

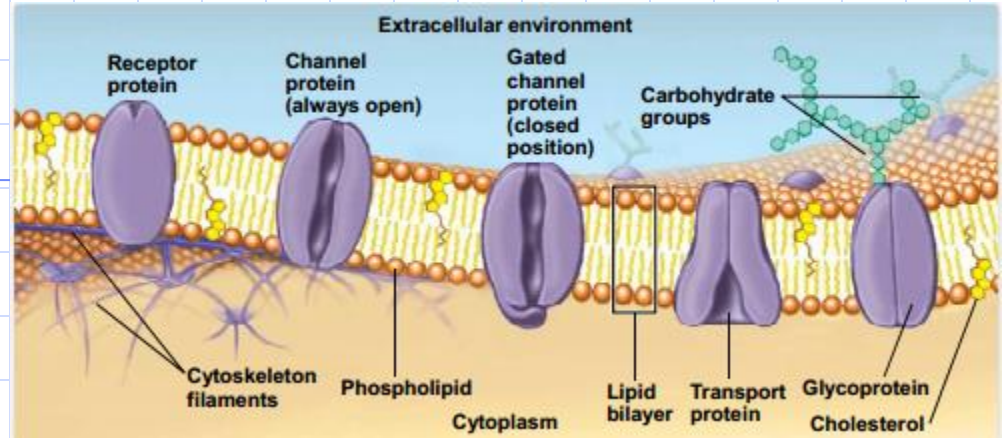


Receptory spřažené s G-proteiny  
&  
Transportéry neuropřenašečů  
&  
Neuropřenašeče

Michaela Králíková

## ① Receptory spřažené s G-proteiny - GPCRs

- ↳ rozdělení
- ↳ trafficking
- ↳ struktura
- ↳ oligomerizace



## ② Transportéry neuropřenašečů

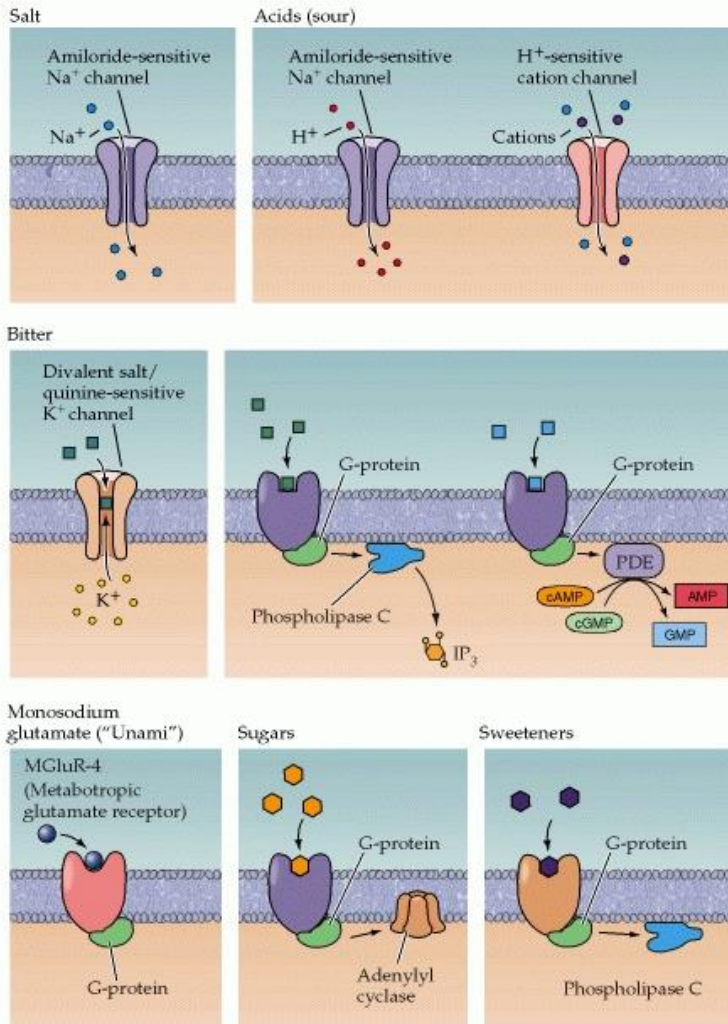
- ↳ rozdělení
- ↳ struktura

## ③ Neuropřenašeče

- ↳ Glutamát - mGluRs
- ↳ GABA, glycin – GABA<sub>B</sub>R, GlyTs
- ↳ Biogenní aminy - DA Rs, 5-HT R, ...

# Receptory spřažené s G-proteiny - GPCRs

↳ chuťové a čichové vjemy



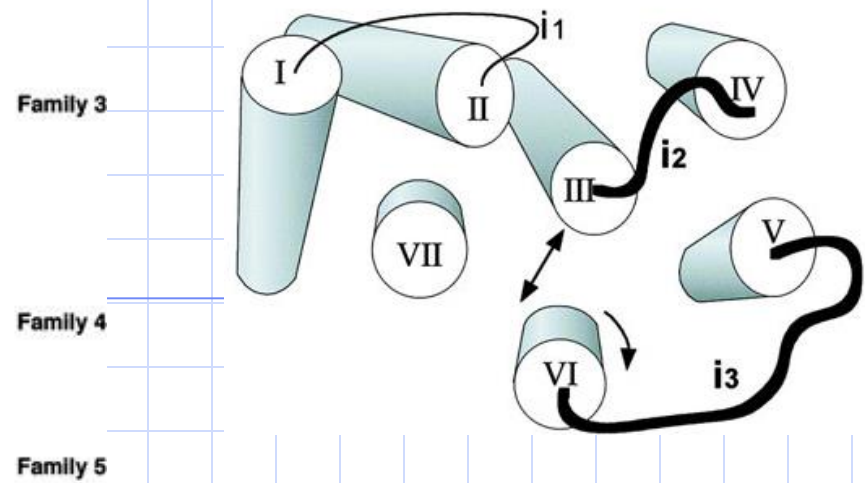
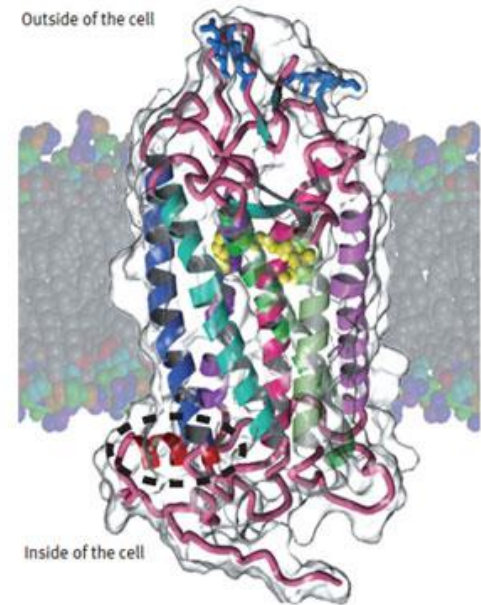
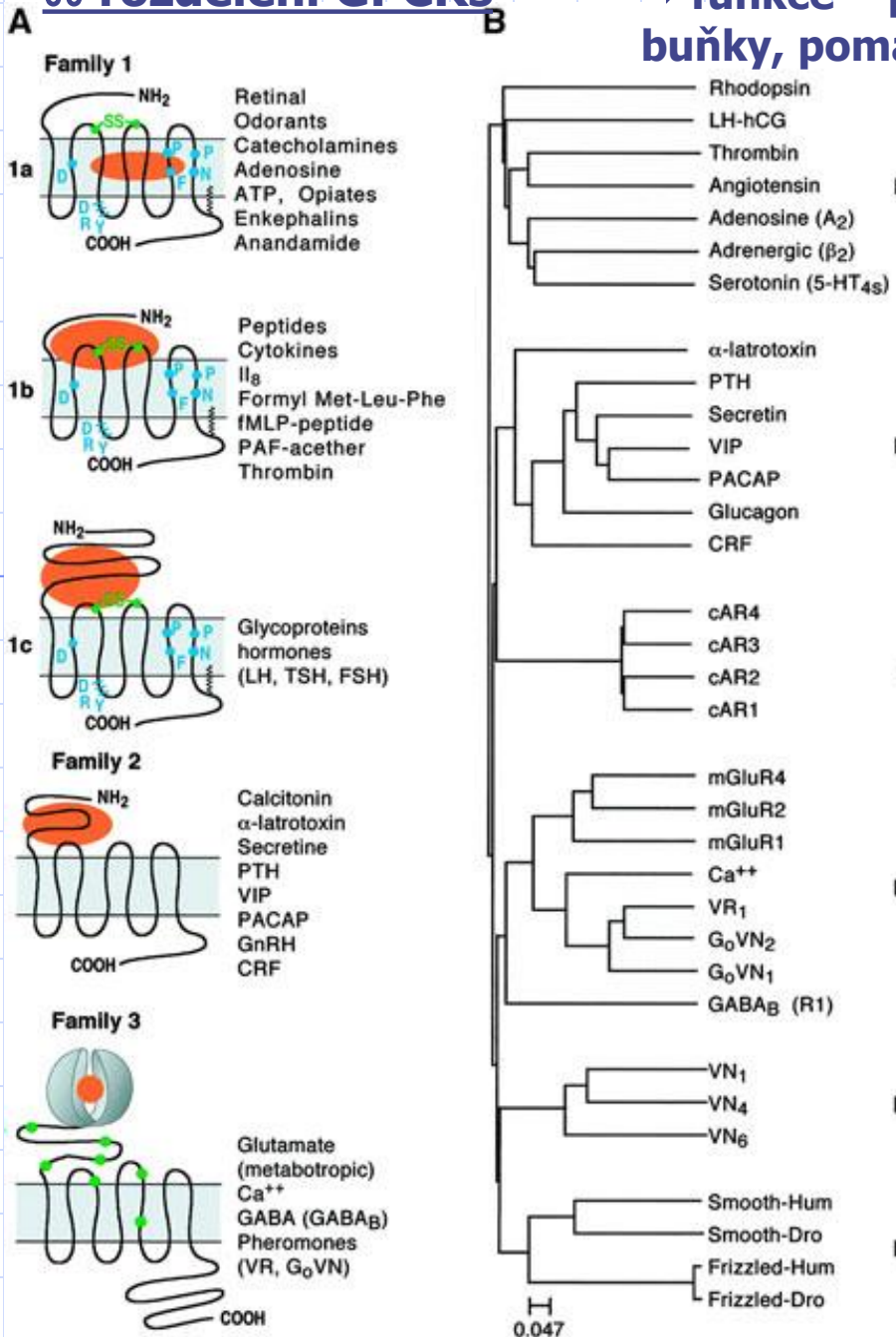
↳ T2R

↳ T1R1+T1R3

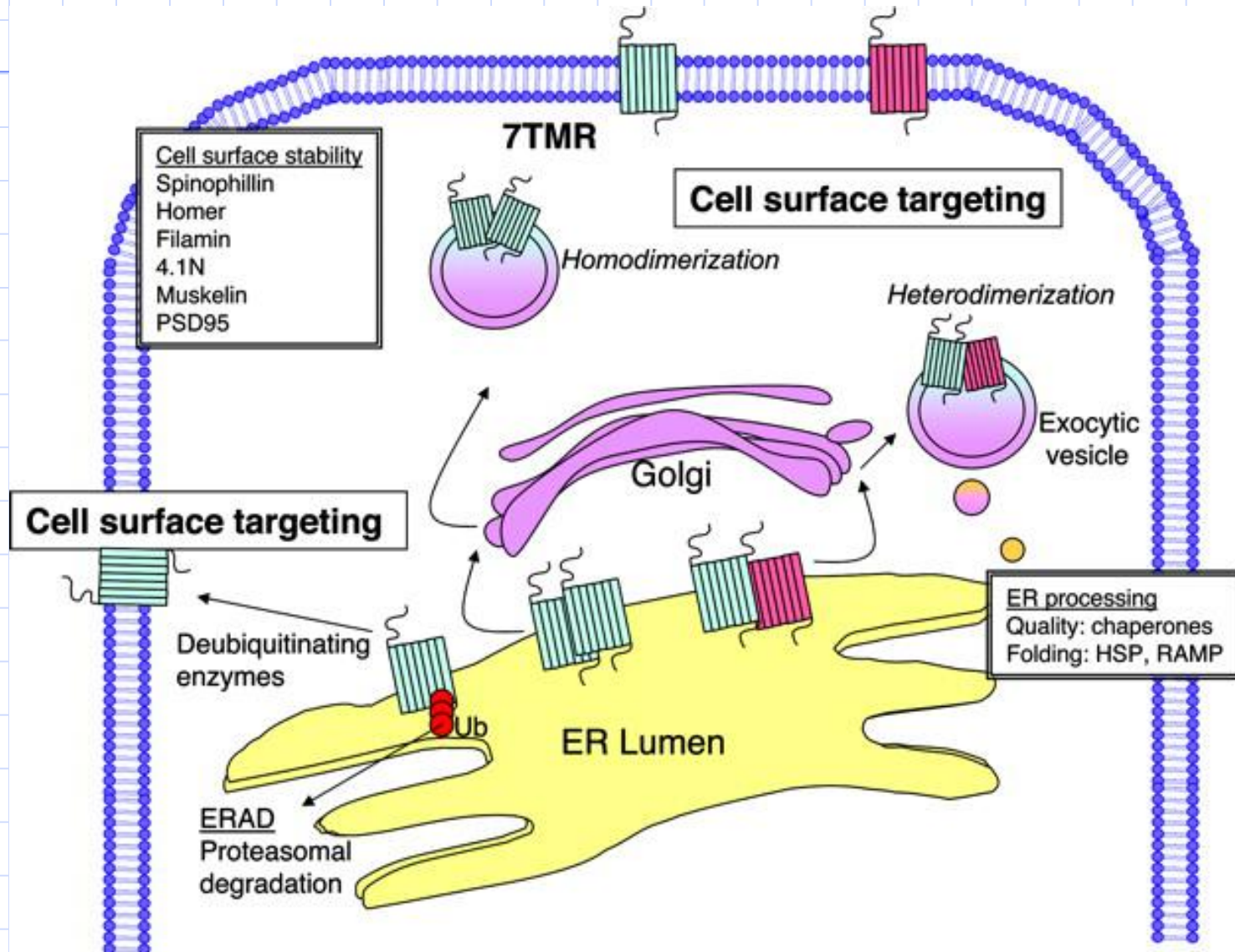
↳ T1R2+T1R3

# ⌘ rozdělení GPCRs

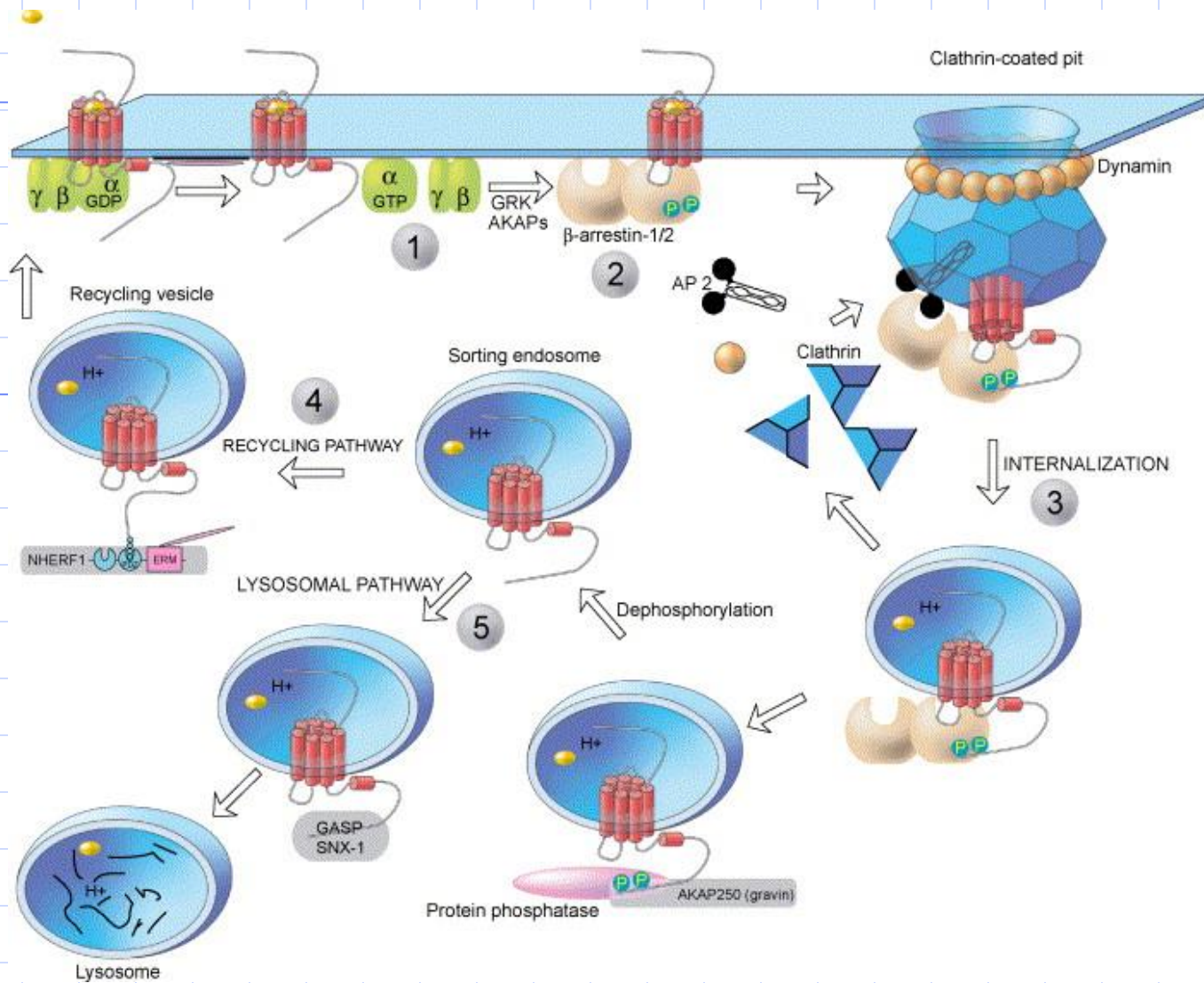
↳ funkce – přenos extracelulárního signálu dovnitř buňky, pomalá signalizace



# ⌘ GPCR trafficking



# ⌘ GPCR trafficking



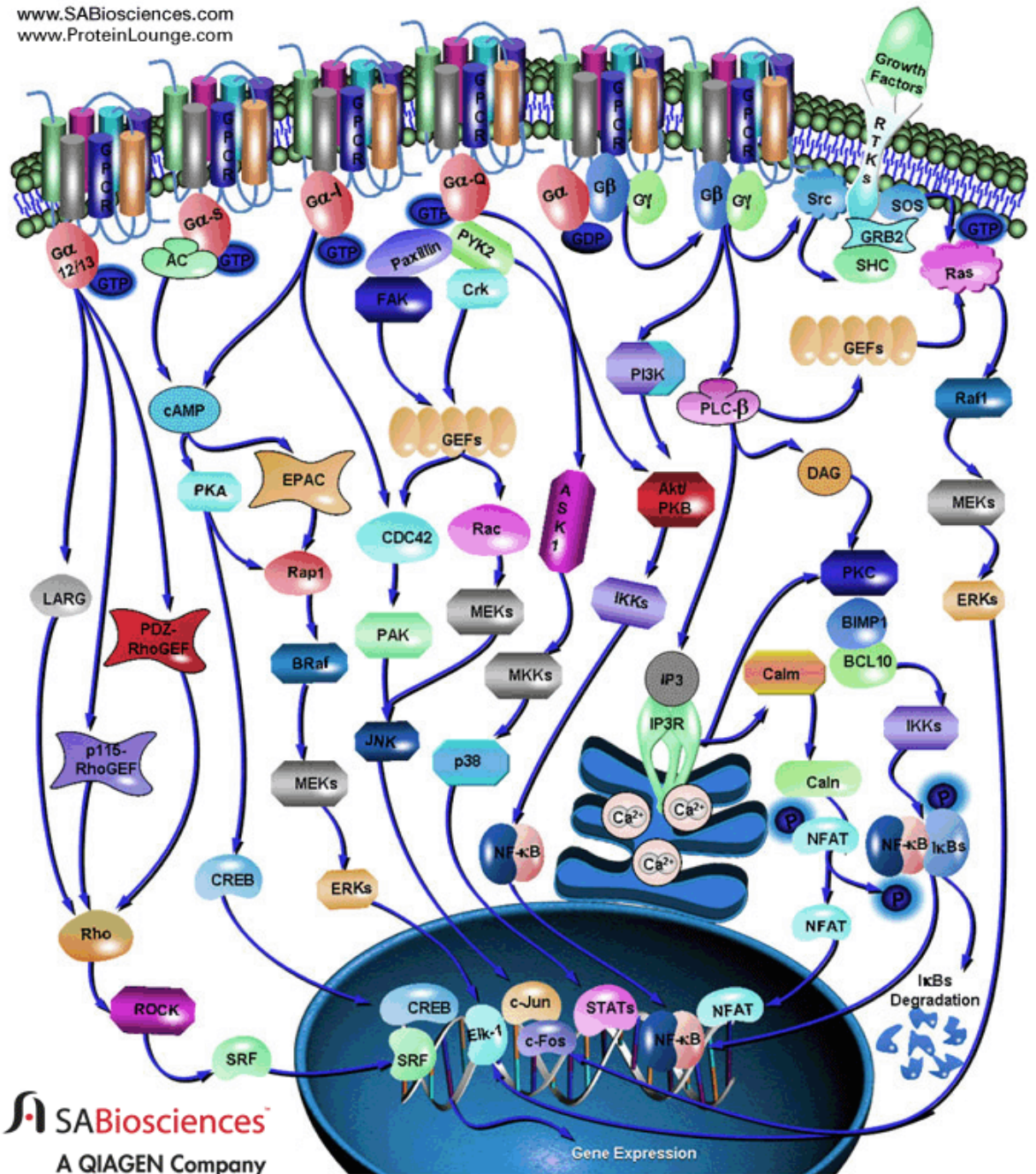
# ⌘ Signální cesty GPCR

→ Gs/olf

→ Gi

→ Gq

→ G<sub>12/13</sub>



## ⌘ Signální cesty GPCR

### ↳ G-proteiny - heterotrimery

#### ↳ Gs/olf

#### ↳ Gi

#### ↳ Gq

#### ↳ G<sub>12/13</sub>

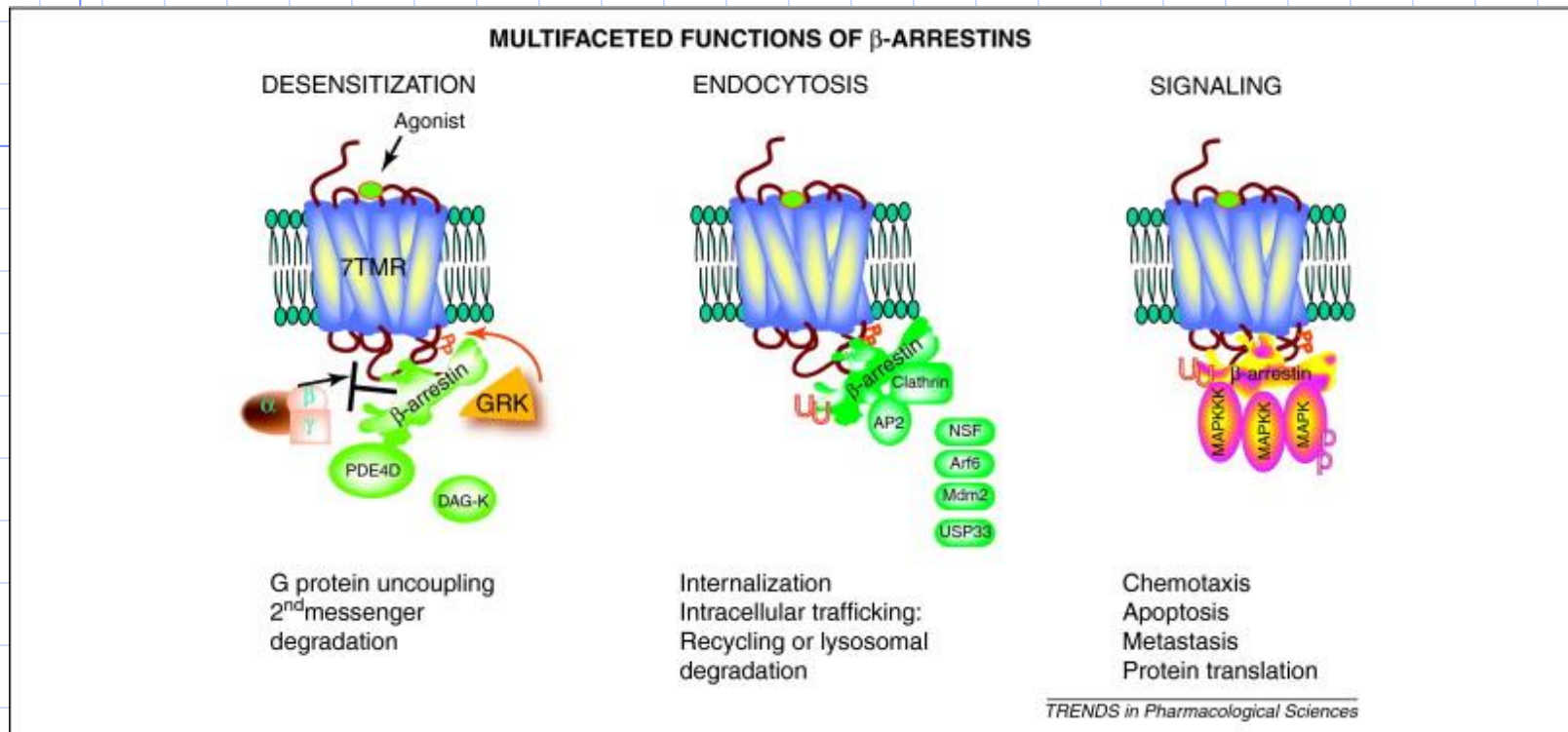
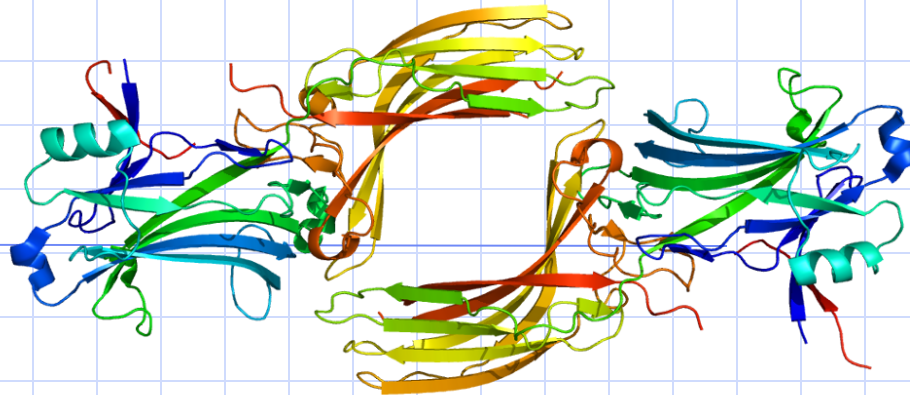
G-protein subunits	Effectors
$G\alpha_s$ $G\alpha_{olf}$	↑Adenylyl cyclase RGS-PX1 (GAP, sorting nexin) Calcium channels c-Src tyrosine kinases
$G\alpha_T$ (transducin) $G\alpha_{gust}$ (gustducin)	↑cGMP phosphodiesterase Phosphodiesterase (bitter, sweet taste)
$G\alpha_{1,2,3}$ $G\alpha_o$ $G\alpha_z$	↓Adenylyl cyclase, ↑c-Src tyrosine kinases Rap1GAP1
$G\alpha_q$ , $G\alpha_{11}$ , $G\alpha_{14,15,16}$	↑Phospholipase C LARG RhoGEF
$G\alpha_{12}$ , $G\alpha_{13}$	p115 RhoGEF, PDZ-RhoGEF, LARG RhoGEF (Rho activation, stress-fibre formation) E-Cadherin (β-catenin release)
$G\beta\gamma$	KIR3.1–3.4 (GIRK K <sup>+</sup> channels) GRKs ↑Adenylyl cyclases (ACII, ACIV) ↑Phospholipases (PLC β1, β2, β3) PI3Kγ

#### ↳ β-arrestin



# ⌘ Signální cesty GPCR

↳  $\beta$ -arrestin



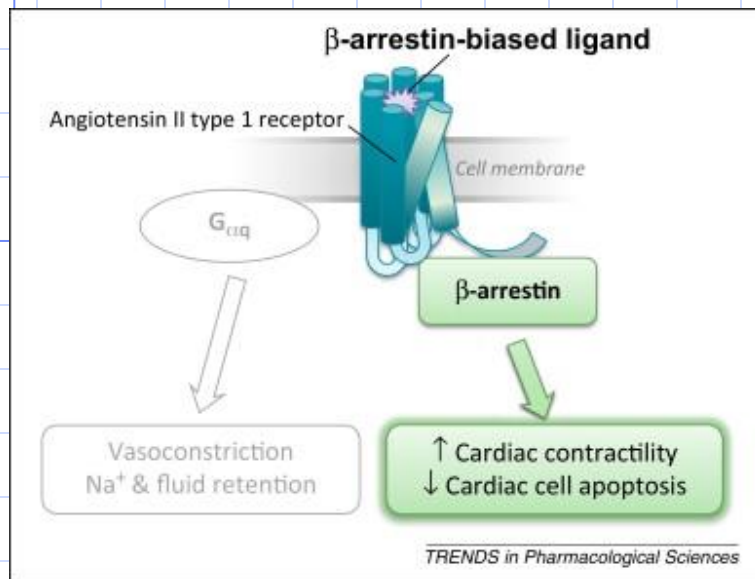
Lefkowitz RJ., TiPS (2011)

↳ biased signaling – orientovaná signalizace

## ⌘ Signální cesty GPCR

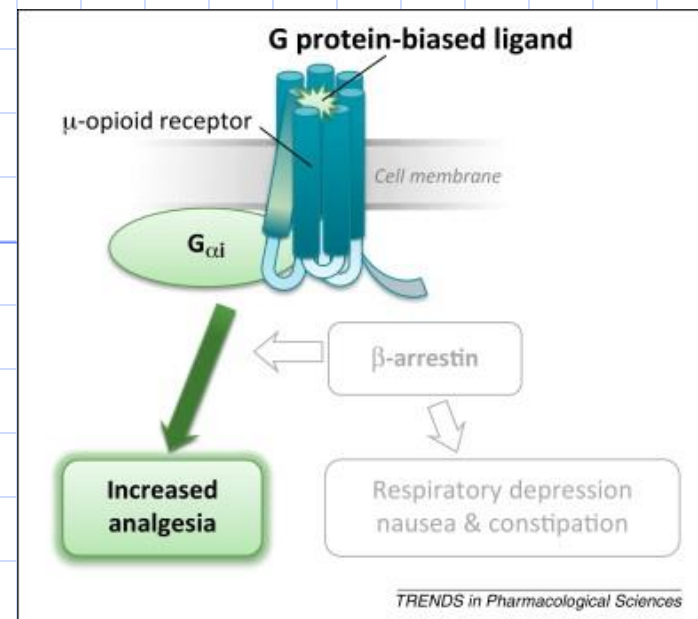
↳ ligandy, které zvýhodňují jednu signální cestu – **biased agonists**

- **AT1R ligand – TRV027**



- **léky na kardiovaskulární onemocnění**

- **MOR ligand – TRV130**

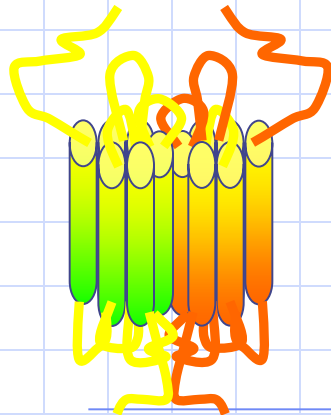


- **analgetika bez vedlejších účinků – snížení respirační a gastrointestinální dysfunkce**

## ⌘ oligomerizace

⇒ **Počet podjednotek**

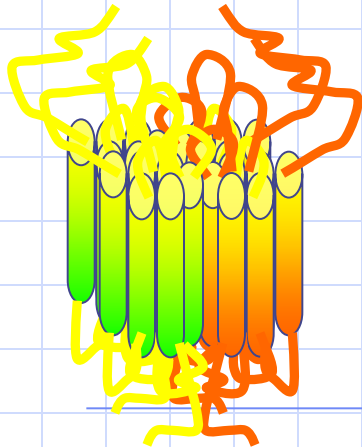
- ↳ **monomery (RhoR-funkční)**
- ↳ **dimery, tri-, tetramery- (GABAbR-dimery dimerů)**
- ↳ **oligomery (RhoR-řady oligomerů)**



## ⌘ oligomerizace

⇒ **Počet podjednotek**

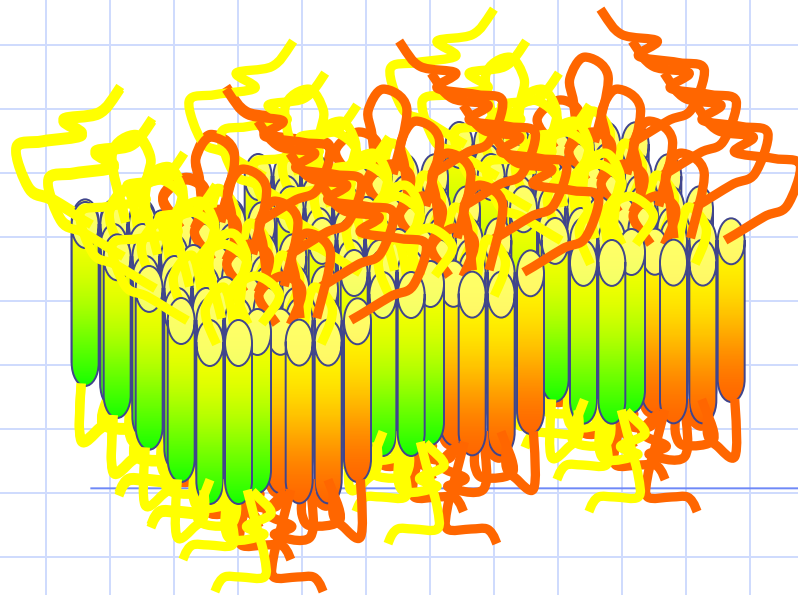
- ↳ **monomery (RhoR-funkční)**
- ↳ **dimery, tri-, tetramery- (GABA<sub>B</sub>R-dimery dimerů)**
- ↳ **oligomery (RhoR-řady oligomerů)**



## ⌘ oligomerizace

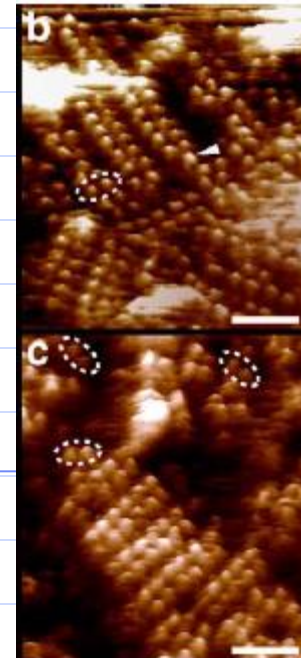
⇒ Počet podjednotek

- ↳ monomery (RhoR-funkční)
- ↳ dimery, tri-, tetramery- (GABA<sub>B</sub>R-dimery dimerů)
- ↳ oligomery (RhoR-řady oligomerů)



AFM – membrány  
tyčinek – myší sítnice

RhoR

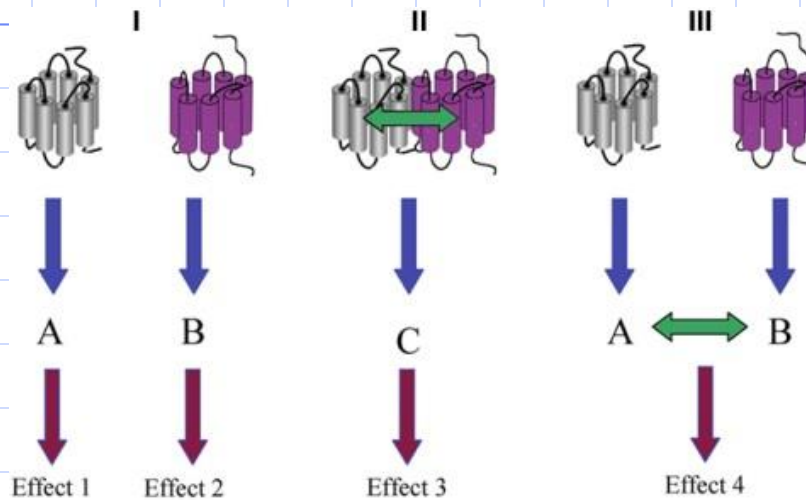


## ⌘ oligomerizace

⇒ **Podjednotkové složení**

↳ **Homomery (konstit. homomery- mGluRs)**

↳ **Heteromery (GABA<sub>B</sub>R, D1/D2R, opioidní R)**

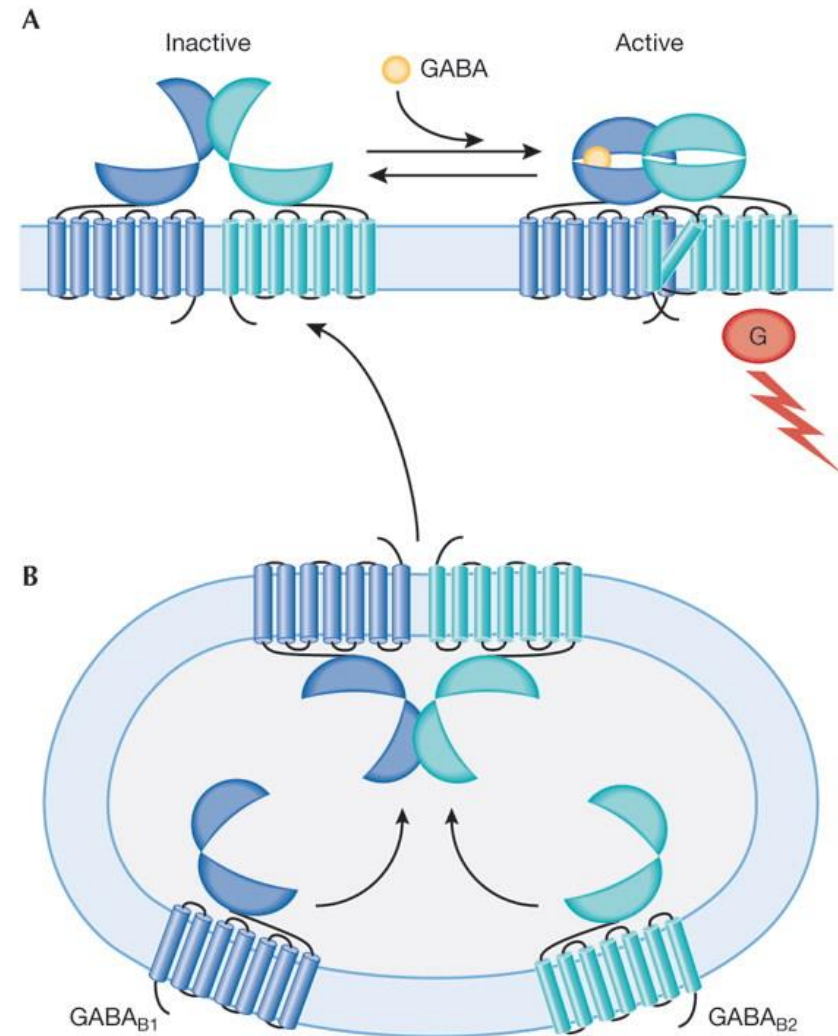


## ⌘ oligomerizace

⇒ **Funkce**

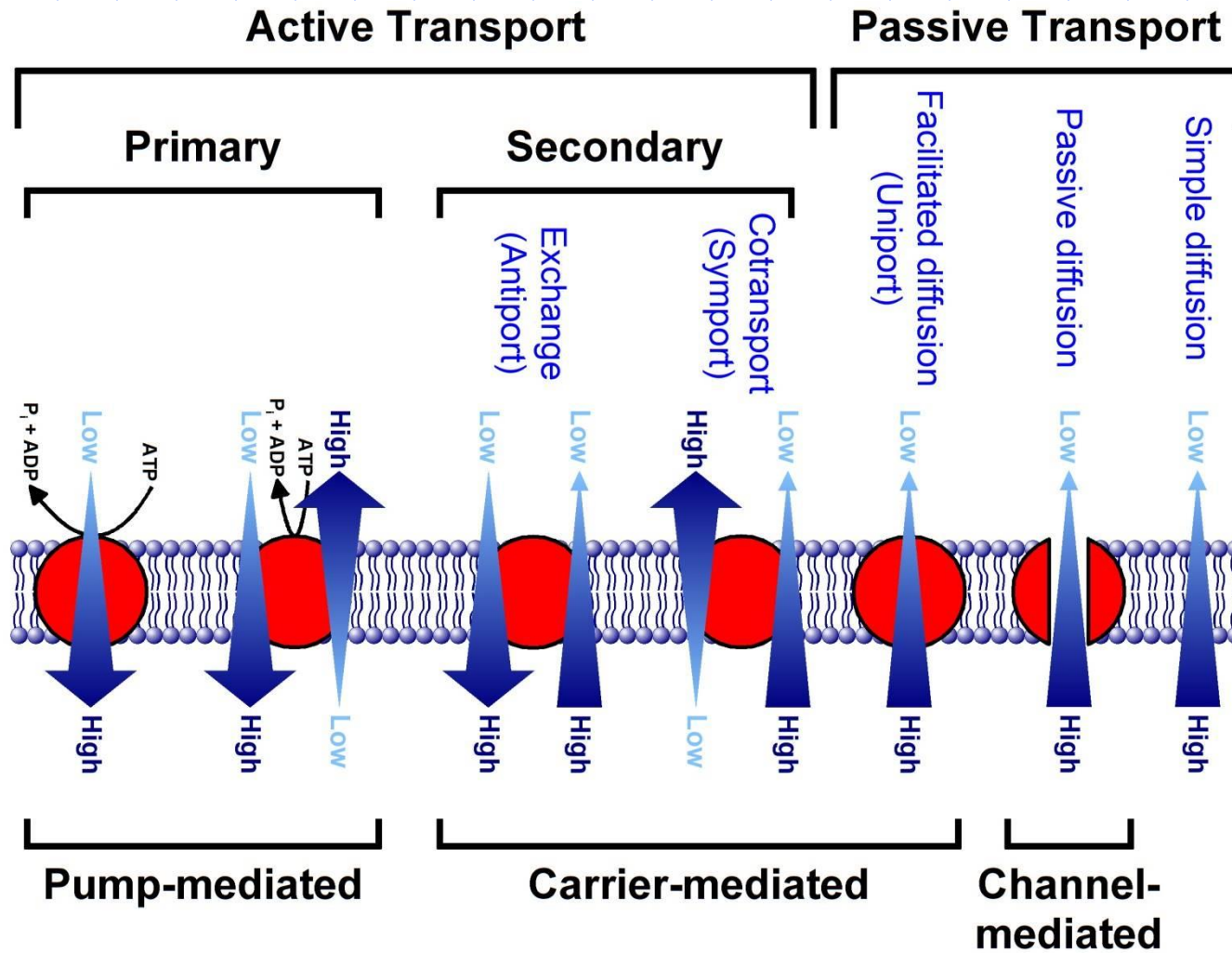
↳ **nové farmakologické vlastnosti**

↳ **trafficking, desensitizace, internalizace, efekty**



(Moeps, Fagni (2003) *EMBO Reports*)

# ⌘ Transportéry pro neuropřenašeče – sekundární aktivní transport (elektrochemický gradient)





# ⌘ Transportéry pro neuropřenašeče

## ⇒ v buněčné membráně

↳ **SLC1, SLC6**

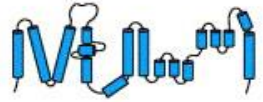
↳ **extracelulární koncentrace neuropřenašečů**

## ⇒ vezikulární

↳ **SLC17, SLC18, SLC32**

↳ **koncentrace neuropřenašečů v cytoplasmě, ve váčcích**

(a)

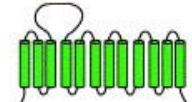


**SLC1 gene family transporters**

**Transporters:** glutamate transporters [EAAT1 (GLAST), EAAT2 (GLT-1), EAAT3 (EAAC1), EAAT4, and EAAT5]

**Ion dependence:** Na<sup>+</sup>, H<sup>+</sup> (co-transport), K<sup>+</sup> (countertransport)

**Structure:** six TMs plus C-terminus with two hairpin loops, trimers




**SLC17 gene family transporters**

**Transporters:** vGlut1-3

**Ion dependence:** H<sup>+</sup> (antiporters)

**Structure:** 6-12 TMs predicted, oligomerization state unknown

(b)

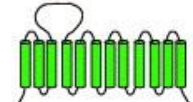


**SLC6 gene family transporters**

**Transporters:** DAT, SERT, NET, GAT1-4, GlyT1 and GlyT2

**Ion dependence:** Na<sup>+</sup>, (Cl<sup>-</sup>) (co-transport), SERT: K<sup>+</sup> (countertransport)

**Structure:** 12 TMs, dimers

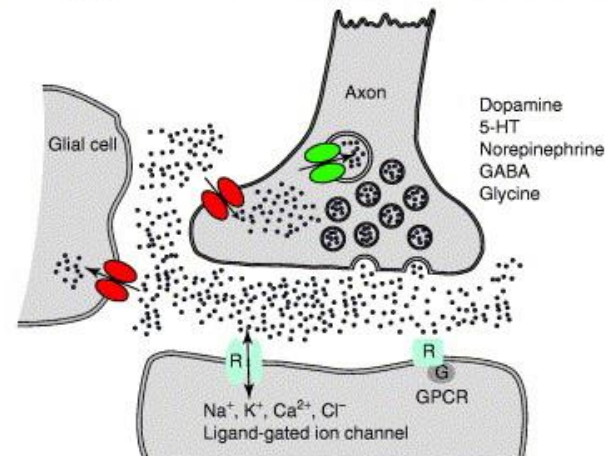
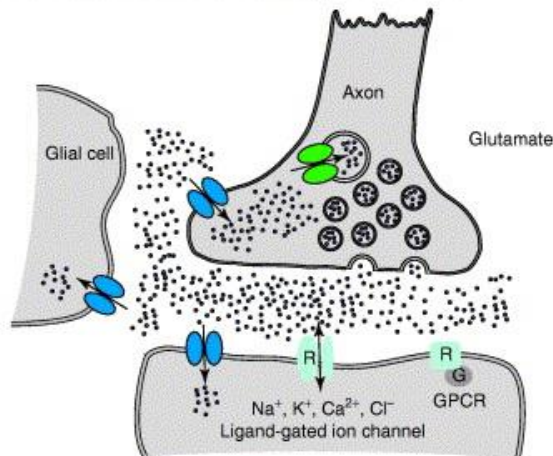


**SLC18 and SLC32 gene family transporters**

**Transporters:** VMAT1 and VMAT2, VACHT, VIAAT

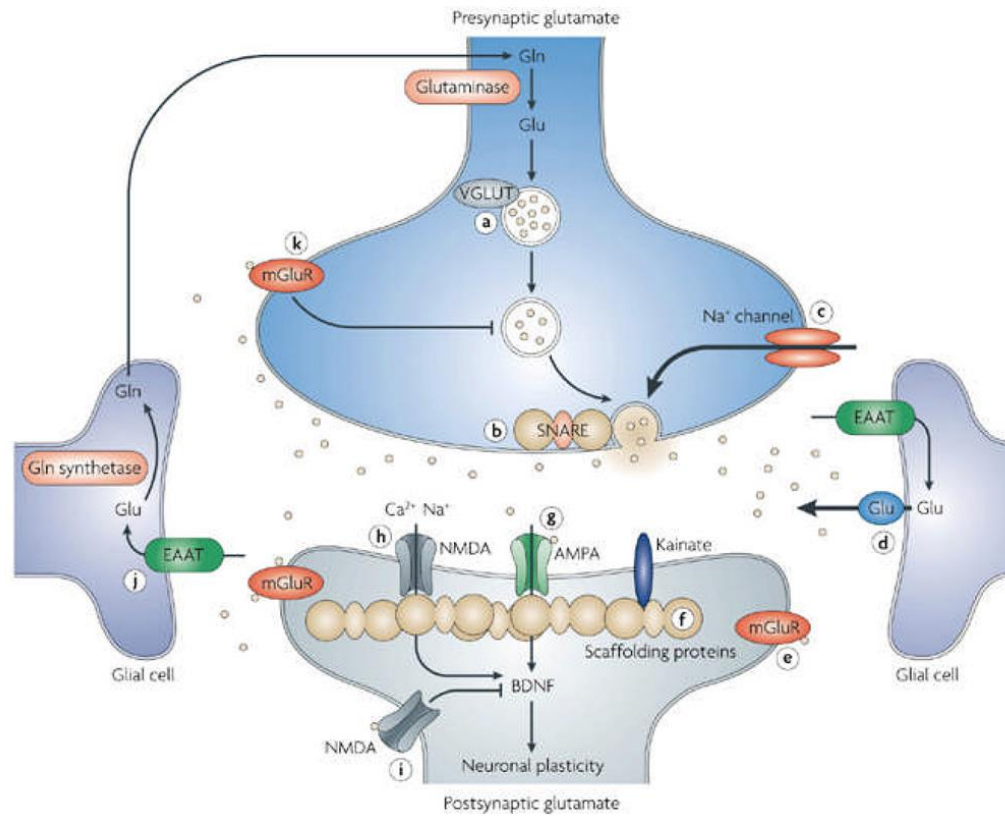
**Ion dependence:** H<sup>+</sup> (antiporters)

**Structure:** 6-12 TMs predicted, oligomerization state unknown



## ⌘ Neuropřenašeče

⇒ Glutamát – hlavní excitační neurotransmitter



⇒ receptory

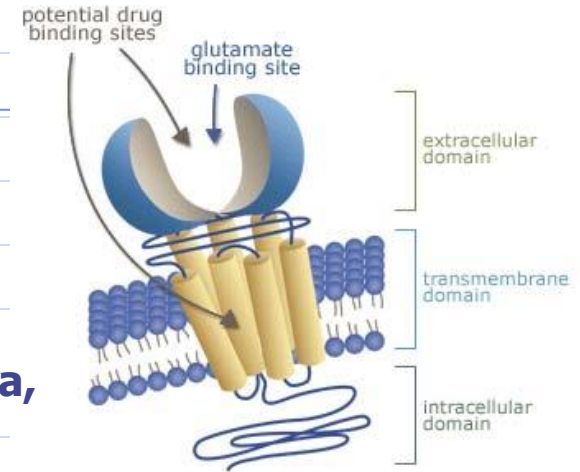
↳ **iGluR – AMPA R, NMDA R, kainátové R**

↳ **mGluRs:**

**I. mGluR 1, 5 – Gq, ↑ NMDA R, ↑ neurotoxicita**

**II. mGluR 2,3 – Gi, ↓ aktivitu NMDA R, ↓ neurotoxicita, presynaptická inhibice**

**III. mGluR 4,6,7,8 – Gi, ↓ aktivitu NMDA R, ↓ neurotoxicita, presynaptická inhibice**



**onemocnění – změny v signalizaci mGluR I.- FXS (Fragile X syndrom) – nejčastější příčina ment. retardace u chlapců; hyperaktivita, postiž. pracovní a krátkodobá paměť, autismus; FMRP (Fragile X mental retardation Protein)-FMRP reguluje translaci mRNA**

**- antagonisté mGluR5 – náprava poškození páteře, kognitivní a sociální projevy FXS**

**- agonisté mGluR2,3 – účinné při léčbě schizofrenie**

⇒ receptory

↳ iGluR – AMPA R, NMDA R, kainátové R

↳ mGluRs:

I. mGluR 1, 5 – Gq, ↑ NMDA R, ↑ neurotoxicita

II. mGluR 2,3 – Gi, ↓ aktivitu NMDA R, ↓ neurotoxicita,  
presynaptická inhibice

III. mGluR 4,6,7,8 – Gi, ↓ aktivitu NMDA R, ↓ neurotoxicita,  
presynaptická inhibice



onemocnění – změny v signalizaci mGluR I.- FXS (Fragile X syndrom) – nejčastější příčina ment. retardace u chlapců; hyperaktivita, postíž. pracovní a krátkodobá paměť, autismus; FMRP (Fragile X mental retardation Protein)-FMRP reguluje translaci mRNA

- antagonisté mGluR5 – náprava poškození páteře, kognitivní a sociální projevy FXS

- agonisté mGluR2,3 – účinné při léčbě schizofrenie

## ⇒ transportéry

### ↳ *buněč. membrána* - SLC1 – EAAT1-5

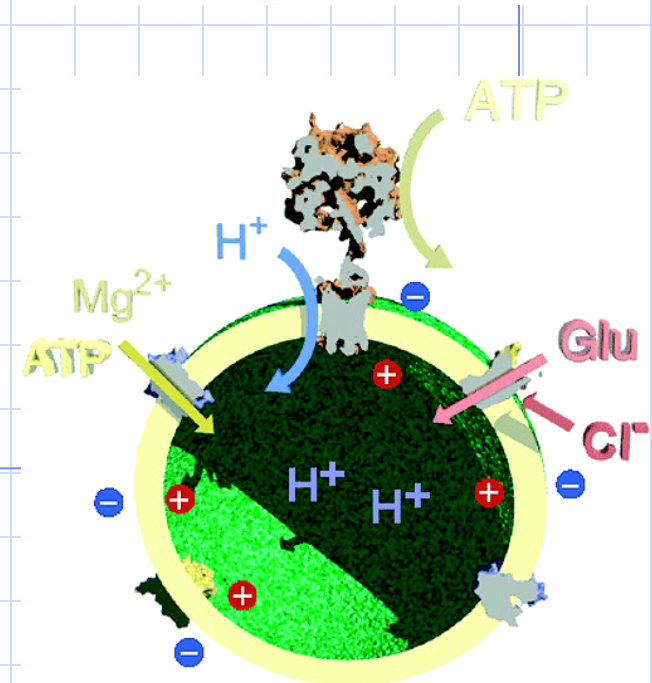
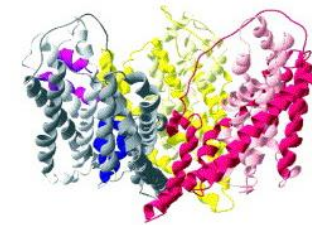
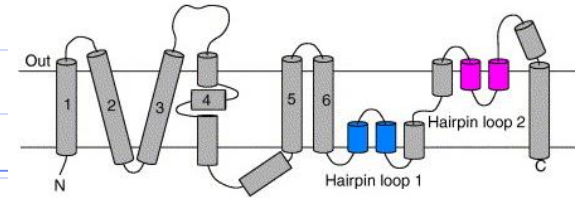
- Na<sup>+</sup>, H<sup>+</sup> symport, K<sup>+</sup> antiport
- 6TM, C-konec se 2 vlásenkami

onemocnění – ALS (amyotrofická laterální skleróza - neurodegenerativní onemocnění mozku, způsobující degeneraci a ztrátu mozkových a spinálních motoneuronů (Lou Gehrig, Stephen Hawking) – mutace v EAAT2), epilepsie, Alzheimer, schizofrenie

- EAAT2 - zvýšená aktivita, exprese – neuroprotektivní efekt

### ↳ *vezikulární* – SLC17 - vGluT1-3

- H<sup>+</sup> antiport, závislost na Cl<sup>-</sup>, 6-12TM
- inhibitory vGluT – méně uvolněného Glu - kontrola epilepsie



## ⇒ GABA a glycin

- ↳ hlavní inhibiční mediátory CNS
- ↳ Gly – ko-agonista NMDA R

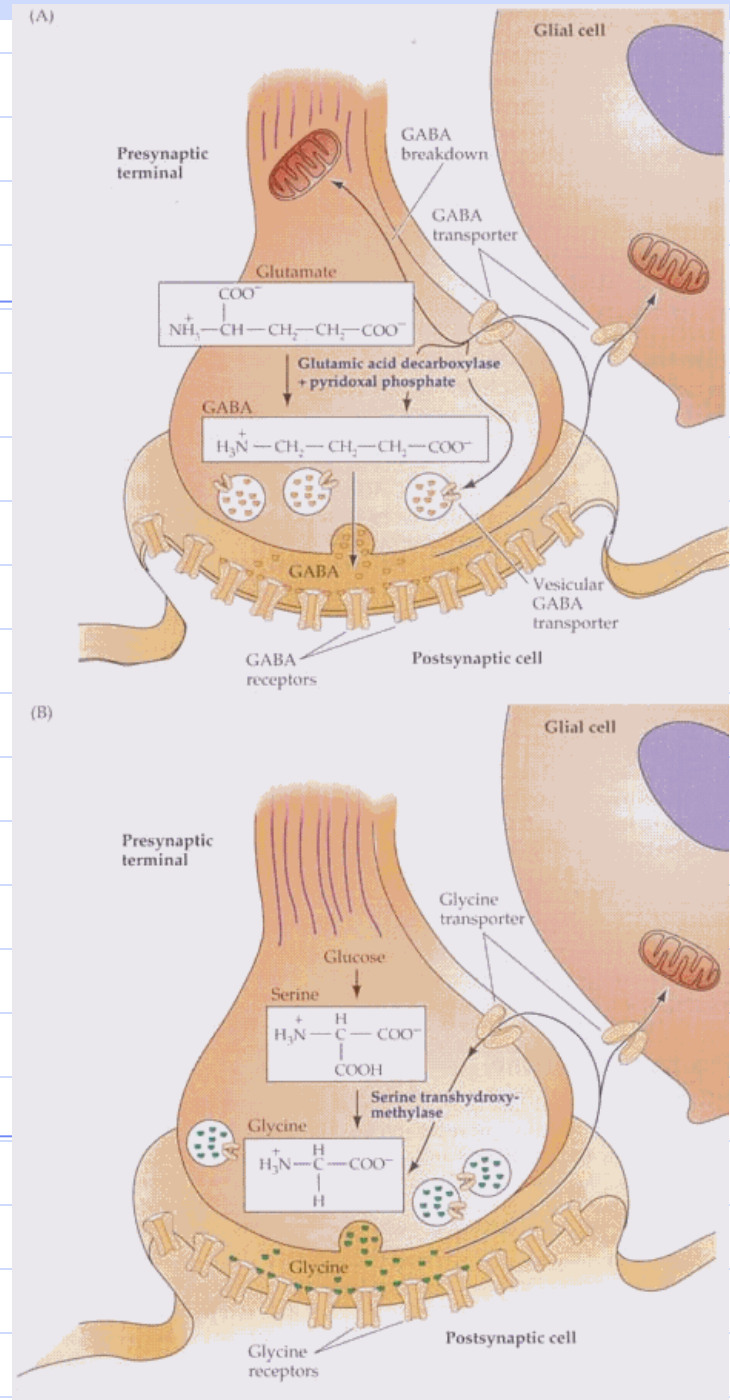
↳ paměť, učení, bolest, epilepsie, schizofrenie, hyperekplexie (přehnaný startl reflex, svalové napětí, ztuhlost)

## ⇒ receptory

- ↳ iontové kanály - GABA<sub>A</sub>Rs, GlyRs – rychlý synaptický přenos
- ↳ metabotropní – GABA<sub>B</sub>Rs – pomalá regulace synaptického přenosu

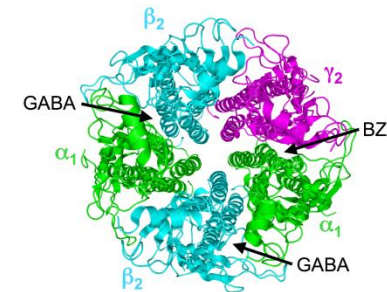
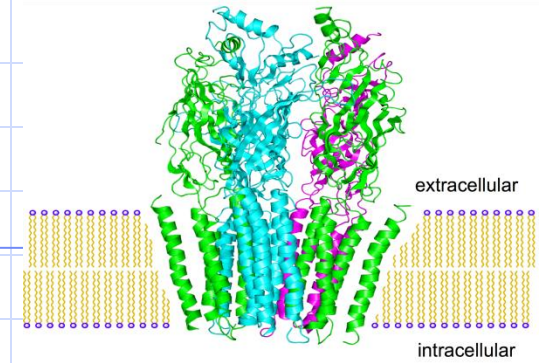
## ⇒ transportéry

- ↳ buněčná membrána – GAT1-4, GlyT1-2
- ↳ vezikulární – VIAAT

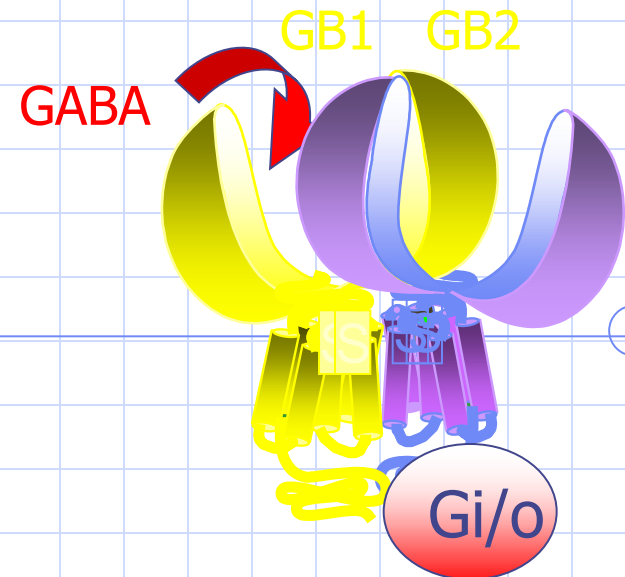


⇒ receptory

- ↳ GABA<sub>A</sub>Rs, GlyRs – iontové kanály, Cl<sup>-</sup>
  - hyperpolarizace (prenatální depolarizace), snížení vstupního odporu membrány (shunting)
  - agonisté GABA<sub>A</sub>R, GlyR – barbituráty
  - GABA<sub>A</sub>R - benzodiazepiny, alkohol – sedativa, anestetika, anxiolytika
  - antagonisté GABA<sub>A</sub>R – bikukulin (pro-epileptický), gabazin, thujon (absint)
  - GlyR – mutace - hyperekplexie



- ↳ GABA<sub>B</sub>Rs - GPCRs – Gi/o
  - presynaptické – inhibice Ca<sup>2+</sup> kanálů – snížení uvolňování mediátorů
  - postsynaptické – ↑ aktivity K<sup>+</sup> kanálů – hyperpolarizace
  - agonisté - Baclofen
  - antagonisté – Phaclofen, Saclofen



## ⇒ GABA<sub>B</sub> receptor - KCTDs

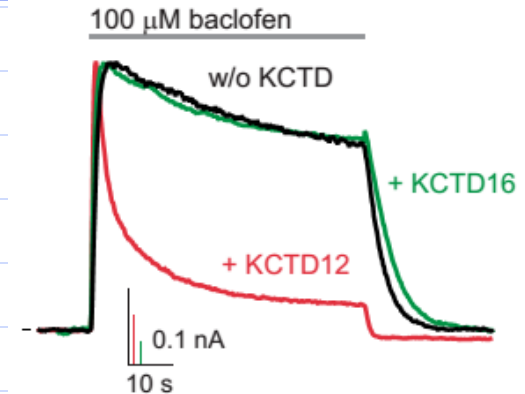
→ KCTD proteins (K-channel tetramerization domain-containing proteins)-  
KCTD 8,12, 16

- regulují funkci GABA<sub>B</sub> receptoru –  
zrychlují nástup GBR aktivované  
odpovědi K<sup>+</sup>-kanálů

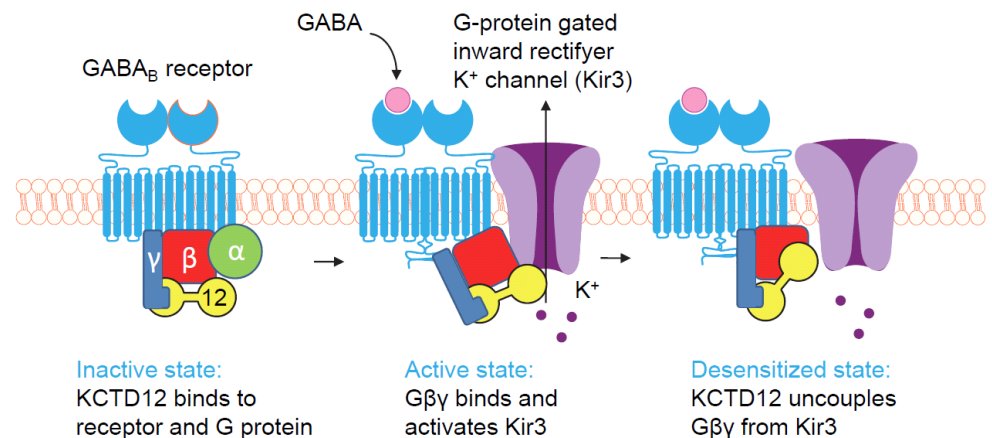
- KCTD 12 – rychlá desenzitizace K<sup>+</sup>  
proudu

- konstitutivně váží: C-konec  
GB2 podjednotky, Gβγ  
podjednotky

- KCTD12 dynamicky váží:  
volné Gβγ podjednotky –  
kompetice s vazbou na K<sup>+</sup>  
kanály



(Turecek R (2014) Neuron)





## ⇒ transportéry

### ↳ buněč. membrána – SLC6

- Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> symport; 12TM, dimery

### ↳ GAT1-4 - GABA

- neurony, glie

- GAT1 – změna v množství při schizofrenii,  
antiepileptikum – tiagabin (inhibitor)

- GAT3 – antikonvulziva

### ↳ GlyT1, GlyT2 - glycin

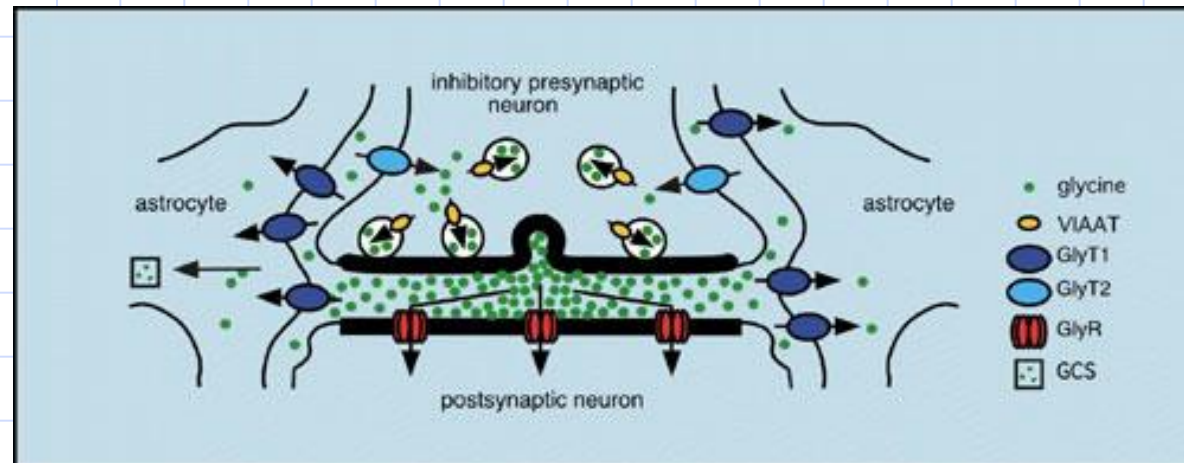
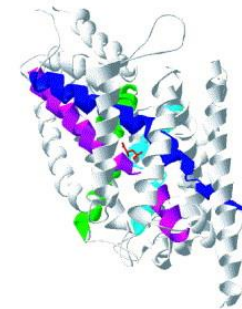
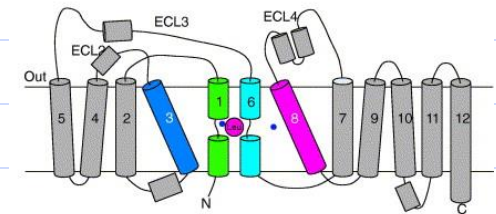
-GlyT1-1Gly/1Cl/2Na – astrocyty, odstranění Gly

- inhibitory – schizofrenie

-GlyT2-1Gly/1Cl/3Na – presynaptická zakončení, doplnění Gly ve váčcích

- GlyT2 mutace -  
hyperekplexie

### ↳ vezikulární – VIAAT



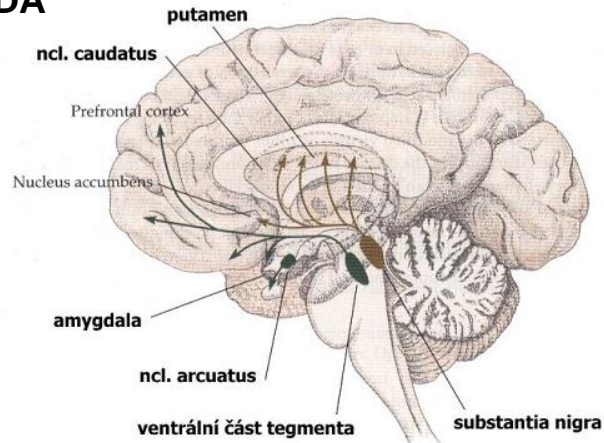
## ⇒ Biogenní aminy

↳ katecholaminy: *norepinefrin (noradrenalin)*, *epinefrin (adrenalin)*, *dopamin*

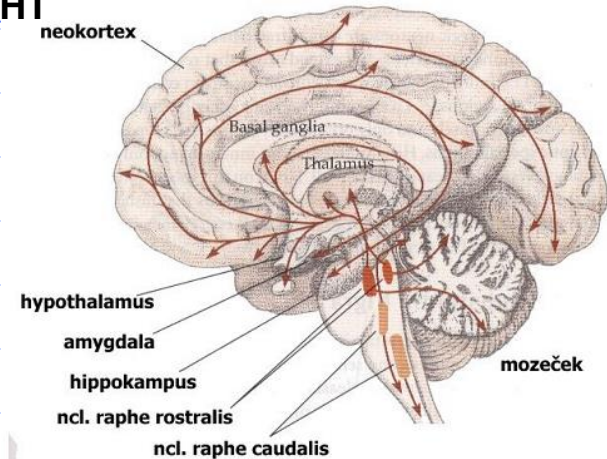
↳ *serotonin*

↳ *histamin*

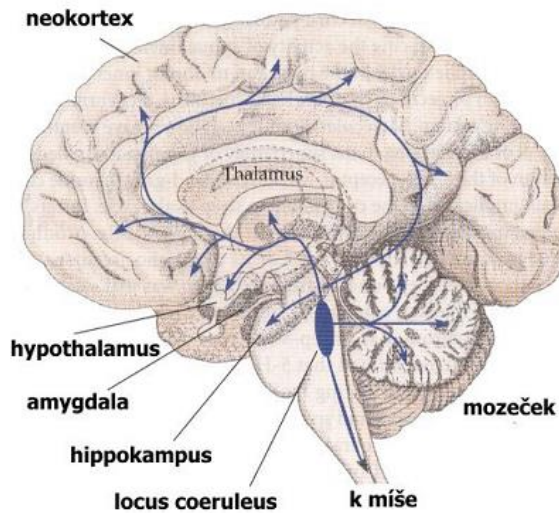
**DA**



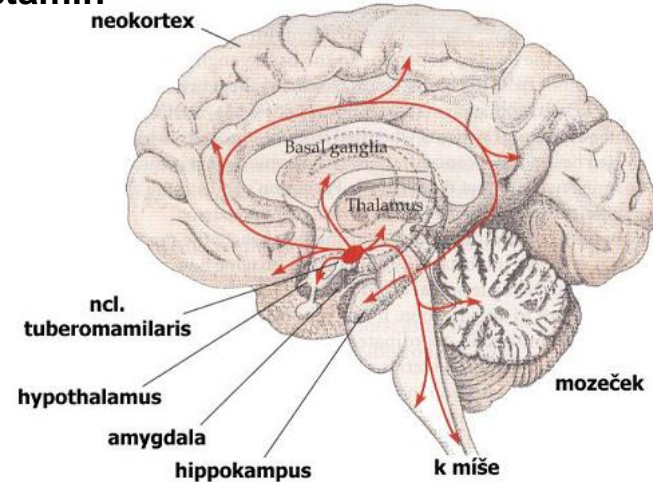
**5-HT**



**NA**



**Histamin**



## ⇒ katecholaminy

### ↳ norepinefrin (noradrenalin), epinefrin (adrenalin)

- sympatický NS - stresové reakce – srdeční frekvence, uvolnění glukosy, prokrvení svalů

- CNS – mozkový kmen (locus coeruleus) – pozornost, odměny

### ⇒ receptory

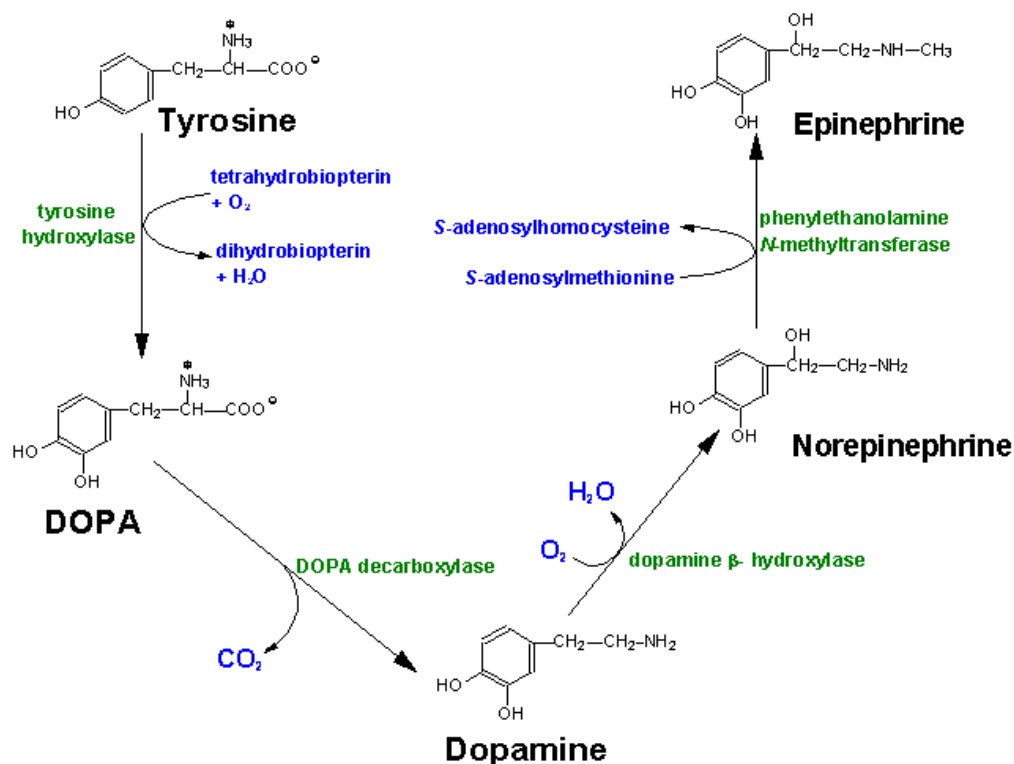
- adrenergní R: GPCRs
- $\alpha 1$ -Gq,  $\downarrow$   $K^+$  kanály
- $\alpha 2$  – Gi,  $\downarrow$  AC,  $\uparrow$   $K^+$  kanály
- $\beta 1, \beta 2$  – Gs,  $\uparrow$  AC

### ⇒ transportéry

- NET – SLC6 – NE, Epi, DA
- substrát - amfetamin
- inhibitor - kokain
- VMAT (vesicular monoamine transporter)
- inhibitory - antidepressiva

### ⇒ degradace

- COMT (catechol-O-methyl transferase), MAO (monoamine oxidase)



## ⇒ katecholaminy

### ↳ norepinefrin (noradrenalin), epinefrin (adrenalin)

- sympatický NS - stresové reakce – srdeční frekvence, uvolnění glukosy, prokrvení svalů

- CNS – mozkový kmen (locus coeruleus) – pozornost, odměny

### ⇒ receptory

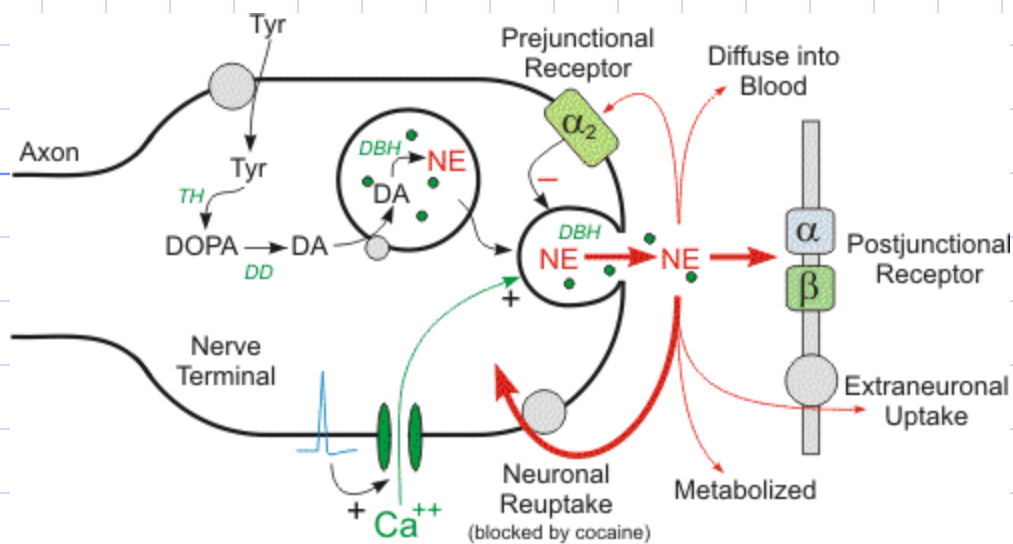
- adrenergní R: GPCRs
- $\alpha_1$ -Gq,  $\downarrow$   $K^+$  kanály
- $\alpha_2$  – Gi,  $\downarrow$  AC,  $\uparrow$   $K^+$  kanály
- $\beta_1, \beta_2$  – Gs,  $\uparrow$  AC

### ⇒ transportéry

- NET – SLC6 – NE, Epi, DA
- substrát - amfetamin
- inhibitor - kokain
- VMAT (vesicular monoamine transporter)
- inhibitory - antidepressiva

### ⇒ degradace

- COMT (catechol-O-methyl transferase), MAO (monoamine oxidase)



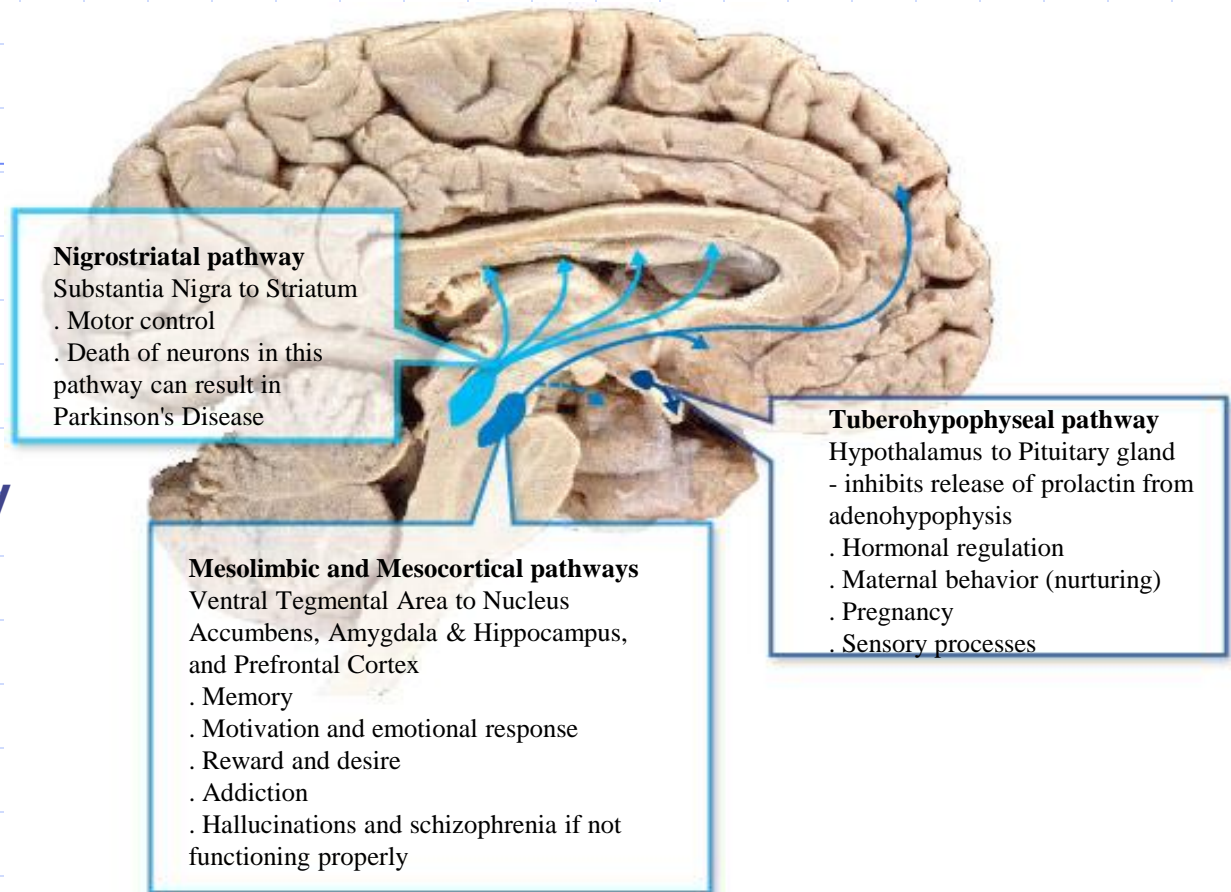
Tyr = tyrosine; TH = tyrosine hydroxylase; DD = DOPA decarboxylase; DA = dopamine; DBH = dopamine  $\beta$ -hydroxylase; NE = norepinephrine

## ⇒ katecholaminy

### ↳ dopamin (DA)

- motorická aktivita,  
paměť, motivace, emoce,  
odměny a návyky

- změny v DA systému -  
**Parkinsonova choroba,**  
**schizofrenie, strach,**  
**halucinace, návykové látky**



### ⇒ degradace

- **COMT (catechol-O-methyl transferase), MAO (monoamine oxidase)**

⇒ katecholaminy

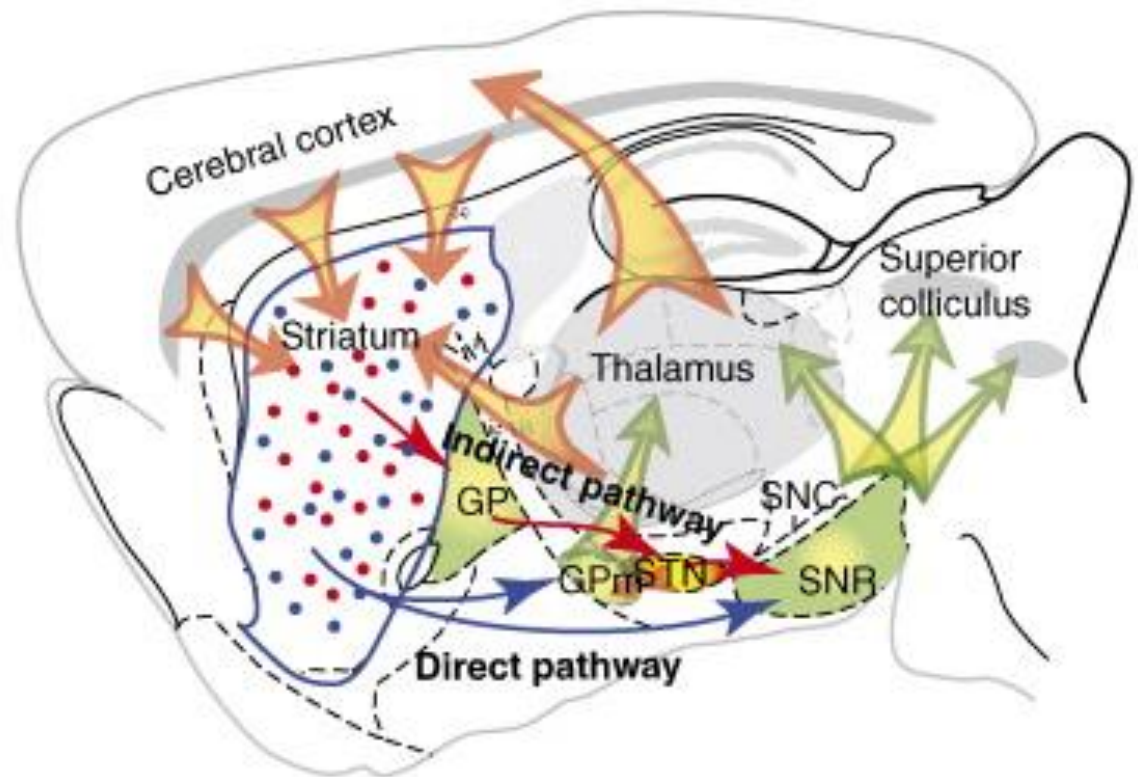
↳ dopamin (DA)

- motorická aktivita,  
paměť, motivace, emoce,  
odměny a návyky

- změny v DA systému -

**Parkinsonova choroba,**  
**schizofrenie,** strach,  
halucinace, návykové látky

striato-nigrální cesta



Surmeier J. TINS (2007)

⇒ degradace

- COMT (catechol-O-methyl transferase), MAO (monoamine oxidase)

⇒ DA receptor - GPCRs

↳ skupina *D1R*: *D1R*, *D5R*

↳ skupina *D2R*: *D2R*, *D3R*, *D4R*

- dimery/oligomery

⇒ transportéry

- DAT – SLC6

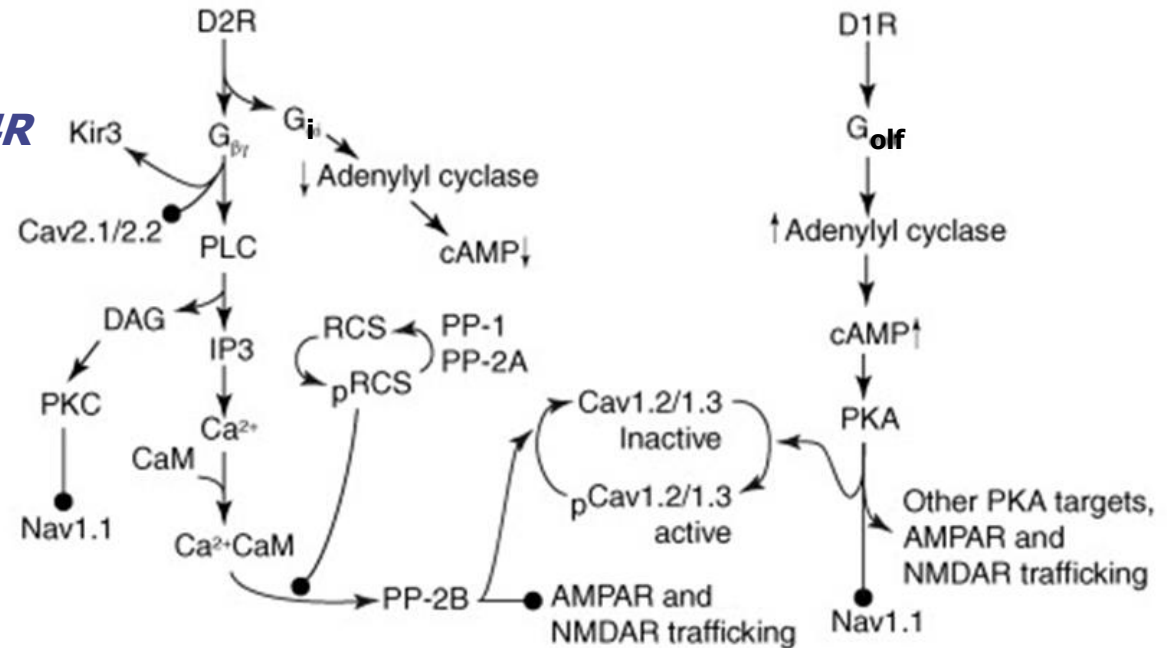
- Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> symport

- kokain - inhibitor

- amfetamin – substrát, obrácení směru transportu

- VMAT – SLC18,32

D1 and D2 receptor signaling cascades



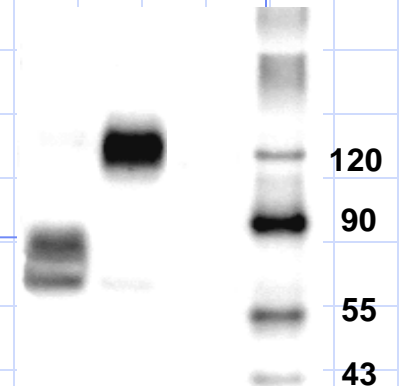
- schizophrenia model -  
*D2R* overexpression mice  
 (Kellendonk C, Simpson E, Neuron 2006)



WB – D2R

dimer

monomer



## ⇒ katecholaminy

### ↳ serotonin (5-HT)

- 90% gastrointestinální trakt, krevní destičky, CNS – serotonergní buňky – *nuclei raphes*

- nálada, chuť, spánek, učení, paměť

nedostatek – poruchy spánku, deprese, schizofrenie

inhibitory transportérů – kokain, tricyklická antidepresiva

receptory – GPCRs, 5-HT<sub>3</sub> – iontový kanál

agonisté – LSD, psilocin (psilocybin -lysohlávky)

5-HT<sub>2A</sub>-mGluR2 – aktivace mGluR2 – inhibuje halucinogenní účinek LSD, psilocybinu - schizofrenie – González-Maeso J. (2008) Nature

### ↳ Histamin

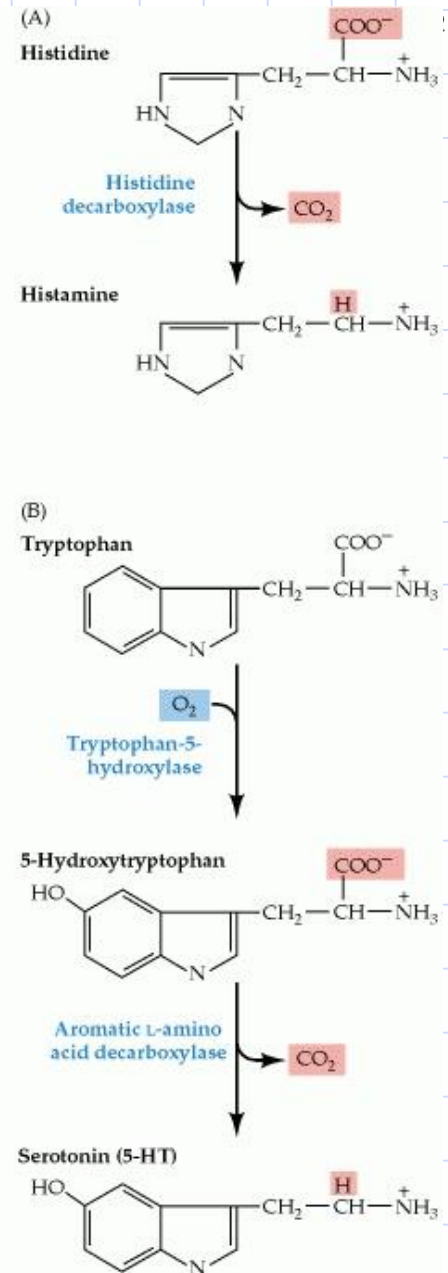
- lokální imunitní reakce (vasodilatace, chemotaxe), CNS (hypothalamus) — regulace spánku, nálada, tělesná teplota, vnímání bolesti (histaminové neurony neaktivní během spánku)

receptory – GPCRs, H<sub>1</sub>-H<sub>4</sub> R (H<sub>1</sub>,H<sub>3</sub>R – CNS)

antihistaminika – antagonisté H<sub>1</sub> R (G<sub>q</sub>)- ospalost

antagonisté H<sub>2</sub> R (G<sub>s</sub>) – ztráta libida, impotence

- ve fermentovaných potravinách, nápojích (sake, víno)





## ⇒ endokanabinoidy

- endokanabinoidní systém – příjemné účinky cannabinoidů, opioidů, nikotinu, alkoholu – zvyšují DA signalizaci – uvolnění endokanabinoidů ve VTA

endokanabinoidy – anandamid, 2-arachidonoylglycerol

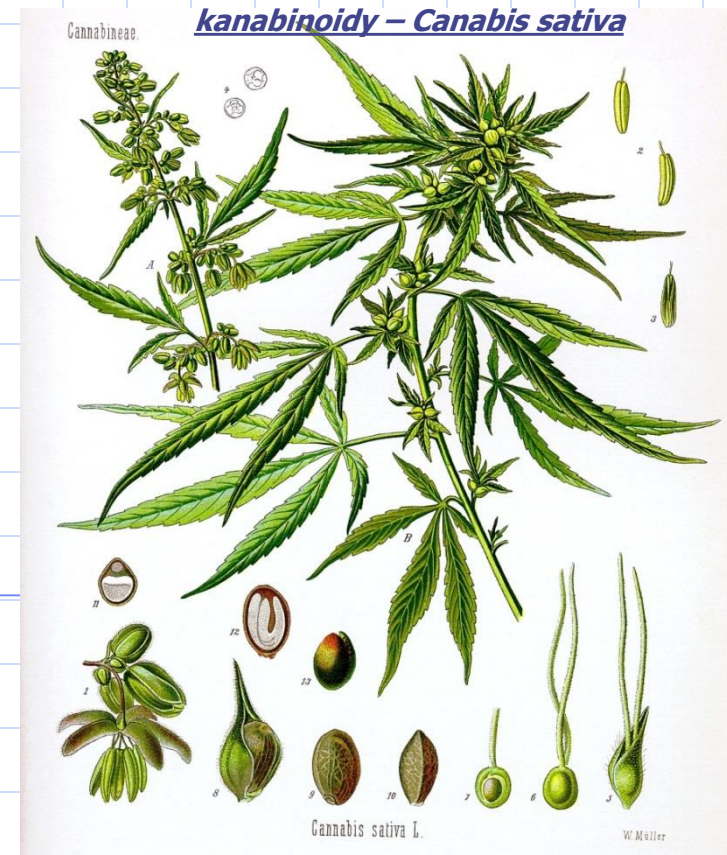
## ⇒ CB receptory - GPCRs

↳ CB1 – CNS – presyn. uvolňování neurotransmiterů - tetrahydrokannabinol (THC)

↳ CB2 – imunit. systém, mozkový kmen, kůra, mozeček

- VTA, NAcc, amygdala, frontální, limbický kortex

- cannabidiol (CBD) a  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC), jen THC psychoaktivní



## ⇒ peptidové mediátory

- propeptidy – štěpením v nervovém zakončení vznikají aktivní peptidy

- vasopresin (CYFQNCPRG-NH<sub>2</sub>),  
oxytocin (CYIQNCPLG-NH<sub>2</sub>) – retence  
vody v ledvinách, vasokonstrikce,  
tvorba paměti, agrese; porod, kojení,  
sociální chování, důvěra

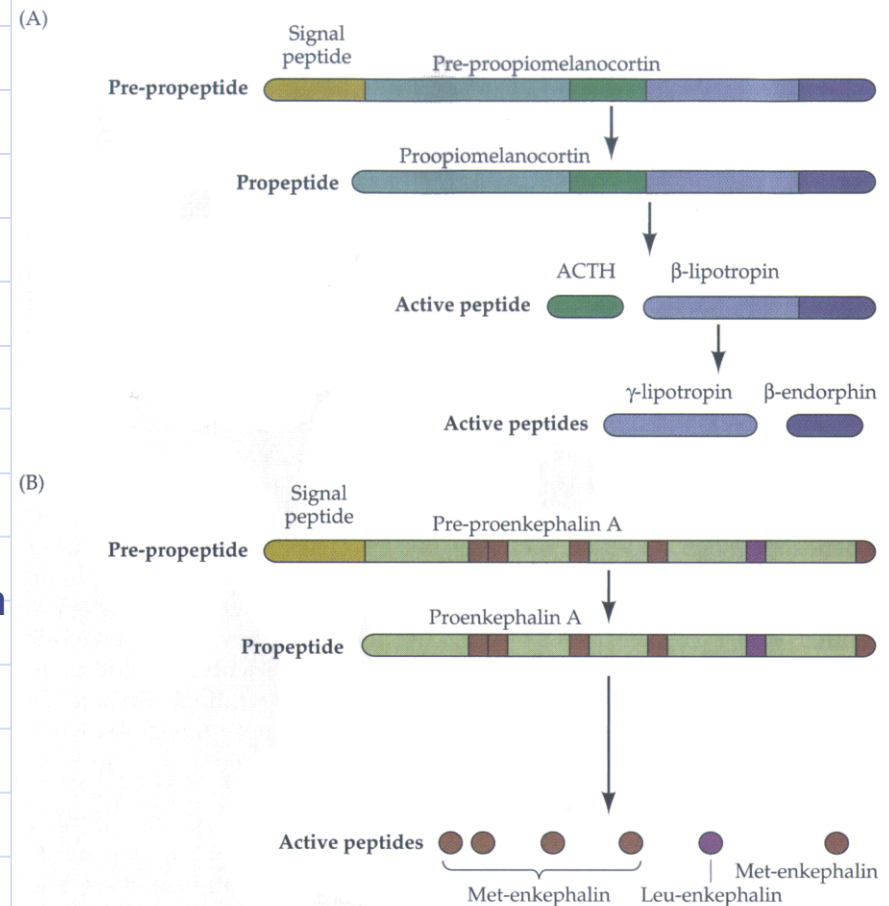
- analogy oxytocinu – indukce porodu  
- receptory GPCRs

- opioidy – endorfin, enkefalin,  
dynorfin – vnímání bolesti, závislost na  
návyk. látkách (kokain), stres, deprese

- receptory GPCRs – KOR, MOR, DOR

- Substance P – NK1R – vnímání  
bolesti, emoce, zvracení - striatum,  
SN, prodloužená mícha, mícha

- v SN ↑ uvolňování DA, ↑ uvolňování AcCh, Histaminu, GABA



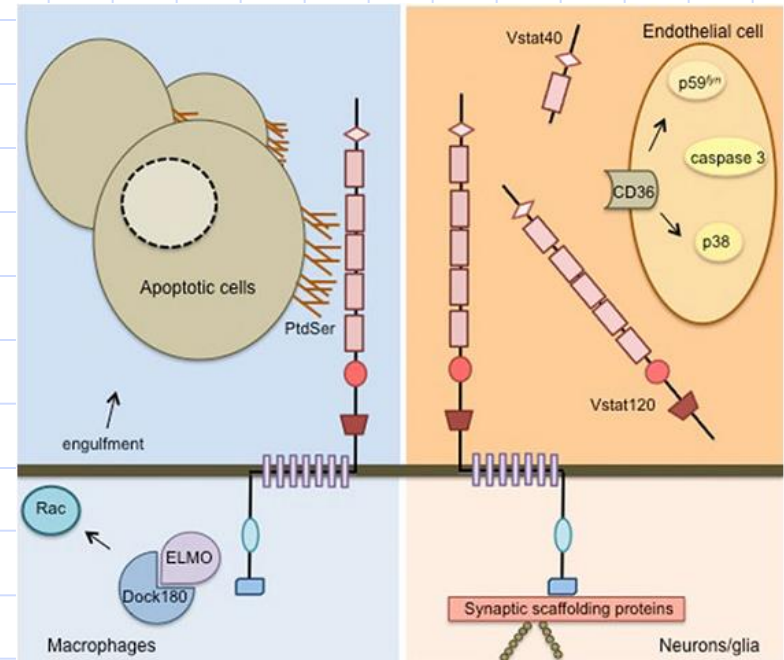
## ⇒ GPCRs bez známého ligandu (Orphan receptors)

### ↪ BAI 1-3 (brain angiogenesis inhibitor)

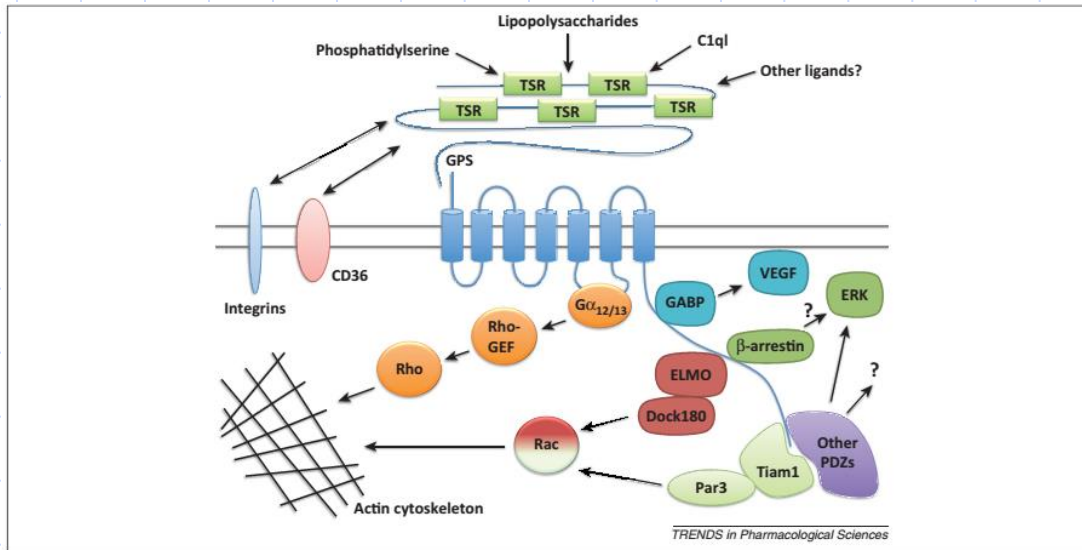
- vysoká exprese v mozku

- inhibice angiogeneze, tvorby tumorů,  
fagocytóza apoptotických buněk,  
synaptogeneze, tvorba dendritických  
trnů

- autoproteolýza N-konce – GPS (GPCR  
proteolytic site) – BAI 1- vasculostatin  
120 – N-konec se váže na CD36 –  
apoptotická signalizace



Cork S., J Mol Med (2011)



TRENDS in Pharmacological Sciences

↪ **ovlinění dendritických trnů**  
- schizofrenie, Parkinson  
(striatum), závislost, Fragile X  
syndrome

## ⇒ plynné mediátory

- žádná zásoba, volná difuze přes buněčnou membránu

### ⇒ NO

- syntéza z L-argininu – NOS – v celé CNS (kortex, hipokampus, striatum, mozeček) – aktivována Ca influxem – nutný kalmodulin
- imunitní odpověď, vasodilatace (aktivace guanylát cyklázy – defosforylace myosinu), periferní NS i CNS (aktivace GC, kovalentní modifikace proteinů, uvolnění neurotransmiterů)
- neurotoxický peroxinitrát (po aktivaci NMDA R), poškození DNA-deaminace bazí

### ⇒ CO

- syntéza z hemu – hem oxygenáza
- hipokampus, mozeček, čichové neurony
- aktivace GC

**The end**

**Konec**

**Son**

**Rampung**

**Slutten**

**El fin**

**Koniec**

**Fim**

**Hasof**

**Fine**

**Die Ende**

**Sfarsit**

**конѐц**

**終了**

**Salesai**

**La fin**