TRPC4 $\beta$  current induced by 10  $\mu$ M AMI treatment. Summarized bar graph (*right*) of current density (pA/pF) before (black) and after (red) treatment with AMI. Mean values are shown (n=5). \*\* p < 0.01.



**Figure 11. GTP $\gamma$ S-induced TRPC4 $\beta$  current is inhibited by DES treatment.**

Representative current trace (*left*) and I-V curve (*middle*) of 200  $\mu$ M GTP $\gamma$ S-activated TRPC4 $\beta$  current induced by 10  $\mu$ M DES treatment. Summarized bar graph (*right*) of current density (pA/pF) before (black) and after (red) treatment with DES. Mean values are shown (n=12). (\*\* p < 0.01).



**Figure 12. GTP $\gamma$ S-induced TRPC4 $\beta$  current is inhibited by IMI treatment.**

Representative current trace (*left*) and I-V curve (*middle*) of 200  $\mu$ M GTP $\gamma$ S-activated TRPC4 $\beta$  current induced by 10  $\mu$ M IMI treatment. Summarized bar graph (*right*) of current density (pA/pF) before (black) and after (red) treatment with IMI. Mean values are shown (n=6). \*\*\* p < 0.001.

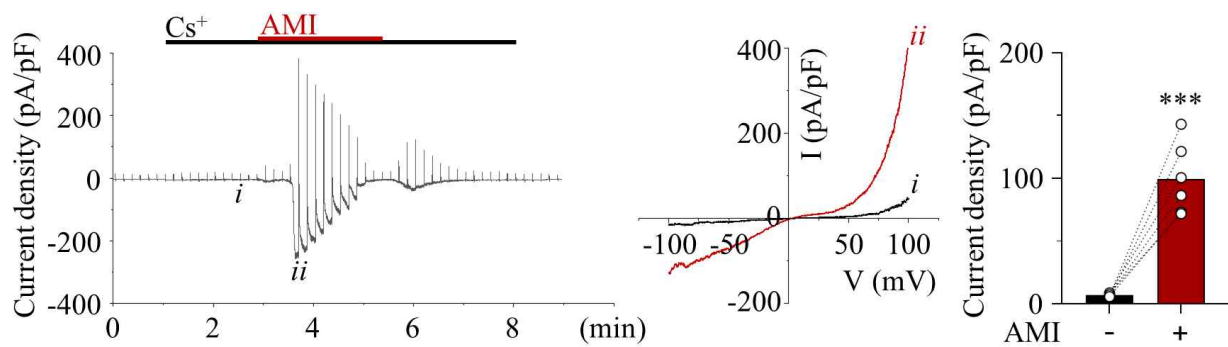
## 2. $\mu$ OR에 의존적인 아미트립틸린에 의한 TRPC4 이온통로의 활성화

앞서 오피오이드 수용체의 활성이 TRPC4 이온통로에 의한 막 전위 상승을 유발한다는 사실을 확인하였으며, 그와 대조적으로 삼환계 항우울제는 TRPC4 이온통로의 직접적인 억제를 유발한다는 것을 검증하였다. 그렇다면, 오피오이드 수용체과 TRPC4 이온통로가 공동 발현된 조건에서 작용제 대신 삼환계 항우울제를 세포 외부에 노출 시킨 경우에 측정되는 TRPC4 이온통로 전류의 변화를 통해 삼환계 항우울제가 어떻게 작용할지 여부를 검증할 수 있을 것으로 생각하였다.

역시 TRPC4 $\beta$  이온통로와 대표적인 오피오이드 수용체인  $\mu$ OR를 공동 발현하고 마찬가지로 세포 외부에 Cs<sup>+</sup>-rich 용액에 해리된 AMI를 노출 시키고, 처치 전후의 전체 세포의 전류 변화를 측정하였다.

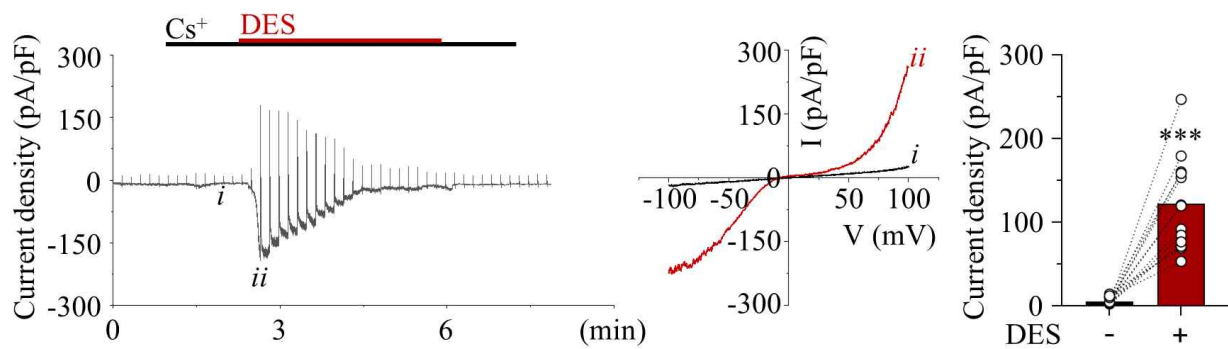
삼환계 항우울제가 TRPC4 $\beta$  이온통로 전류를 유의하게 감소시켰던 앞선 결과와 반대로,  $\mu$ OR의 작용은 TRPC4 $\beta$  이온통로 전류를 증가시켰다. 세포 외부에 노출된 10  $\mu$ M의 AMI는  $7.23 \pm 0.54$  pA/pF의 TRPC4 이온통로 전류를  $99.44 \pm 11.55$  pA/pF로 크게 증가시켰다 (Fig. 13). 이는 AMI 뿐만 아니라 10  $\mu$ M DES 에서 역시  $5.72 \pm 1.213$  pA/pF의 기저 전류에서  $121.9 \pm 15.39$  pA/pF로 크게 상승 된 것을 확인할 수 있었으며 (Fig. 14), 10  $\mu$ M IMI 도  $12.77 \pm 2.36$  pA/p에서  $115.0 \pm 13.76$  pA/pF로 TRPC4 $\beta$  이온통로의 전류를 상승시키는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 15).

흥미롭게도, 우리의 이전 논문에서 관찰되었던 TRPC4 이온통로의 전류를 50% 억제하는 농도인 10  $\mu$ M 삼환계 항우울제에서 TRPC4 이온통로가 활성화 되는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 세포 외부 부위에서 삼환계 항우울제의 결합으로 인한 TRPC4 이온통로의 억제력보다  $\mu$ OR가 유발한 세포 내부 기전에 의한 TRPC4 이온통로의 활성화 작용이 더 우세하게 작용하였음을 의미할 것으로 생각된다.



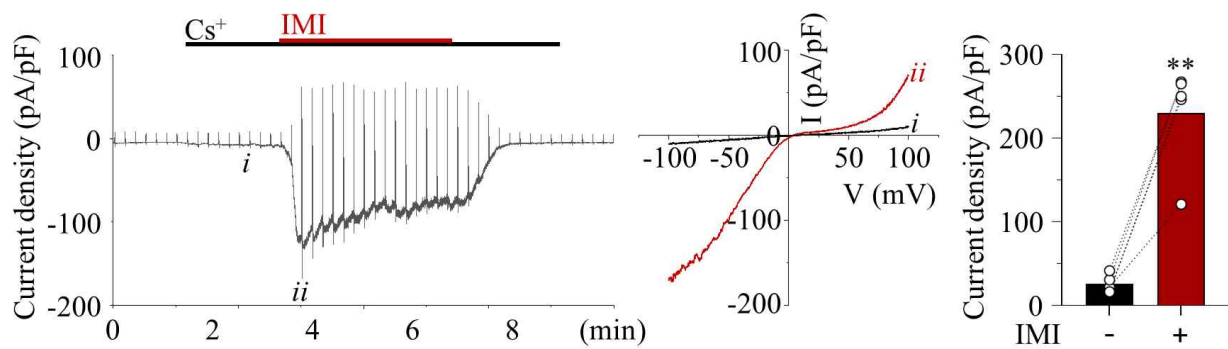
**Figure 13. TRPC4 $\beta$  current is increased by AMI treatment depending on  $\mu$ OR co-expression.**

Representative current trace (*left*) and I-V curve (*middle*) of  $\mu$ OR-coexpressed TRPC4 $\beta$  current to 10  $\mu$ M DAMGO treatment. Summarized bar graph (*right*) of current density (pA/pF) before (black) and after (red) treatment with DES. Mean values are shown (n=5). \*\*\* p < 0.001.



**Figure 14. TRPC4 $\beta$  current is increased by DES treatment depending on  $\mu$ OR co-expression.**

Representative current trace (*left*) and I-V curve (*middle*) of  $\mu$ OR-coexpressed TRPC4 $\beta$  current to 10  $\mu$ M DES treatment. Summarized bar graph (*right*) of current density (pA/pF) before (black) and after (red) treatment with DES, Mean values are shown (n=15). (\*\*\*) p < 0.001).



**Figure 15. TRPC4 $\beta$  current is increased by IMI treatment depending on  $\mu$ OR co-expression.**

Representative current trace (*left*) and I-V curve (*middle*) of  $\mu$ OR-coexpressed TRPC4 $\beta$  current to 10  $\mu$ M IMI treatment. Summarized bar graph (*right*) of current density (pA/pF) before (black) and after (red) treatment with IMI, Mean values are shown (n=4). \*\* p < 0.01.

### 3. $\delta$ OR와 $\kappa$ OR에 의존적인 삼환계 항우울제에 의한 TRPC4 이온통로의 활성화

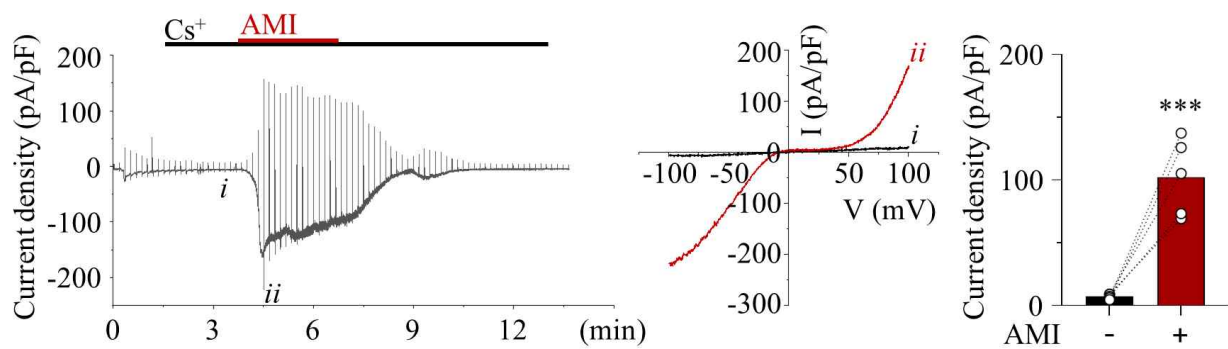
이러한 활성화 기전이  $\mu$ OR 뿐만 아니라 다른 타입의 오피오이드 수용체에서도 유사하게 나타나는지 확인하고자 했다. 역시 TRPC4 $\beta$  이온통로와  $\delta$ OR와  $\kappa$ OR를 각각 공동 발현하고 마찬가지로 세포 외부에 Cs<sup>+</sup>-rich 용액에 해리된 삼환계 항우울제를 노출 시켜 전체 세포의 전류를 측정하였다.

$\mu$ OR 결과와 유사하게,  $\delta$ OR를 공동 발현한 세포 역시 10  $\mu$ M의 AMI는 세포 외부에서  $7.16 \pm 0.87$  pA/pF의 TRPC4 이온통로 전류를  $102.20 \pm 13.68$  pA/pF로 크게 증가시켰으며 (Fig. 16) 같은 농도의 DES에서  $5.83 \pm 1.67$  pA/pF의 기저 전류에서  $147.9 \pm 15.89$  pA/pF (Fig. 17), IMI에서  $9.68 \pm 2.95$  pA/p에서  $97.67 \pm 11.44$  pA/pF로 TRPC4 $\beta$  이온통로의 전류를 상승시키는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 18).

$\kappa$ OR 공동발현 역시 같은 농도의 AMI를 처치하면  $8.48 \pm 2.80$  pA/pF의 TRPC4 $\beta$  이온통로 전류가  $122.9 \pm 3.979$  pA/pF로 전류가 증가 되었으며 (Fig. 19), DES ( $7.28 \pm 2.24$  pA/p에서  $111.4 \pm 21.62$  pA/pF, Fig. 20)과 IMI ( $4.91 \pm 0.52$  pA/p에서  $125.7 \pm 7.82$  pA/pF, Fig. 21) 역시 유사한 증가 효과를 나타냈다.

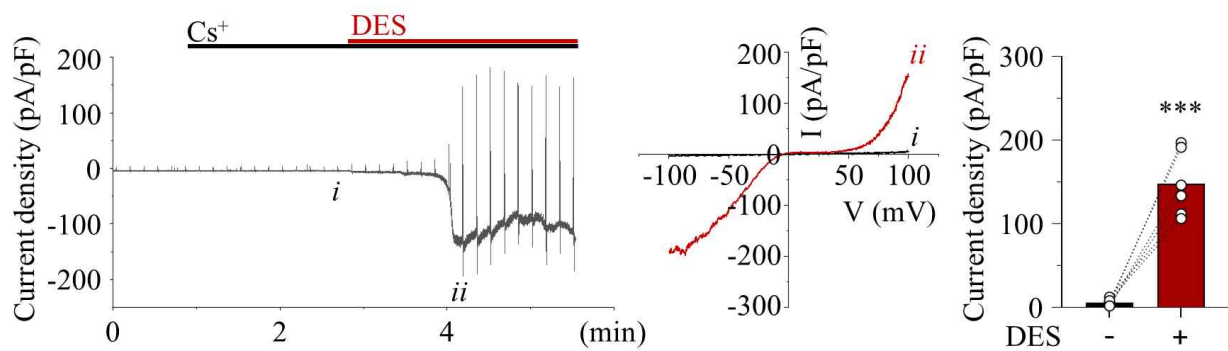
결과적으로 삼환계 항우울제에 의한 TRPC4 이온통로의 활성화는 모든 오피오이드 수용체에서 유사하게 나타났다. 오피오이드 리간드가 결합하는 부위인 결합 포켓 (binding pocket)의 경우 3가지 오피오이드 수용체에 대해서 상의하지만 유사한 위치에서 결합 잔기 (binding residue) 를 가질 것으로 예상하였다.





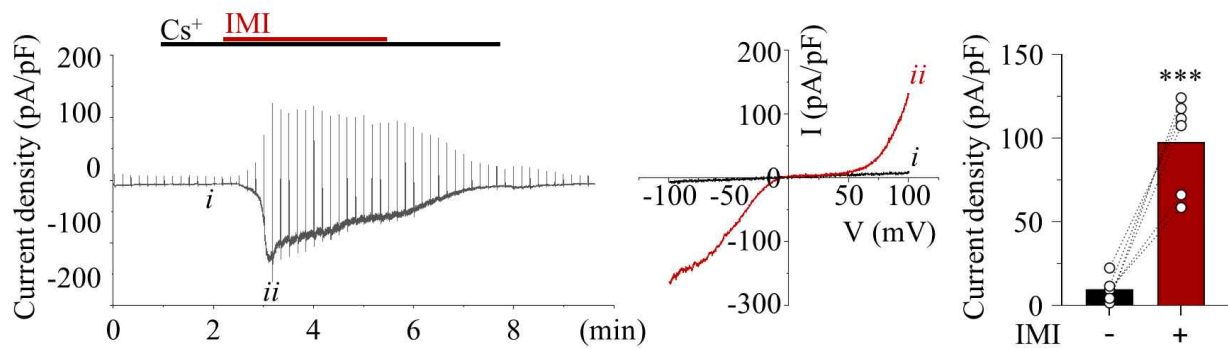
**Figure 16. TRPC4 $\beta$  current is increased by AMI treatment depending on  $\delta$ OR co-expression.**

Representative current trace (*left*) and I-V curve (*middle*) of  $\delta$ OR-coexpressed TRPC4 $\beta$  current to 10  $\mu$ M AMI treatment. Summarized bar graph (*right*) of current density (pA/pF) before (black) and after (red) treatment with AMI, Mean values are shown (n=5). \*\*\* p < 0.001.



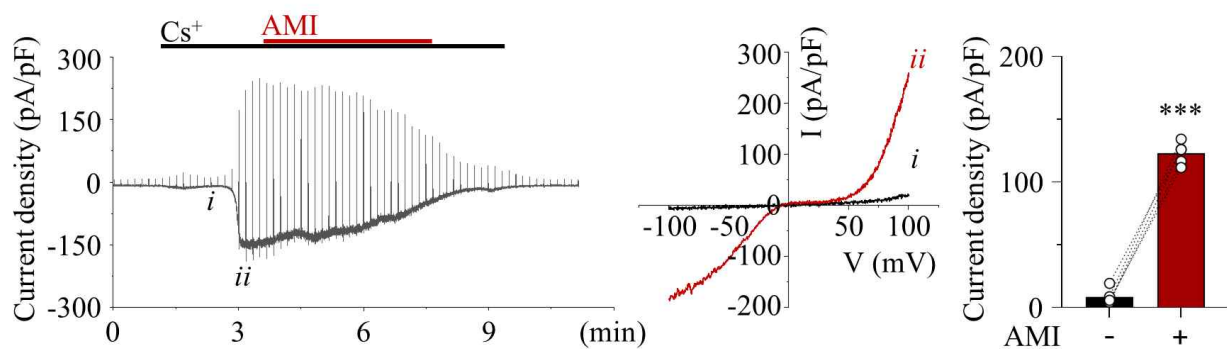
**Figure 17. TRPC4 $\beta$  current is increased by DES treatment depending on  $\delta$ OR co-expression.**

Representative current trace (*left*) and I-V curve (*middle*) of  $\delta$ OR-coexpressed TRPC4 $\beta$  current to 10  $\mu$ M DES treatment. Summarized bar graph (*right*) of current density (pA/pF) before (black) and after (red) treatment with DES, Mean values are shown (n=6). \*\*\* p < 0.001.



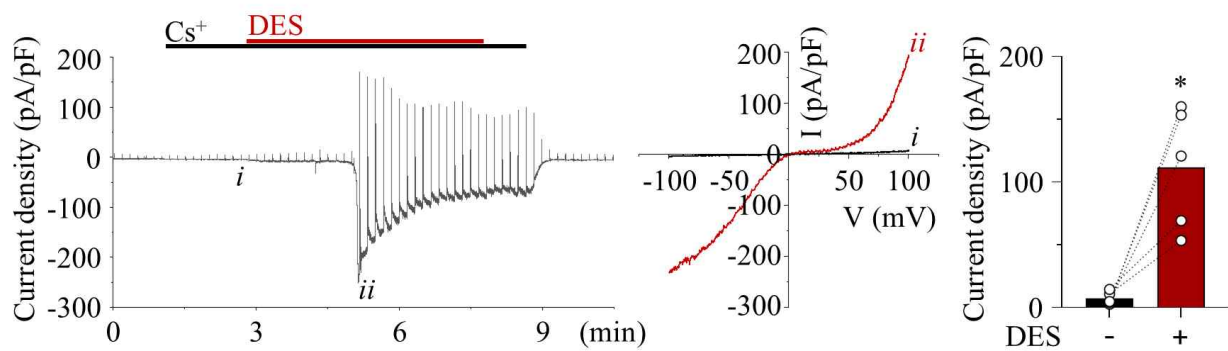
**Figure 18. TRPC4 $\beta$  current is increased by IMI treatment depending on  $\delta$ OR co-expression.**

Representative current trace (*left*) and I-V curve (*middle*) of  $\delta$ OR-coexpressed TRPC4 $\beta$  current to 10  $\mu$ M IMI treatment. Summarized bar graph (*right*) of current density (pA/pF) before (black) and after (red) treatment with IMI, Mean values are shown (\*\*\*)  $p < 0.001$ ).



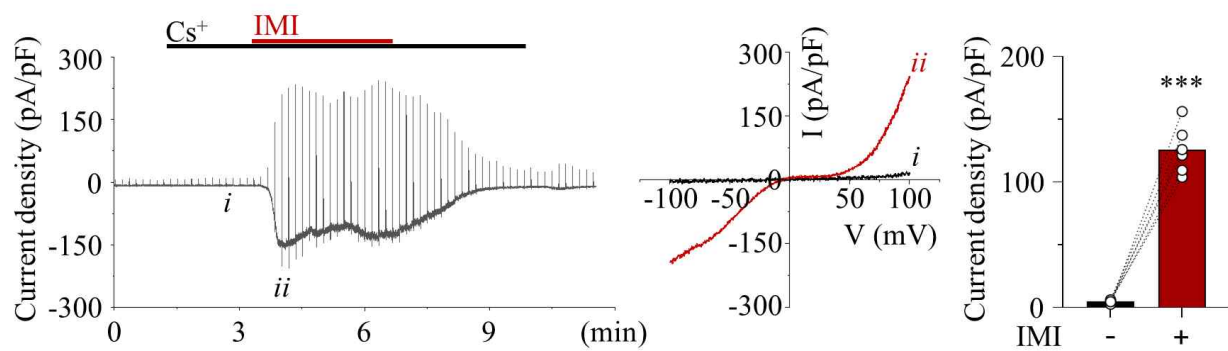
**Figure 19. TRPC4 $\beta$  current is increased by AMI treatment depending on  $\kappa$ OR co-expression.**

Representative current trace (*left*) and I-V curve (*middle*) of  $\kappa$ OR-coexpressed TRPC4 $\beta$  current to 10  $\mu$ M AMI treatment. Summarized bar graph (*right*) of current density (pA/pF) before (black) and after (red) treatment with AMI, Mean values are shown (\*\*\*) p < 0.001).



**Figure 20. TRPC4 $\beta$  current is increased by DES treatment depending on  $\kappa$ OR co-expression.**

Representative current trace (*left*) and I-V curve (*middle*) of  $\kappa$ OR-coexpressed TRPC4 $\beta$  current to 10  $\mu$ M DES treatment. Summarized bar graph (*right*) of current density (pA/pF) before (black) and after (red) treatment with DES, Mean values are shown (\* p < 0.05).



**Figure 21. TRPC4 $\beta$  current is increased by IMI treatment depending on  $\kappa$ OR co-expression.**

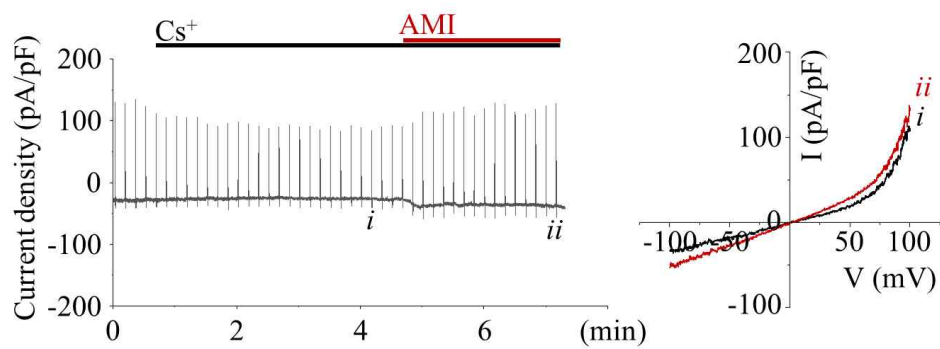
Representative current trace (*left*) and I-V curve (*middle*) of  $\kappa$ OR-coexpressed TRPC4 $\beta$  current to 10  $\mu$ M IMI treatment. Summarized bar graph (*right*) of current density (pA/pF) before (black) and after (red) treatment with IMI, Mean values are shown (n=6). \*\*\* p < 0.001.

#### 4. 농도에 따라 TRPC 활성화에 이상(biphasic) 효과를 보이는 삼환계 항우울제

앞선 Figure 10-12에서, 3가지 종류의 삼환계 항우울제들은 TRPC4 이온통로를 단독으로 발현한 세포에서는 전류를 유의하게 억제하였으나, 오피오이드 수용체와 공동 발현한 세포에서는 오히려 같은 농도에서 활성이 유도되는 이상 효과(biphasic effect)가 나타났다. 동일한 약물에서 한 가지 단백질의 반대 효과를 발휘할 수 있다면, 이는 체내에 직접 작용했을 때, 투여 농도 및 개인 형질에 따른 부작용 증상의 근거가 될 수 있다. 이러한 이상 효과의 기전을 더 명확하게 확인하고 생리적인 투여 전략을 수립하고자 농도별 테스트를 진행하였다.

우리의 이전 보고에서, TRPC4 이온통로의 전류를 직접적으로 억제할 수 있는 half-inhibition concentration (IC<sub>50</sub>)은 AMI에서 10 $\mu$ M으로 측정되었다. 이를 기준으로 log scale 농도의 AMI를 세포 외부에 각각 처치하고 TRPC4 이온통로의 whole cell 전류 변화량의 크기를 측정하였다. 먼저 기존의 억제 농도를 보였던 10  $\mu$ M AMI를 노출시켰을 때, TRPC4 전류의 변화량은 앞선 Figure 10과 유사한 120.04  $\pm$  44.49 pA/pF (Fig. 24)이 측정되었다. 10  $\mu$ M 보다 낮은 농도인 1  $\mu$ M에서 역시 TRPC4 전류의 크기는 104.46  $\pm$  50.88 pA/pF로 큰 차이가 나지 않았다 (Fig. 23). 그보다 더 낮은 농도인 0.1  $\mu$ M AMI에서는 23.53  $\pm$  18.55 pA/pF로 활성 효과가 전혀 발생하지 않았다 (Fig. 22). 하지만 놀랍게도, 10  $\mu$ M보다 더 고농도인 50  $\mu$ M AMI에서는 활성이 나타나지 않았던 0.1  $\mu$ M과 가까운 51.39  $\pm$  25.28 pA/pF의 전류 차이를 보여 (Fig. 25) 오피오이드 수용체에 의한 활성 효과가 감소했다는 사실을 확인했다.

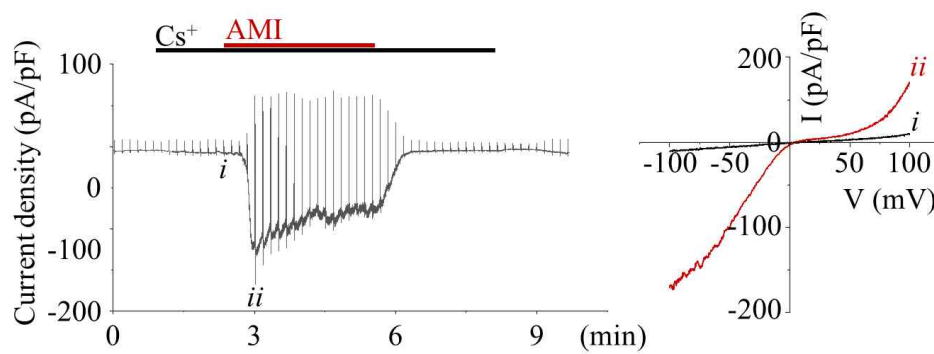
결국 삼환계 항우울제에 의한 TRPC4 이온통로의 직접적인 억제 효과는 동일하게 작용하고 있었으나, 오피오이드 수용체에 의해 활성 되는 세포 내 신호전달 기전이 더 강하게 작용하여 억제 효과가 보여지지 않았던 것으로 확인된다. 이는 농도에 따라 오피오이드 수용체를 활성 시킬수 있는 농도인 1  $\mu$ M 이상에서는 오피오이드 수용체에 의한 세포 내 기전이 동일 하게 작용하여 TRPC4 이온통로의 활성을 유도할 수 있는 것으로 보이나, 50  $\mu$ M 삼환계 항우울제가 유발하는 세포 외부의 결합에 의한 억제효과는 신호전달에 의한 TRPC4 이온통로의 활성보다 더 큰 효과를 지녀 TRPC4 이온통로의 개폐에 혼란을 줄 수 있을 것으로 생각된다. 결과적으로 오피오이드 수용체와 TRPC4 이온통로의 발현량 등에 따라 삼환계 항우울제의 효과는 달라질 수 있을 것으로 생각된다.



**Figure 22. TRPC4 $\beta$  current is not affected by 0.1  $\mu$ M AMI treatment, regardless of  $\mu$ OR co-expression.**

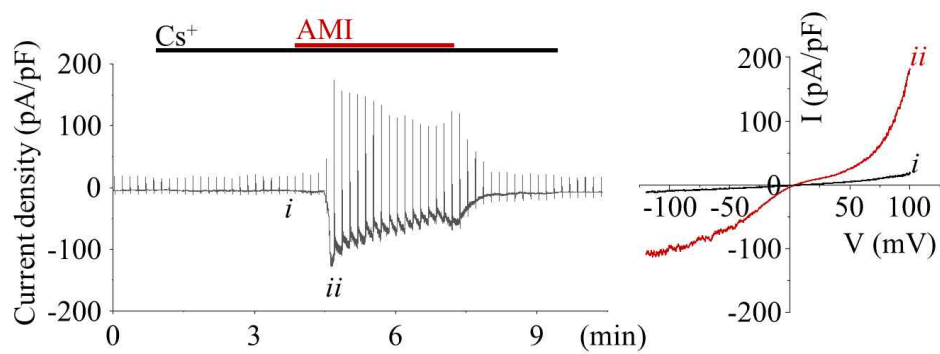
Representative current trace (*left*) and I-V curve (*middle*) of  $\mu$ OR-coexpressed TRPC4 $\beta$  current to 0.1  $\mu$ M AMI treatment.





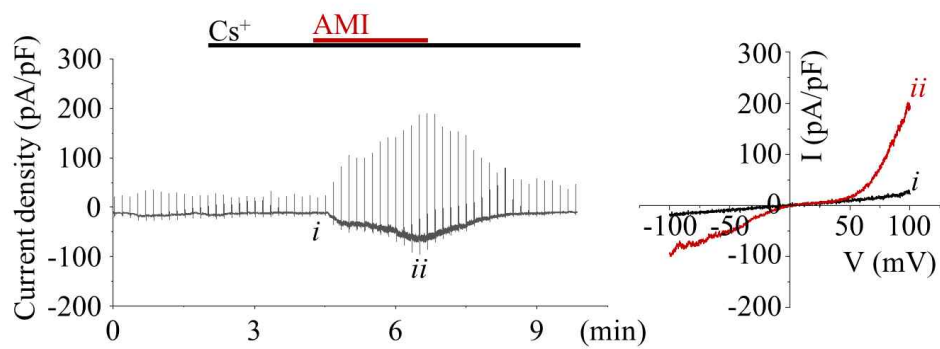
**Figure 23. TRPC4 $\beta$  current is increased by 1  $\mu$ M AMI treatment depending on  $\mu$ OR co-expression.**

Representative current trace (*left*) and I-V curve (*middle*) of  $\mu$ OR-coexpressed TRPC4 $\beta$  current to 1  $\mu$ M AMI treatment.



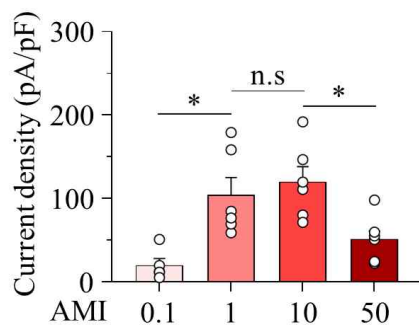
**Figure 24. TRPC4 $\beta$  current is increased by 10  $\mu$ M AMI treatment depending on  $\mu$ OR co-expression**

Representative current trace (*left*) and I-V curve (*middle*) of  $\mu$ OR-coexpressed TRPC4 $\beta$  current to 10  $\mu$ M AMI treatment.



**Figure 25. TRPC4 $\beta$  current is not affected by 50  $\mu$ M AMI treatment, regardless of  $\mu$ OR co-expression**

Representative current trace (*left*) and I-V curve (*middle*) of  $\mu$ OR-coexpressed TRPC4 $\beta$  current to 50  $\mu$ M AMI treatment.



**Figure 26. The increase in TRPC current due to MOR modulation exhibits a biphasic effect, dependent on the concentration of AMI.**

Summarized bar graph (*right*) of current density (pA/pF) for AMI treatment in a dose-dependent manner. 0.1 (n=4), 1 (n=6), 10 (n=6), 50 (N=5) μM of AMI. Mean values are shown (\* p < 0.05).

## 5. G<sub>i</sub>-pathway의 선택적 억제에 따른 삼환계 항우울제의 TRPC4 활성 효과 상실

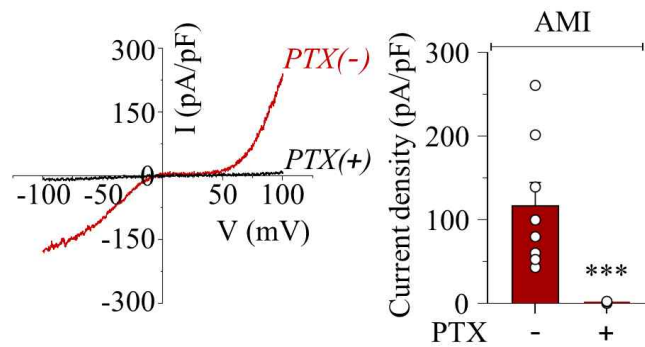
이전 우리의 연구에서는 G<sub>i</sub>-단백질의 하류 신호전달 경로에 의해서 TRPC4 이온통로가 활성화 된다는 사실을 보고했다. 특히, G<sub>α</sub> 서브유닛이 TRPC4 이온통로의 세포 내 영역에 결합하는 것이 TRPC4 이온통로의 개폐를 활성화 시키는데 중요하다고 보고되었다.

때문에, 삼환계 항우울제에 의해서 우세하게 나타나던 TRPC4 이온통로의 활성이 오피오이드 수용체의 세포 내 G<sub>i</sub>-경로에 의존적인지 확인하고자 했다. 먼저 μOR과 TRPC4β 이온통로를 과발현시킨 그룹에서 보편적인 G<sub>i</sub>PCR의 선택적 억제제인 pertussis toxin (PTX)를 16시간 이상 처리하였다. PTX는 G<sub>α<sub>i</sub></sub>의 ADP-ribosylation를 촉매하여 G<sub>α<sub>i</sub></sub>의 구조를 변형시키는 것으로 G<sub>i</sub>PCR의 이종 삼량체 (heterotrimeric G-protein subunit)의 해리 (dissociation)를 억제한다. PTX의 용매인 3.D.W를 16시간 처리한 그룹은 117.20 ± 27.64 pA/pF로 기존의 AMI에 의한 TRPC4의 활성 정도와 유사했으나, PTX가 처리된 그룹은 0.95 ± 0.51 pA/pF로 TRPC4의 활성이 완전히 차단되었다 (Fig. 27). 이는 δOR를 공동발현한 그룹에서도 180.90 ± 23.46 pA/pF에서 PTX를 전처리 했을 때, 9.12 ± 2.16 pA/pF로 크게 감소했으며 (Fig. 28), κOR를 공동 발현 했을 때도 118.0 ± 16.84 pA/pF에서 8.00 ± 4.68 pA/pF로 감소하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 29).

화학적 처리가 아닌 G<sub>α<sub>i</sub></sub>의 기능을 상실한 단백질을 발현했을 때 역시 동일한 차단효과가 나타났다. Dominant-negative G<sub>α<sub>i</sub></sub> mutant은 GTP 결합기능을 제거한 α 서브유닛으로 이는 리간드의 작용에 의한 G<sub>i</sub>PCR의 활성이 나타나지 않는 돌연변이이다. μOR와 TRPC4β, 그리고 Dominant-negative G<sub>α<sub>i</sub></sub> mutant인 G<sub>α<sub>i2</sub></sub>(G203T)를 공동발현하고 AMI에 의한 활성을 확인하였다. 99.72 ± 7.33 pA/pF였던 TRPC4β 전류가 12.06 ± 3.17 pA/pF로 감소하는 것을 확인하였고 (Fig. 30), δOR에서는 180.92 ± 23.46 pA/pF에서 9.12 ± 2.16 pA/pF (Fig. 31), κOR를 공동 발현했을 때도 212.03 ± 34.54 pA/pF에서 5.92 ± 2.07 pA/pF로 크게 감소하는 것을 확인 할 수 있었다 (Fig. 32).

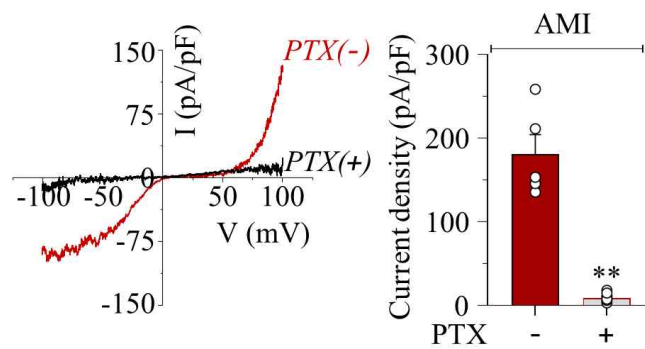
결과적으로 AMI에 의한 TRPC4 이온통로 전류의 증가에 G<sub>i</sub>-경로가 중요하다는 것을 확인하였다. 이는 세포 외부에서 작용하는 화학적 결합보다 세포 내부의

신호전달이 TRPC4 이온통로를 활성화시킨다는 것을 시사할 수 있으며, 역시 삼환계 항우울제가 유발하는 TRPC4 이온통로의 직접적인 억제 기전보다  $G_i$ -경로에 의한 개폐작용이 경쟁적으로 우세하다는 가설을 제안할 수 있다.



**Figure 27. PTX pre-treatment blocks AMI-induced activation of TRPC4, which was modulated by  $\mu$ OR modulation.**

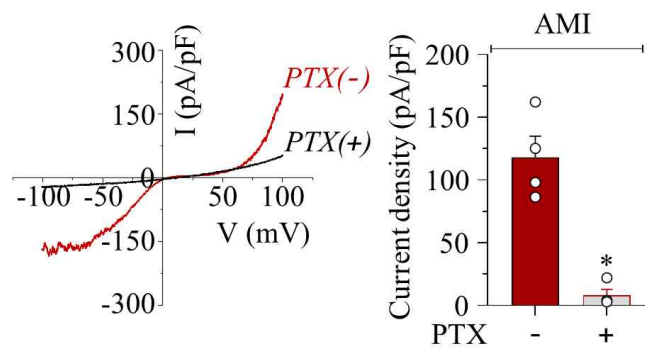
I-V curve (*right*) showed  $\mu$ OR-coexpressed TRPC4 $\beta$  current induced by 10  $\mu$ M AMI treatment. Summarized bar graph (*left*) showing current density (pA/pF) of DMSO (red) (n=8) or 100 nM PTX pretreatment for 16 hr (gray) (n=5). \*\*\* p < 0.001.



**Figure 28. PTX pre-treatment blocks AMI-induced activation of TRPC4, which was modulated by  $\delta$ OR modulation.**

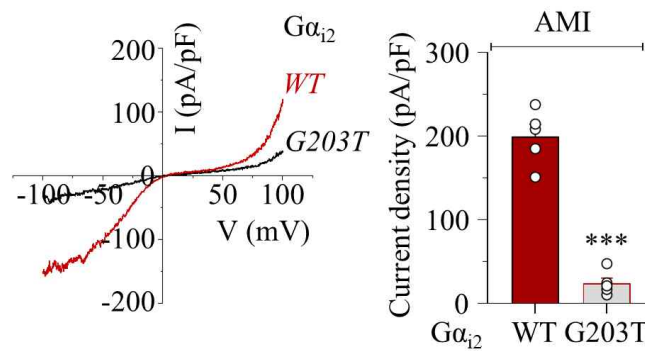
I-V curve (*right*) showed  $\delta$ OR-coexpressed TRPC4 $\beta$  current induced by 10  $\mu$ M AMI treatment. Summarized bar graph (*left*) showing current density (pA/pF) of DMSO (red) (n=5) or 100 nM PTX pretreatment for 16 hr (gray) (n=5). \*\* p < 0.01.





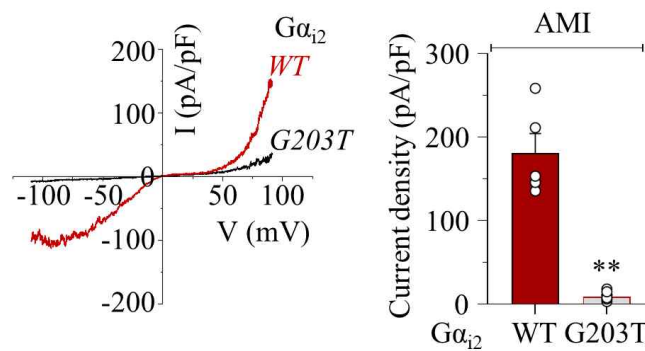
**Figure 29. PTX pre-treatment blocks AMI-induced activation of TRPC4, which was modulated by  $\kappa$ OR modulation.**

I-V curve (*right*) showed  $\kappa$ OR-coexpressed TRPC4 $\beta$  current induced by 10  $\mu$ M AMI treatment. Summarized bar graph (*left*) showing current density (pA/pF) of DMSO (red) (n=4) or 100 nM PTX pretreatment for 16 hr (gray) (n=5). \* p < 0.05.



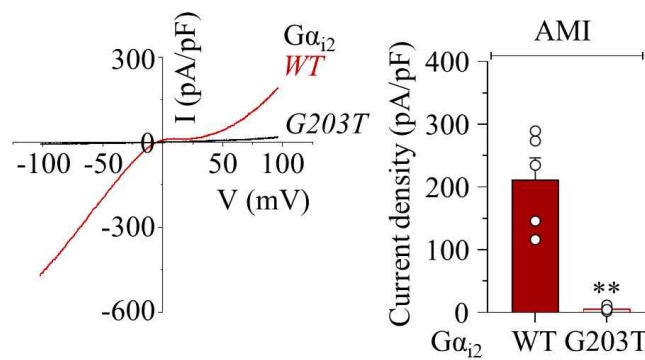
**Figure 30. Dominant negative mutant of  $G\alpha_{i2}$  inhibits AMI-induced activation of TRPC4, which was modulated by  $\mu$ OR modulation.**

I-V curve (*right*) showed  $\mu$ OR-coexpressed TRPC4 $\beta$  current induced by 10  $\mu$ M AMI treatment. Summarized bar graph (*left*) showing current density (pA/pF) of  $G\alpha_{i2}$  wild-type (red) (n=5) or  $G\alpha_{i2}(G203T)$  (gray) expression (n=7). \*\*\*  $p < 0.001$ .



**Figure 31. Dominant negative mutant of  $G\alpha_{i2}$  inhibits AMI-induced activation of TRPC4, which was modulated by  $\delta$ OR modulation.**

I-V curve (*right*) showed  $\delta$ OR-coexpressed TRPC4 $\beta$  current induced by 10  $\mu$ M AMI treatment. Summarized bar graph (*left*) showing current density (pA/pF) of  $G\alpha_{i2}$  wild-type (red) (n=5) or  $G\alpha_{i2}(G203T)$  (gray) expression (n=5). \*\* p < 0.01.



**Figure 32. Dominant negative mutant of  $G\alpha_{i2}$  inhibits AMI-induced activation of TRPC4, which was modulated by  $\kappa$ OR modulation.**

I-V curve (*right*) showed  $\kappa$ OR-coexpressed TRPC4 $\beta$  current induced by 10  $\mu$ M AMI treatment. Summarized bar graph (*left*) showing current density (pA/pF) of  $G\alpha_{i2}$  wild-type (red) (n=5) or  $G\alpha_{i2}$ (G203T) (black) expression (n=4). \*\* p < 0.01.

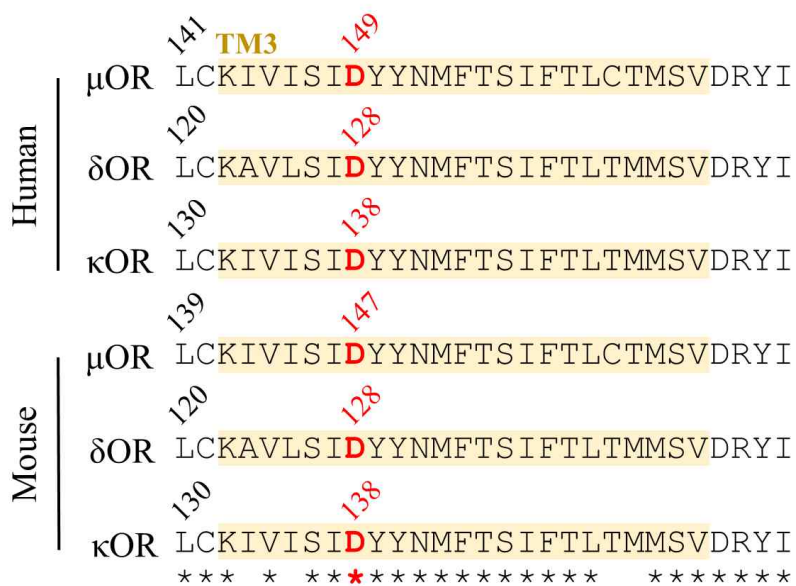
### 제 3 절. 오피오이드 수용체의 삼환계 항우울제 결합 부위

#### 1. 오피오이드 수용체의 리간드 결합 부위와 편향된 작용성

앞서 서론에서 전술하였듯이, 최근 몇 십 년간의 연구들은, 오피오이드 수용체의 세포 내 활동이 복잡한 그룹의 약물학적 반응으로 전달되는 중요한 세포내 신호전달 경로를 분석하기 시작했다. 외부 리간드 종류 및 결합 부위에 따라 세포내 신호전달의 종류가  $G_{i/o}$ -경로 혹은  $\beta$ -어레스틴 ( $\beta$ -arrestin) 신호전달 경로, 이렇게 두 가지 종류의 세포 내 신호전달이 유발된다고 밝혀졌다. 특히, 공간적인 분자 재배열에 따른 orthosteric 리간드들의 선호적인 신호전달 경로를 유도하는 현상은 ‘편향된 작용성 (biased agonism)’ 또는 ‘기능적 선택성 (functional selectivity)’이라고 불리며 수용체의 구조적 변화와 결합 잔기 (binding residue) 에 의존하는 것으로 보인다.

이러한 구조적 차이를 이해하고, 삼환계 항우울제가 부착될 만한 부위를 선별하여 세포내 기전과 TRPC4 이온통로의 활성화에 미치는 영향에 관해 검증하고자 했다. 기존에 선택적 작용제와 함께 Cryo-EM 및 X-선 회절법을 통해 밝혀진 오피오이드 수용체의 분자구조를 기반으로 오피오이드 수용체의 결합 부위 (binding pocket)를 확인했고, 이 리간드 결합 잔기 중 삼환계 항우울제가 결합할만한 부위를 예측했다. 삼환계 항우울제의 주요한 기전인 노르에피네프린 운송체 (norepinephrine transporter) 혹은 세로토닌 운송체 (serotonin transporter) 억제 기전에서 삼환계 항우울제의 아민 잔기 (amine group)가 결합에 주요하다고 알려져 있으며, 이 양성 전하와 결합 할 수 있는 음성 잔기를 찾고자 하였다.

이 중 세 가지 종류의 오피오이드 수용체에서 공통적으로 가장 유력하게 계산된 것이 세포막 횡단 도메인 (transmembrane domain, TM) 3번의 아스파르트산 (aspartate, Asp, D)이다 (Fig. 33). 세포막 helix에 존재하는 잔기 중 세포 외측에 가까운 결합 부위이며, 많은 오피오이드 수용체의 단백질 구조체 보고에서 작용제의 결합 부위이자 수용체 활성화에 결정적인 부위로 제안되었다.



**Figure 33. The sequence alignment of OR subtypes**

The sequence alignment of OR subtypes from above  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\kappa$  of human and mouse species.

## 2. Asp 잔기의 돌연변이에 따른 아미트립틸린에 의한 TRPC4 활성화 억제

그렇다면, AMI이 예측된 Asp에 결합하여 TRPC4 이온통로의 활성화에 영향을 줄 수 있을지 확인하고자 했다. 음성 잔기인 Asp와 반대 전하를 띠는 아르기닌 (Arginine, Arg, R) 잔기로 Asp를 돌연변이 시키고, TRPC4 $\beta$  이온통로와 공동 발현한 후 선택적 작용제와 AMI에 의한 TRPC4 $\beta$  이온통로의 전류를 측정했다.

$\mu$ OR의 돌연변이 단백질인  $\mu$ OR(D147R)와 TRPC4 $\beta$  이온통로를 공동 발현한 세포에서 DAMGO의 활성화는  $10.95 \pm 3.70$  pA/pF에서  $131.7 \pm 31.02$  pA/pF로 TRPC4 이온통로 활성화도의 상승이  $\mu$ OR의 야생형과 큰 차이를 보이지 않았다 (Fig. 34). 이는  $\delta$ OR의 돌연변이 단백질인  $\delta$ OR(D128R)과  $\kappa$ OR의 돌연변이체  $\kappa$ OR(D138R)에서도 동일하였는데, DPDPE의 활성화는  $3.05 \pm 0.49$  pA/pF에서  $101.1 \pm 29.1$  pA/pF (Fig. 35), U50488의 활성화는  $11.5 \pm 5.24$  pA/pF에서  $172.4 \pm 41.46$  pA/pF (Fig. 36)로 역시 야생형과 큰 차이가 없었다.

하지만  $\mu$ OR(D147R)에 의한 AMI의 반응은  $1.65 \pm 0.70$  pA/pF에서  $5.97 \pm 2.28$  pA/pF으로 활성을 전혀 보이지 않았으며 (Fig. 37),  $\delta$ OR(D128R)에서  $3.05 \pm 0.49$  pA/pF에서  $6.70 \pm 1.44$  pA/pF (Fig. 38),  $\kappa$ OR(D138R)에서  $3.52 \pm 0.69$  pA/pF에서  $5.49 \pm 0.72$  pA/pF (Fig. 39)로 역시 전혀 활성이 보이지 않았다.

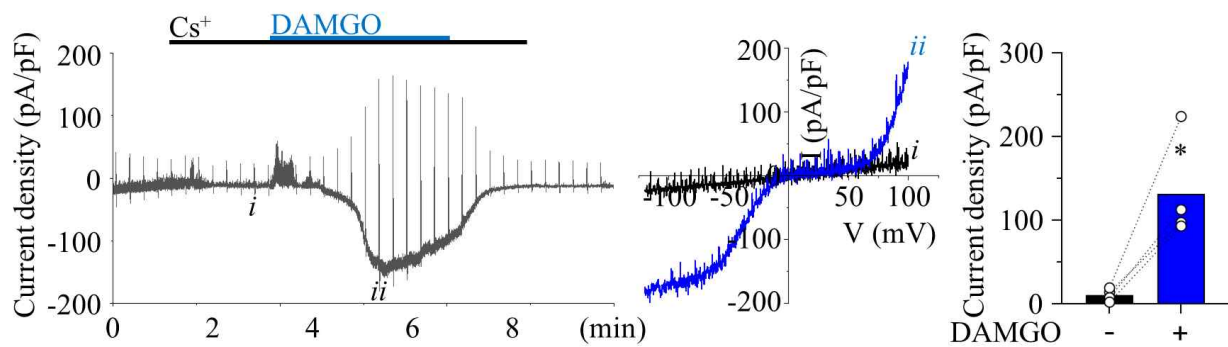
결과적으로 TM3의 Asp는 AMI의 활성화에 결정적인 부위일 것으로 예상하였다.  $\mu$ OR의 경우 야생형에서  $89.43 \pm 24.04$  pA/pF의 전류 상승을 보이던 것이 D147R의 경우  $5.97 \pm 2.28$  pA/pF로 감소했으며 (Fig. 40), OR은  $78.93 \pm 13.92$  pA/pF의 증가가 D128R에서  $6.70 \pm 1.44$  pA/pF로 완전히 차단되었으며 (Fig. 41), OR역시  $120.6 \pm 4.68$  pA/pF이 D138R 변이로  $2.34 \pm 0.93$  pA/pF로 사라졌다 (Fig. 42). 한 개의 잔기 변이가 삼환계 항우울제의 리간드 작용이 완전히 차단한 것을 알 수 있다.

그러나 선택적 작용제에서는 큰 효과를 보이지 않는 것을 확인 할 수 있었는데, OR 야생형에서  $155.0 \pm 25.11$  pA/pF과 D147R에서  $96.40 \pm 5.15$  pA/pF으로 약간의 감소를 보였으나 유의한 차이는 아니었으며 (Fig. 43), OR 야생형에서도 DPDPE에 의한  $132.2 \pm 38.12$  pA/pF 전류 상승이  $101.1 \pm 29.10$  pA/pF로 큰 차이가 없었고 (Fig. 44), OR 역시 U50488에 의해  $125.7 \pm 7.82$  pA/pF에서  $135.9 \pm 17.00$  pA/pF로 전혀 전류 크기에 차이를 보이지 않았다 (Fig. 45). 이는 해당 선택적 작용제가 Asp

이외에 다른 잔기에 결합하는 것으로도 활성을 나타내기에 충분할 것으로 해석된다.

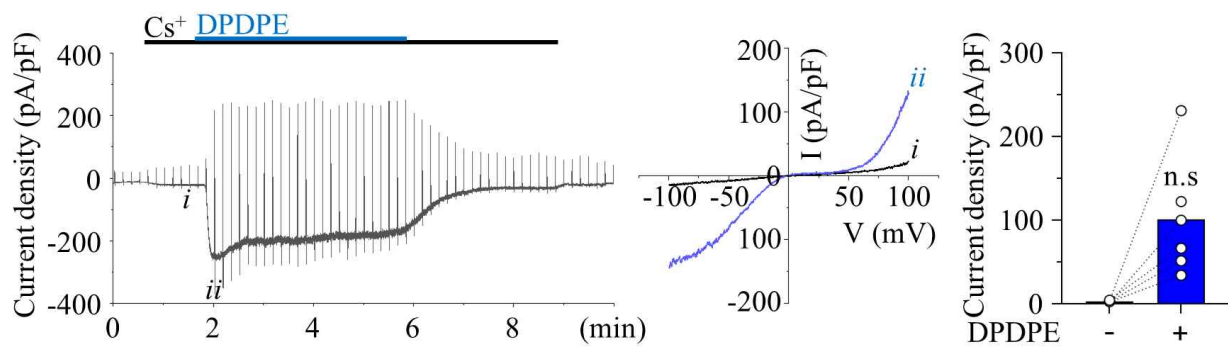
지금까지의 연구결과에 따르면, 편향된 작용성은 결합부위에 있는 작용 잔기의 종류가 결정하는데 중요한 요소로 보고되었다. TM3의 Asp는 대부분의 리간드 활성에 중요할 것으로 제안되어 왔으며, 특히  $G_i$ -경로를 주도하는 잔기로써 제안되어왔다. 작용제 연구에서 Asp 이외의 결합에 의한 구조 변경이 세포 내에서 중요할 것이라는 것은 확인할 수 있었으나, Asp 잔기 결합만으로도  $G_i$ -경로에 충분한 활성을 유도할 수 있다는 사실이 AMI 결과로써 검증되었다.





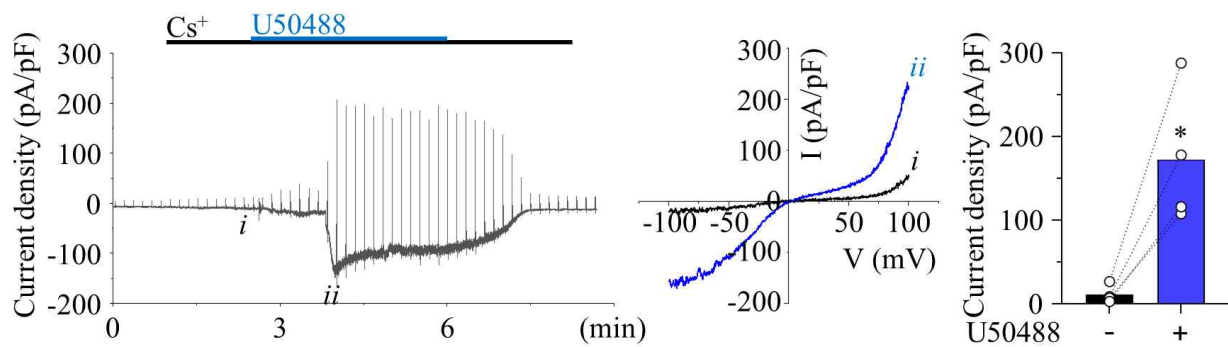
**Figure 34. The  $\mu$ OR(D147R) mutant did not alter DAMGO-induced TRPC4 activation.**

Representative current trace (*left*) and I-V curve (*middle*) of  $\mu$ OR(D147R)-coexpressed TRPC4 $\beta$  current to 50 nM DAMGO treatment. Summarized bar graph (*right*) of current density (pA/pF) before (black) and after (red) treatment with DAMGO. Mean values are shown (n=4). \* p < 0.05.



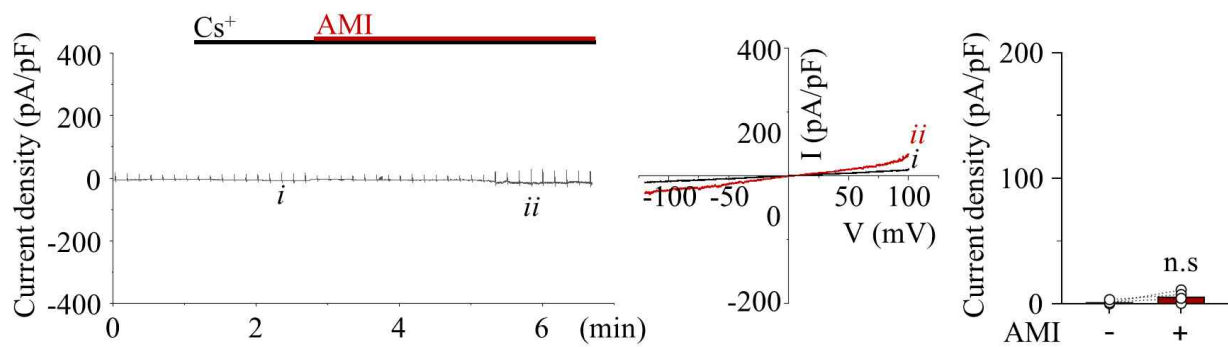
**Figure 35. The  $\delta$ OR(D128R) mutant did not alter DPDPE-induced TRPC4 activation.**

Representative current trace (*left*) and I-V curve (*middle*) of  $\delta$ OR(D128R)-coexpressed TRPC4 $\beta$  current to 0.1  $\mu$ M DPDPE treatment. Summarized bar graph (*right*) of current density (pA/pF) before (black) and after (red) treatment with DPDPE. Mean values are shown (n=6). \*\*\* p < 0.001.



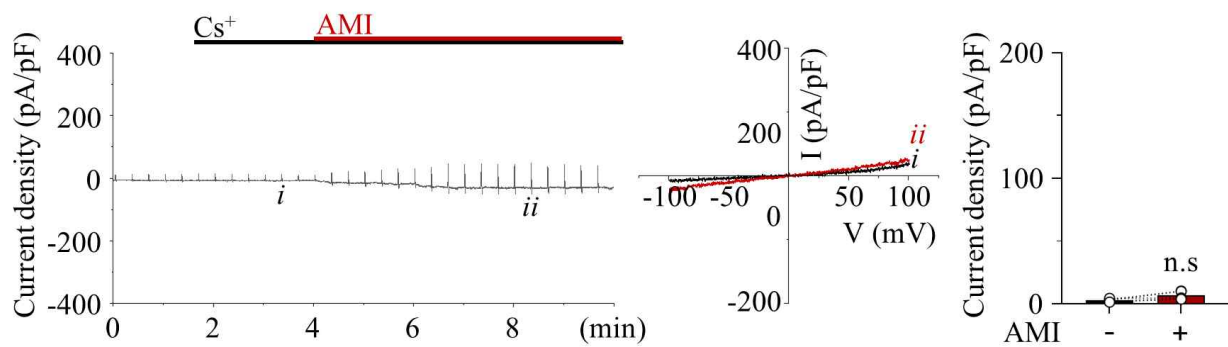
**Figure 36. The  $\kappa$ OR(D138R) mutant did not alter U50488-induced TRPC4 activation.**

Representative current trace (*left*) and I-V curve (*middle*) of  $\kappa$ OR(D138R)-coexpressed TRPC4 $\beta$  current to 10  $\mu$ M U50488 treatment. Summarized bar graph (*right*) of current density (pA/pF) before (black) and after (red) treatment with U50488. Mean values are shown (n=4). \*\*\* p < 0.001.



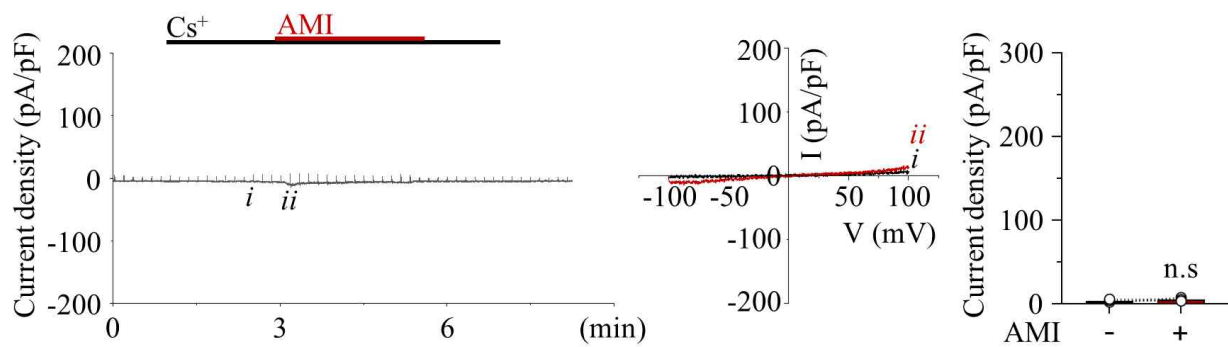
**Figure 37. The increase in TRPC4 current triggered by AMI did not occur in  $\mu$ OR(D147R).**

Representative current trace (*left*) and I-V curve (*middle*) of  $\mu$ OR(D147R)-coexpressed TRPC4 $\beta$  current to 10 $\mu$ M AMI treatment. Summarized bar graph (*right*) of current density (pA/pF) before (black) and after (red) treatment with AMI. Mean values are shown (n=6). n.s: non-significant.



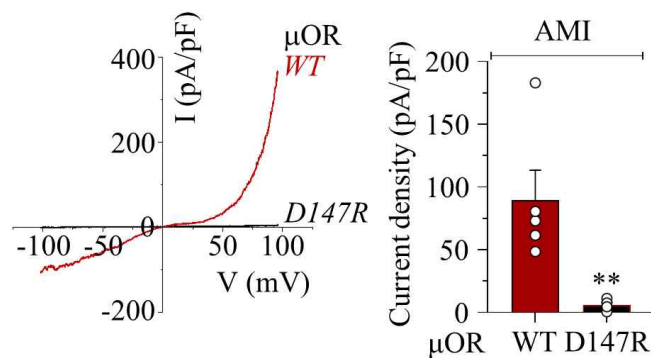
**Figure 38. The increase in TRPC4 current triggered by AMI did not occur in  $\delta$ OR(D128R).**

Representative current trace (*left*) and I-V curve (*middle*) of  $\delta$ OR(D128R)-coexpressed TRPC4 $\beta$  current to 10 $\mu$ M AMI treatment. Summarized bar graph (*right*) of current density (pA/pF) before (black) and after (red) treatment with AMI. Mean values are shown (n=5). n.s: non-significant.



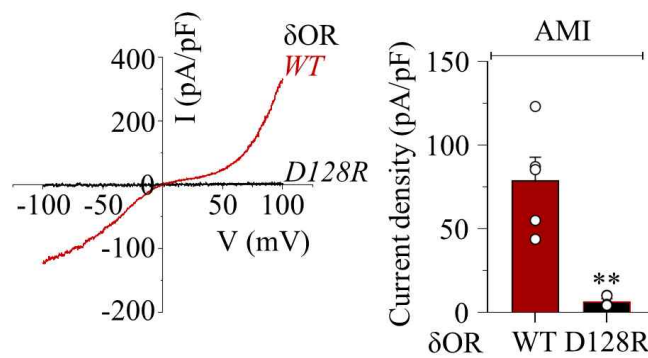
**Figure 39. The increase in TRPC4 current triggered by AMI did not occur in  $\kappa$ OR(D138R).**

Representative current trace (*left*) and I-V curve (*middle*) of  $\kappa$ OR(D138R)-coexpressed TRPC4 $\beta$  current to 10  $\mu$ M AMI treatment. Summarized bar graph (*right*) of current density (pA/pF) before (black) and after (red) treatment with AMI. Mean values are shown (n=5). n.s: non-significant.



**Figure 40. The  $\mu$ OR(D147R) mutation induces diminished activation of TRPC4 by AMI.**

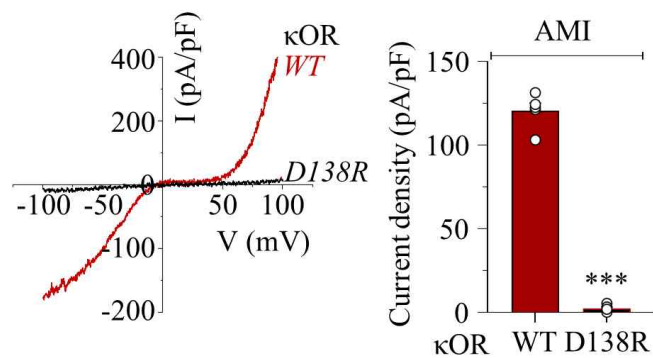
I-V curve (*right*) showed  $\mu$ OR-coexpressed TRPC4 $\beta$  current induced by 10  $\mu$ M AMI treatment. Summarized bar graph (*left*) showing current density (pA/pF) of  $\mu$ OR wild-type (red) (n=6) or  $\mu$ OR(D147R) (black) expression (n=7). \*\* p < 0.01.



**Figure 41. The  $\delta\text{OR(D128R)}$  mutation induces diminished activation of TRPC4 by AMI.**

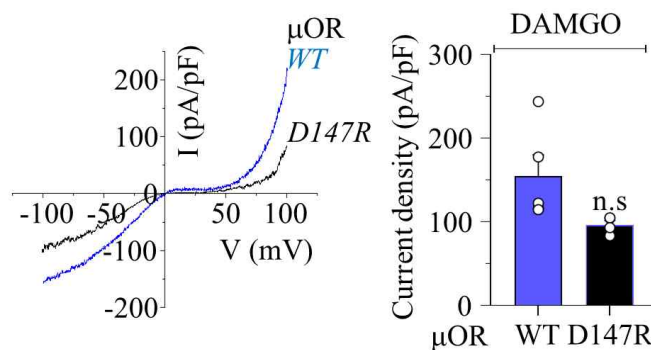
I-V curve (*right*) showed  $\delta\text{OR}$ -coexpressed TRPC4 $\beta$  current induced by 10  $\mu\text{M}$  AMI treatment. Summarized bar graph (*left*) showing current density (pA/pF) of  $\delta\text{OR}$  wild-type (red) (n=5) or  $\delta\text{OR(D128R)}$  (black) expression (n=4). \*\* p < 0.01.





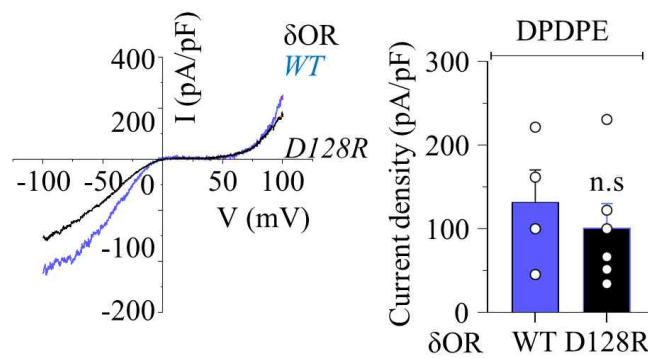
**Figure 42. The  $\kappa$ OR(D138R) mutation induces diminished activation of TRPC4 by AMI.**

I-V curve (*right*) showed  $\kappa$ OR-coexpressed TRPC4 $\beta$  current induced by 10  $\mu$ M AMI treatment. Summarized bar graph (*left*) showing current density (pA/pF) of  $\kappa$ OR wild-type (red) (n=4) or  $\kappa$ OR(D138R) (black) expression (n=5). \*\* p < 0.01.



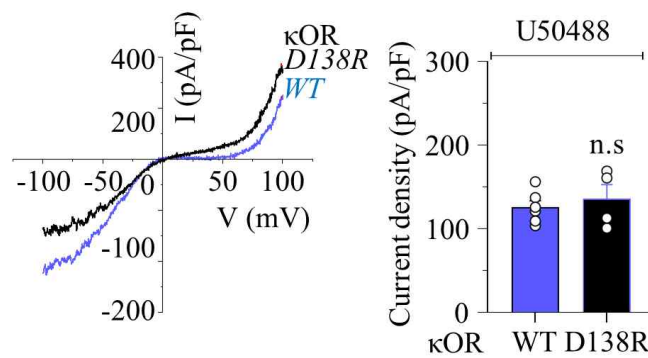
**Figure 43. The  $\mu$ OR(D147R) mutation induces diminished activation of TRPC4 by DAMGO.**

I-V curve (*right*) showed  $\mu$ OR-coexpressed TRPC4 $\beta$  current induced by 50 nM DAMGO treatment. Summarized bar graph (*left*) showing current density (pA/pF) of  $\mu$ OR wild-type (blue) (n=4) or  $\mu$ OR(D147R) (black) expression (n=4). n.s: non-significant.



**Figure 44. The  $\delta$ OR(D128R) mutation induces diminished activation of TRPC4 by DPDPE.**

I-V curve (*right*) showed  $\delta$ OR-coexpressed TRPC4 $\beta$  current induced by 100 nM DPDPE treatment. Summarized bar graph (*left*) showing current density (pA/pF) of  $\delta$ OR wild-type (blue) (n=4) or  $\delta$ OR(D128R) (black) expression (n=6). n.s: non-significant.



**Figure 45. The  $\kappa$ OR(D138R) mutation induces diminished activation of TRPC4 by U50488.**

I-V curve (*right*) showed  $\kappa$ OR-coexpressed TRPC4 $\beta$  current induced by 10  $\mu$ M U50488 treatment. Summarized bar graph (*left*) showing current density (pA/pF) of  $\kappa$ OR wild-type (blue) (n=6) or  $\kappa$ OR(D138R) (black) expression (n=4). n.s: non-significant.

## 제 4 장. 고 찰

본 연구는 삼환계 항우울제와 오피오이드 수용체의 상호작용, 그리고 이로 인한 TRPC4 이온통로의 활성 변화를 패치 클램프 (patch clamp)를 이용해서 TRPC4-induced whole cell current를 측정하여 확인하였다.

연구 결과의 주요 요약은 다음과 같다.

1.  $\mu$ OR과 TRPC4 이온통로가 공동 발현된 세포에서, AMI가 TRPC4 전류를 증가시키는 것을 확인하였다. 이는 오피오이드 수용체의 활성화가 TRPC4 이온통로의 활성화를 유발한다는 것을 시사한다.
2. 삼환계 항우울제가 TRPC4 이온통로를 직접 억제하는 것을 확인하였다. 이전에 우리 그룹의 연구에서도 삼환계 항우울제의 TRPC4 이온통로 억제 효과를 보고한 바 있으며, 이번 연구를 통해 그 결과를 재확인 하였다.
3. 특히 흥미로운 결과는, 오피오이드 수용체와 TRPC4 이온통로가 공동 발현된 상태에서 삼환계 항우울제를 처리하면 TRPC4 이온통로 전류에 변화가 생긴다는 것이다. 삼환계 항우울제에 의한 TRPC4 이온통로 활성변화는 모든 오피오이드 수용체에서 비슷하게 나타났고, 이는 오피오이드 수용체와 TRPC4 이온통로의 발현 수준에 따라 삼환계 항우울제의 효과가 달라질 수 있음을 시사한다.
4. 또한,  $G_i$ -경로의 선택적 억제에 따른 삼환계 항우울제의 TRPC4 이온통로 활성 효과의 상실을 검토하였다.  $G_i$ -경로가 TRPC4 이온통로의 활성화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. PTX와 dominant-negative  $G_{\alpha i}$  mutant를 사용하여  $G_i$ -경로를 억제하고, 그 결과로 TRPC4 이온통로 전류의 변화를 측정하였다. 이를 통해  $G_i$ -경로의 선택적 억제로 인해 삼환계 항우울제에 의한 TRPC4 이온통로의 활성이 상실되는 것을 확인하였다.
5. 마지막으로, 오피오이드 수용체의 삼환계 항우울제 결합 부위를 조사하였다. 이전 연구에서 제공된 오피오이드 수용체의 결합 부위와 작용성에 대한 구조적인 정보를 바탕으로, 삼환계 항우울제가 결합할 가능성이 있는 부위를 예측하였다. 실험에서는 해당 부위의 아스파르트산 (Asp) 잔기를 아르기닌

(Arg)으로 돌연변이시키고, 이에 따른 TRPC4 이온통로의 활성 변화를 조사했다. 결과적으로, 아스파르트산 잔기의 돌연변이로 인해 삼환계 항우울제의 활성이 완전히 차단되는 것을 확인했다. 이는 아스파르트산 잔기가 삼환계 항우울제의 리간드 작용에 결정적인 역할을 하는 것을 시사한다.

결과적으로, 삼환계 항우울제와 오피오이드 수용체의 상호작용은 TRPC4 이온통로의 활성 변화에 중요한 영향을 끼친다는 것을 알 수 있었다. 특히,  $G_i$ -경로와 아스파르트산 잔기가 삼환계 항우울제의 효과에 중요한 역할을 하는 것을 확인하였다. 또한 삼환계 항우울제가 TRPC4 이온통로에 직접적이거나 간접적으로 활성화 또는 억제 효과를 발생시킬 수 있으며, 이러한 이상 효과 (biphasic effect)는 삼환계 항우울제가 초래하는 부작용 증상에 중요한 기전으로 작용할 가능성이 있다는 추측을 할 수 있다.

먼저, 오피오이드 수용체와 TRPC4 이온통로의 상호작용은 뇌에서의 신경전달에서 중요한 역할을 한다는 것이 알려져 있다. 이전 연구에서는 오피오이드 수용체의 활성화가 TRPC4 이온통로의 개폐작용을 조절한다고 보고되었고, 특히 amygdala에서 발현된 TRPC4 이온통로와 특정 오피오이드 수용체의 상호작용 메커니즘이 진통 작용에 있어 하위 신호 전달로 작용할 가능성이 있다. 이에 따라 본 연구에서는 오피오이드 수용체와 TRPC4 이온통로의 상호작용 메커니즘을 더 자세히 이해하기 위해 실험을 진행하였다.  $\mu$ OR,  $\delta$ OR,  $\kappa$ OR과 TRPC4 $\beta$  이온통로를 공동으로 발현한 세포에서 선택적 작용제와 AMI에 의한 TRPC4 이온통로의 활성 변화를 관찰하였으며, 이를 위해 전류 변화를 측정하였다. 오피오이드 수용체의 활성화는 여전히 TRPC4 이온통로의 활성을 유도하는데 충분했고, 특히 D-R mutant에서는 작용제 (agonist)의 자극에 따른 TRPC4 이온통로의 활성 감소가 있었지만, 여전히 활성화 되는 것을 확인하였다. 이로부터 단일 결합 부위 이외에도 추가적인 결합 부위가 존재 할 것이라는 추론을 할 수 있었다.

그러나 몇 가지 고려해야 할 의문점과 제한 사항은 분명히 존재한다.

첫째, 이 연구 결과는 in vitro 조건에서의 얻어진 실험 결과로, cell line을 사용하여 수행되었다. 따라서, 이러한 결과가 뇌 내에서의 오피오이드 수용체와 TRPC4 이온통로의 상호작용을 완벽하게 반영하는 것인지는 아직은 확실하지 않다. 생체 내에서의 복잡한 조건과 다른 조직 및 세포 유형간의 차이를 고려할 때, 이

연구의 일반화에는 제한이 있을 수 있다. 그래서 보다 더 현실적이고 복잡한 실험 조건에서의 연구를 통해 이러한 상호작용의 실제 생리학적 의미를 확인할 필요가 있다.

둘째, 이 연구에서는 선택적 작용제 (selective agonist) 와 AMI을 사용하여 오피오이드 수용체와 TRPC4 이온통로의 상호작용을 평가하였다. 그러나 이는 일부 특정 삼환계 항우울제에 대한 것이므로 다른 종류의 작용제나 약물에 대한 효과는 아직 고려되지 않았다. 이는 다양한 작용제와 약물에 대한 상호작용을 조사하여 보다 포괄적인 이해를 도출하는데 중요하다. 또한, 다른 종류의 항우울제나 다른 이온통로와의 상호작용에 대한 연구도 필요할 것으로 보인다.

셋째, 이 연구에서는 아스파르트산 잔기를 아르기닌으로 돌연변이 시켜 삼환계 항우울제의 활성을 차단하는 것을 확인했다. 그러나 이는 단일 돌연변이에 대한 결과이므로, 다른 잔기의 돌연변이나 다른 결합 부위의 변화에 대한 영향은 아직 고려되지 않았다. 이에 따라, 다양한 돌연변이와 결합 부위의 변화에 따른 영향을 조사하여 이러한 상호작용의 분자적 메커니즘을 더욱 명확하게 이해하는 것이 필요하다.

넷째, 이 연구에서는 TRPC4 이온통로의 전류 변화를 통해 오피오이드 수용체의 활성 변화를 평가하였다. 그러나 이는 단일 지표에 의존하는 방법이므로, 다른 생리학적 또는 분자학적 파라미터에 대한 평가는 고려되지 않았다. 이를 위해, TRPC4 이온통로 이외의 다른 시스템이나 신호전달 경로의 변화를 조사하고, 보다 포괄적인 오피오이드 수용체의 활성 변화를 평가하는 것이 필요하다.

이러한 의문점과 제한 사항들은 이 연구 결과의 한계를 보여주며, 추가적인 연구가 필요함을 시사한다. 이러한 한계를 극복하기 위해 보다 실제적인 조건에서의 실험과 다양한 조건 및 약물의 고려, 그리고 다양한 파라미터의 평가를 포함하는 더욱 포괄적인 연구를 통해 이 연구의 결과를 보완하고 확장할 수 있을 것이다.

삼환계 항우울제의 이상성 (biphasic) 반응, 즉 TRPC4 이온통로에 대한 활성화나 억제 효과가 약물 농도나 오피오이드 수용체의 조절에 따라 달라진다는 점은 중요한 관점으로 고려해야 한다. 이 이상성 효과는 삼환계 항우울제의 약물 작용 메커니즘이 복잡하게 작용되며, 신호전달 경로에서 혼란을 초래하거나 부작용의 원인이 될 수 있음을 시사한다. 또한, 약물 농도에 따른 삼환계 항우울제의 이상성 반응은 TRPC4 이온통로에 대한 양측성 조절 가능성을 보여준다. 이는 약물 작용

기전을 이해하는 데 도움이 될 수 있지만, 삼환계 항우울제에 의해 유발되는 신호전달 경로의 복잡성을 고려해야 함을 강조한다. 또한, 삼환계 항우울제의 효과는 오피오이드 수용체 조정 (modulation) 에 따라 이상성(biphasic)을 나타낼 수 있음이 중요하다. 예를 들어, 일부 연구에서는 오피오이드 수용체를 조절하는 삼환계 항우울제의 억제 작용이 TRPC4 이온통로의 활성을 증가시키는 경향을 보여주었다. 그러나, 이번 연구에서는 삼환계 항우울제의 이상성 반응이 오피오이드 수용체와 TRPC4 이온통로 사이의 상호작용에 따라 변할 수 있음을 시사한다. 이는 삼환계 항우울제가 오피오이드 수용체의 서브유닛과 TRPC4의 결합을 간접적으로 조절하는 것으로 해석될 수 있다.

이러한 이상성 반응은 약물의 효과와 부작용에 대한 이해를 복잡하게 만들 수 있으며, 신호전달 경로에서 혼란을 일으킬 수 있다. 더구나, 삼환계 항우울제의 양측성 효과가 일부 부작용의 원인이 될 수 있다. 이러한 정보는 삼환계 항우울제의 임상 사용과 개인화된 치료 전략 개발에 있어 중요한 고려사항이 될 수 있다. 추가 연구와 근거가 필요하지만, 이 삼환계 항우울제의 복잡한 작용 메커니즘과 부작용 발생 원인 기전에 대한 이해는 앞으로의 연구와 임상에서의 약물 종류와 용량 선택시 의사 결정에 도움을 줄 수 있을 것이다.

본 연구는 다음과 같은 기대 효과와 응용 방향성을 제시할 수 있다.

첫째, 이 연구는 삼환계 항우울제가  $G_i$ -단백질 신호전달 경로를 통해 TRPC4 이온통로를 활성화하는 것을 확인했다. 이로 인해 약물의 세포 내 작용 및 신호전달 기전에 대한 이해를 높이고, 삼환계 항우울제의 효능 및 효과를 더욱 명확히 설명할 수 있게 한다. 특히, TRPC4 이온통로가 삼환계 항우울제의 작용 메커니즘의 중요한 역할을 하는 것을 확인함으로써, 후속 연구에서는 TRPC4 이온통로를 표적으로 하는 새로운 약물 개발과 효과적인 항우울제 치료 전략 개발에 관심을 집중할 수 있게 되었다.

둘째, 오피오이드 수용체의 삼환계 항우울제에 대한 결합 부위와 편향된 작용성 (biased agonism) 에 대한 이해는 약물 설계 및 오피오이드 수용체 기반 치료 전략 개발에 큰 영향을 미칠 수 있다. 세포 내 신호전달 경로의 다양성에 따른 약물의 편향된 작용성은 약물의 효과와 부작용 조절에 활용될 수 있다. 이런 정보들은 삼환계 항우울제의 효능 최적화와 부작용 감소에 도움을 줄 수 있고, 앞으로의 약물 개발 연구에 대한 지침을 제시할 수 있다.



이번 연구의 결과는 삼환계 항우울제와 TRPC4 이온통로의 상호작용이 부작용 증상의 원인과 연관될 수 있음을 보여준다. 삼환계 항우울제의 이상성 효과와 TRPC4 이온통로의 조절은 삼환계 항우울제를 임상적으로 사용할 때 부작용 프로파일을 평가하는 데 중요한 참고 자료가 될 수 있다. 이러한 점을 고려하면, 앞으로의 연구는 개인화된 치료 전략을 개발하고 부작용을 관리하기 위해 계속 근거를 모으는데 중점을 두어야 할 것이다.

종합적으로, 본 연구는 삼환계 항우울제와 오피오이드 수용체의 상호작용, 그리고 TRPC4 이온통로의 활성 조절 메커니즘에 대한 이해를 깊게 하였다. 이를 바탕으로 새로운 치료 전략의 개발과 부작용 관리에 기여 하였고, 이러한 연구 결과를 토대로 더욱 효과적이고 안전한 약물 치료를 제공하기 위한 노력이 계속되어야 한다.

최종적으로 본 연구의 결과는 오피오이드 수용체와 TRPC4 이온통로 간의 복잡한 상호작용과 그 신호전달 기전에 대한 이해를 향상시키는데 기여할 수 있으며, 삼환계 항우울제와 오피오이드 수용체의 상호작용을 통해 신약 개발 및 우울증 치료 전략에 대한 정보를 제공할 수 있을 것이다. 추가적인 연구를 통해 이러한 상호작용의 분자적 기전을 더욱 상세하게 이해할 수 있을 것으로 기대된다.

## 참 고 문 헌

1. Gibula-Tarlowiska E, and Kotlinska JH. Crosstalk between Opioid and Anti-Opioid Systems: An Overview and Its Possible Therapeutic Significance. *Biomolecules* 10: 2020.
2. Froehlich JC. Opioid peptides. *Alcohol Health Res World* 21: 132-136, 1997.
3. Sobczak M, Salaga M, Storr MA, and Fichna J. Physiology, signaling, and pharmacology of opioid receptors and their ligands in the gastrointestinal tract: current concepts and future perspectives. *J Gastroenterol* 49: 24-45, 2014.
4. Takeba Y, Suzuki N, Kaneko A, Asai T, Sakane T. Endorphin and enkephalin ameliorate excessive synovial cell functions in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 28:2176 - 83, 2001.
5. Nummenmaa L, and Tuominen L. Opioid system and human emotions. *Br J Pharmacol* 175: 2737-2749, 2018.
6. Candace B. Pert and Solomon H. Snyder. Opiate receptor: Demonstration in nervous tissue. *Science* 179:1011-1014, 1973.
7. J. Hughes, T. W. Smith, H. W. Kosterlitz, Linda A. Fothergill, B. A. Morgan & H. R. Morris. Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature* 258:577-580, 1975.
8. Al-Hasani R, and Bruchas MR. Molecular mechanisms of opioid receptor-dependent signaling and behavior. *Anesthesiology* 115: 1363-1381, 2011.
9. Pasternak G and Pan YX. Mu opioid receptors in pain management. *Acta Anaesthesiologica Taiwanica* 49(1) 21-25, 2011.
10. Higginbotham JA, Markovic T, Massaly N, and Moron JA. Endogenous opioid systems alterations in pain and opioid use disorder. *Front Syst Neurosci* 16: 1014768, 2022.
11. Gupta A, Gullapalli S, Pan H, Ramos-Ortolaza DL, Hayward MD, Low MJ, Pintar JE, Devi LA, and Gomes I. Regulation of Opioid Receptors by Their Endogenous Opioid Peptides. *Cell Mol Neurobiol* 41: 1103-1118, 2021.
12. Quigley C. Opioids in people with cancer-related pain. *BMJ Clin Evid* 2408, 2008.

13. Genova A, Dix O, Thakur M and Sangha PS. Chronic non-cancer pain management and addiction: A review. *Cureus* 12(2), 2020.
14. Raymond P, Don S, Gary F, Gary G, Michael P, William S. D., Carmel A, Bruse A. P., Vera B, Alexander RG, John H, Nicole L, Mary D, Scott R. W., Leslie C. M., Kenneth F, Lawrence B, Lindsay C, Brian C. C. Oral and topical treatment of painful diabetic polyneuropathy, Practice guideline update summary. Report of the AAN guideline subcommittee. *Neurology* 98:31-43, 2022.
15. Eduardo E Benarroch. Endogenous opioid systems: current concepts and clinical correlations. *Neurology*. 79(8):807-14, 2012.
16. Lamberts JT and Traynor JR. Opioid receptor interacting proteins and the control of opioid signaling. *Curr Pharm Des* 19(42): 7333-7347, 2013.
17. Gopalakrishnan L, Chatterjee O, Ravishankar N, Suresh S, Raju R, Mahadevan A, and Prasad TSK. Opioid receptors signaling network. *J Cell Commun Signal* 16: 475-483, 2022.
18. Valentino RJ, and Volkow ND. Untangling the complexity of opioid receptor function. *Neuropsychopharmacology* 43: 2514-2520, 2018.
19. El Daibani A, Paggi JM, Kim K, Laloudakis YD, Popov P, Bernhard SM, Krumm BE, Olsen RHJ, Diberto J, Carroll FI, Katritch V, Wunsch B, Dror RO, and Che T. Molecular mechanism of biased signaling at the kappa opioid receptor. *Nat Commun* 14: 1338, 2023.
20. Wootten D, Christopoulos A, Marti-Solano M, Babu MM, and Sexton PM. Mechanisms of signalling and biased agonism in G protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19: 638-653, 2018.
21. Faouzi A, Varga BR and Majumdar S. Biased opioid ligands. *Molecules* 25(18): 4257, 2020
22. Greasley, P. J., and Jansen, F. P. G-protein-coupled receptor screening technologies. *Drug Discovery Today: Technologies*, 2(2), 163 - 170, 2005.
23. Bobeck EN, Chen Q, Morgan MM, and Ingram SL. Contribution of adenylyl cyclase modulation of pre- and postsynaptic GABA neurotransmission to morphine antinociception and tolerance. *Neuropsychopharmacology* 39: 2142-2152, 2014.
24. Slamberova R. Opioid receptors of the CNS: function, structure and distribution. *Cesk Fysiol* 53: 159-166, 2004.

25. Kim H, Kim J, Jeon JP, Myeong J, Wie J, Hong C, Kim HJ, Jeon JH, and So I. The roles of G proteins in the activation of TRPC4 and TRPC5 transient receptor potential channels. *Channels (Austin)* 6: 333-343, 2012.
26. Obukhov AG, and Nowycky MC. TRPC4 can be activated by G-protein-coupled receptors and provides sufficient Ca(2+) to trigger exocytosis in neuroendocrine cells. *J Biol Chem* 277: 16172-16178, 2002.
27. Mesbahi Y, Zekri A, Ahmadian S, Alimoghaddam K, Ghavamzadeh A, and Ghaffari SH. Targeting of EGFR increase anti-cancer effects of arsenic trioxide: Promising treatment for glioblastoma multiform. *Eur J Pharmacol* 820: 274-285, 2018.
28. Fornasari D. Pharmacotherapy for Neuropathic Pain: A Review. *Pain Ther* 6: 25-33, 2017.
29. Holbech JV, Jung A, Jonsson T, Wanning M, Bredahl C, and Bach FW. Combination treatment of neuropathic pain: Danish expert recommendations based on a Delphi process. *J Pain Res* 10: 1467-1475, 2017.
30. Michael E T. Antidepressant combinations: Widely used, but far from empirically validated. *Can J Psychiatry*. 56(6):317-323. 2011.
31. Hideaki O. Analgesic mechanisms of antidepressants for neuropathic pain. *Int J Mol Sci* 18(11): 2483, 2017.
32. Remick RA. Anticholinergic side effects of tricyclic antidepressants and their management. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 12(2-3), 225-231, 1988.
33. Gillman PK. Tricyclic antidepressant pharmacology and therapeutic drug interactions updated. *Br J Pharmacol* 151: 737-748, 2007.
34. Onali P, Dedoni S, Olanas M. Direct agonist activity of tricyclic antidepressants at distinct opioid receptor subtypes. *J Pharmacol Exp Ther* 332(1):255-65, 2010.
35. Asghar MY, and Tornquist K. Transient Receptor Potential Canonical (TRPC) Channels as Modulators of Migration and Invasion. *Int J Mol Sci* 21: 2020.
36. Gonzalez-Cobos JC, and Trebak M. TRPC channels in smooth muscle cells. *Front Biosci (Landmark Ed)* 15: 1023-1039, 2010.
37. Nedungadi TP, and Cunningham JT. Differential regulation of TRPC4 in the vasopressin magnocellular system by water deprivation and hepatic cirrhosis in the rat. *Am J Physiol*

Regul Integr Comp Physiol 306: R304-314, 2014.

38. Hardie R.C. and Minke B. : Novel Ca<sup>2+</sup> channels underlying transduction in *Drosophila* photoreceptors: implications for phosphoinositide-mediated Ca<sup>2+</sup> mobilization. Trends Neurosci 16, 371-6, 1993.

39. Amrita S, Taylor EH, Vera YM. Transient receptor potential (TRP) channels. Subcell Biochem 87: 141 - 165, 2018.

40. Hong C, Jeong B, Park HJ, Chung JY, Lee JE, Kim J, Shin YC and So I. TRP channels as emerging therapeutic targets for neurodegenerative diseases. Front Physiol 15;11:238, 2020.

41. Kuhn F, Heimer I, Luckhoff A. TRPM2: a calcium influx pathway regulated by oxidative stress and the novel second messenger ADP-ribose. Pflugers Arch 451(1):212-9, 2005.

42. Bautista D, Siemens J, Glazer J, Tsuruda P, Basbaum A, Stucky C, Jordt SE and Julius D. The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. Nature 448, 204-208, 2007.

43. Wescott S, Rauthan M and Xu S. When a TRP goes bad: Transient receptor potential channels in addiction. Life Sci 92(8-9): 410-414, 2013.

44. Abdelfattah F, Balazs R, and Susruta M. Biased opioid ligands. Molecules 25, 4257, 2020.

45. Jeon J, Tian JB, and Zhu MX. TRPC4 as a coincident detector of G(i/o) and G(q/11) signaling: mechanisms and pathophysiological implications. Curr Opin Physiol 17: 34-41, 2020.

46. Kim J, Ko J, Hong C, and So I. Structure-Function Relationship and Physiological Roles of Transient Receptor Potential Canonical (TRPC) 4 and 5 Channels. Cells 9: 2019.

47. Thakur DP, Tian JB, Jeon J, Xiong J, Huang Y, Flockerzi V, and Zhu MX. Critical roles of Gi/o proteins and phospholipase C-delta1 in the activation of receptor-operated TRPC4 channels. Proc Natl Acad Sci U S A 113: 1092-1097, 2016.

48. Griffin CS, Bradley E, Dudem S, Hollywood MA, McHale N, Thornbury K and Sergeant G. Muscarinic receptor induced contractions of the detrusor are mediated by activation of TRPC4 channels. J Urol 196(6):1796-1808, 2016.

49. Jeong B, Sung TS, Jeon D, Park KJ, Jun JY, So I, and Hong C. Inhibition of TRPC4 channel activity in colonic myocytes by tricyclic antidepressants disrupts colonic motility causing constipation. *J Cell Mol Med* 26: 4911-4923, 2022.
50. Westlund K, Zhang LP, Ma F, Nesemeier R, Ruiz JC, Ostertag EM, Crawford JS, Babinski K and Marcinkiewicz MM. A rat knockout model implicates TRPC4 in visceral pain sensation. *Neuroscience* 14;165-175, 2014.