

AKTIVACE G-PROTEINŮ METABOTROPNÍMI GLUTAMÁTOVÝMI RECEPTORY A GABA_B RECEPTORY

JAROSLAV BLAHOŠ, MICHAELA HAVLÍČKOVÁ,
ALICE ZIKOVÁ, JOHANA TROJANOVÁ,
BOHDANA HRUŠKOVÁ, DANIELA FRANKOVÁ
a VERONIKA HLAVÁČKOVÁ

Oddělení Molekulární Farmakologie, Ústav Experimentální Medicíny Akademie věd České republiky, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4

Došlo 20.1.03, přepracováno 18.2.03, přijato 12.3.03.

Klíčová slova: receptory spřažené s G-proteiny, glutamátové receptory, γ -aminomáselná kyselina (GABA)

Obsah

1. Úvod
2. Typy receptorů na buněčné membráně
3. Dělení receptorů spřažených s G-proteiny
4. Třetí rodina GPCR
 - 4.1. Struktura GABA_B a mGlu Receptorů
 - 4.2. Determinanty spřažení GABA_B a mGlu Receptorů s G-proteiny
 - 4.3. Mechanismus aktivace receptorů 3. rodiny
5. Závěr

1. Úvod

Pro komunikaci s okolím používají buňky receptory, které se nacházejí buď na plazmatické membráně, nebo uvnitř buňky. Studium mechanismu fungování těchto receptorů je v centru pozornosti mnoha akademických i komerčních laboratoří. Pochopení principů fungování receptorů za fyziologických a patofyziologických stavů je výchozím předpokladem pro vývoj nových terapeutických přístupů.

2. Typy receptorů na buněčné membráně

Receptory, jež jsou funkční na buněčné membráně, dělíme podle mechanismu rozpoznání ligandu a přenosu signálu do buňky do tří hlavních skupin. Do jedné skupiny patří receptory s tyrozin-kinázovou aktivitou, například receptory pro růstové faktory, insulin a další významné ligandy. Plazmalematické receptory druhé skupiny jsou součástí kanálů pro ionty, jejichž propustnost je řízena agonisty nebo antagonisty. Ač jsou tyto receptory zastoupené v mnoha tkáních, typické jsou pro buňky vzrušivé tkáně. Mimo jiné do této skupiny proteinů patří ionotropní receptory pro glutamát či γ -aminomáselnou (GABA) kyselinu, serotonin a mnohé další neuropřenašeče. Je velice zajímavé, že většina těchto neuropřenašečů aktivuje i receptory spřažené s G-proteiny, které tvoří třetí skupinu receptorů

(v literatuře je možné setkat se s názvy: G-protein Coupled Receptors, GPCR, heptahelikální receptory, serpentine receptors). Patří sem receptory pro mnohé působky, aminokyseliny, peptidy, sacharidy, lipidy, ionty ale i fotony. Většina komerčně dostupných léčiv působí přes GPCR.

3. Dělení receptorů spřažených s G-proteiny

Receptory spřažené s G-proteiny dělíme dle příbuznosti primárních sekvencí jejich peptidových řetězců do několika rodin¹. První rodinu tvoří receptory pro malé ligandy, většinou aminokyseliny či jejich deriváty. Místo pro vazbu ligandů je zanořené do heptahelikální domény, nebo je umístěno více extracelulárně, a nachází se částečně na heptahelikální doméně, ale částečně též na N-terminální části proteinu. Do této rodiny patří receptory pro thrombin, u něhož odštěpený N-konec slouží zároveň jako agonista a další receptory, jejichž ligandy jsou především glykoproteiny (např. luteinizační hormon, folikuly stimulující hormon a další). Pro zástupce první rodiny je typická sekvence D-R-Y na druhé intracelulární klíče, jež hraje roli při aktivaci receptoru a komunikaci s G-proteiny.

Do druhé rodiny receptorů spřažených s G-proteiny patří receptory pro peptidové působky jako je kalcitonin, intestinální vazomotorický peptid a další. Ligand je u těchto receptorů opět rozlišován částí extracelulárního N-konce a N-terminální extracelulární částí heptahelikální domény.

V literatuře byly publikovány práce věnované receptorům první a druhé rodiny, které popisují některé molekulární determinanty na straně receptorů a G-proteinů, jež se účastní přenosu signálu z extracelulární části receptorů na nitrobuněčné signální kaskády.

Třetí rodina receptorů spřažených s G-proteiny, zvaná též „Metabotropic Glutamate Receptor (mGluR) family“, je poměrně nová (první zástupce byl vyklonován teprve před dvánácti lety) a je tvořena stále se rozšiřující skupinou proteinů, jež jsou sekvencně příbuzné s metabotropním glutamátovým receptorem. V současné době je známo 8 genů pro metabotropní glutamátové receptory, které kódují proteiny mGluR1– mGluR8. Dalšími členy této rodiny jsou mGluR, Ca-senzing receptor, GABA_B receptor, receptor pro sladké (sweet receptor pro disacharidy), některé jiné chuťové (agouti), feromonové a další receptory. Jak již bylo poznamenáno, glutamát i GABA aktivují také ještě jiný typ receptorů, tzv. ionotropní receptory, jež patří do skupiny receptorů spojených s iontovými kanály. Osm známých mGluR se dále dělí, podle sekvencní homologie a farmakologických vlastností, do tří skupin. První skupinu tvoří mGluR1 a mGluR5 (a jejich sestřihové varianty 1a, 1b, 1c, 1d, 5a, 5b), do druhé skupiny patří mGluR2 a mGluR3 a do skupiny třetí mGluR4, mGluR6, mGluR7 a mGluR8 (a sestřihové varianty 7a, 7b, 8a, 8b). mGluR z první skupiny aktivují fosfolipázu C (PLC), receptory z druhé a třetí skupiny jsou negativně spjaty s adenylát cyklázou (AC).

Další receptory, například Frizzled a další, se dnes řadí do samostatných rodin.

4. Třetí rodina GPCR

4.1. Struktura GABA_B a mGlu Receptorů

Pro receptory patřící do třetí rodiny GPCR je typická relativně velká extracelulární N-terminální doména (okolo 120 aminokyselin), která obsahuje determinanty pro vazbu přírodních agonistů. Tato globulární struktura je následována sedmi transmembrálními hydrofobními úseky, spojenými hydrofilními kličkami. Heptahelikální doména (HD) je typická pro všechny receptory spřažené s G-proteiny. Na rozdíl od receptorů z první a druhé rodiny nehraje transmembránová doména roli při rozeznávání přirozených ligandů².

K nedávným úspěchům farmaceutických firem patří objev některých umělých ligandů, které mohou inhibovat či aktivovat tyto mGlu a GABA_B receptory vazbou právě v heptahelikálních doménách (nekompetitivní ligandy)³⁻⁷. Nitro-buněčný C-konec je u těchto proteinů různě dlouhý. Tato část proteinu obsahuje sekvence, které umožňují transport receptorů do příslušných kompartmentů buňky a též úseky, které mohou interagovat s dalšími proteiny. Dimerizace, tedy asociování proteinů do jednoho receptorového komplexu, byla prokázána u všech studovaných receptorů třetí rodiny. Jde buď o homodimerizaci (např. receptory pro glutamát, kalcium) nebo heterodimerizaci (GABA_B, některé chuťové „sweet“ receptory).

4.2. Determinanty spřažení GABA_B a mGlu Receptorů s G-proteiny

Mechanismem aktivace G-proteinů se rozumí především přenos konformačních změn z heptahelikální domény receptorů na G α -protein. Na tomto proteinu jsou vyvolány změny relativní polohy jeho oddílů a tyto změny jsou přeneseny do nitra proteinu na vazebné místo pro GDP/GTP. Aktivace G α -proteinu znamená snížení afinity pro GDP (guanosin-5'-difosfát) a zároveň zvýšení afinity pro GTP (guanosin-5'-trifosfát). Takto aktivovaný G α -protein se následně oddělí od β/γ dimeru a všechny podjednotky pak modulují funkční stav

řady enzymů a iontových kanálů a tím regulují tvorbu druhých posílů a modulují další signální soustavy.

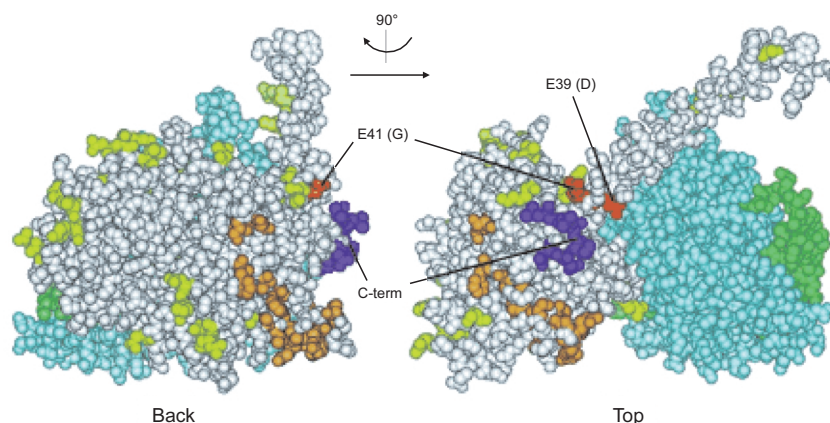
Nejlépe zmapovanou strukturální determinantou G α -proteinu, která tvoří kontaktní plochu s receptory, je karboxylové zakončení, kde především pět posledních aminokyselin selektivně interaguje s GPCR. Navíc čtvrtá aminokyselina od karboxylového zakončení na G α -proteinu má stěžejní význam pro rozpoznávání receptorů z třetí rodiny GPCR^{8,9}. Další části G α -proteinu, které jsou během aktivace s receptorem v kontaktu a které determinují jaký typ G α -proteinu bude aktivován kterým receptorem a do jaké míry, se nazývají L9 klička a pre- β 1 sheet¹⁰. Na trojrozměrném modelu G-proteinů jsou tyto struktury rozmístěny v blízkosti C-konce (obr. 1).

Na straně receptorů se aktivace G-proteinů účastní nitro-buněčné kličky a to především druhá a třetí¹¹. Pro selektivitu vůči G-proteinům (tedy jaký G-protein bude aktivován) je stěžejní nejdelsí, druhá intracelulární klička¹².

4.3. Mechanismus aktivace receptorů 3. rodiny

Jedna z klíčových otázek týkající se funkčních vlastností GPCR zní: Jakým způsobem je přenášen signál z extracelulární části receptoru na vnitřní stranu buněčné membrány, kde dochází k aktivaci G-proteinu? Krystalizace extracelulární, agonisty vážící části mGlu receptoru ukázala, že vazba agonistů způsobí konformační změnu této části receptoru¹³. Celý jev připomíná sevření listů masožravých rostlin při dosednutí hmyzu (tzv. Venus Fly Trap-like mechanism). Tato změna způsobí oddálení části, jež nasedá na heptahelikální doménu. Změna vzdálenosti dvou HD v rámci jednoho receptorového dimeru je tedy aktivovaný stav, kdy receptor může způsobit výměnu GTP za GDP v G α -proteinu.

V našich studiích jsme se snažili popsat mechanismy fungování GABA_B receptoru, neboť jde o velice zajímavý protein jak z fyziologického tak z farmakologického a biochemického hlediska. Tento receptor je tvořen komplexem dvou odlišných proteinů a může tak sloužit jako ideální model dimerizace GPCR¹⁴. Úloha obou podjednotek GB1 a GB2



Obr. 1. Počítačový model G-proteinů. Zmapované domény, které jsou během aktivace v kontaktu s metabotropními glutamátovými receptory. BÍLÁ – G α -protein se světle zelenými aminokyselinami, které se nepodílí na rozpoznávání mGlu Receptorů. MODRÁ – extrémní C-terminus; ORANŽOVÁ – L9 loop (úsek mezi α 4- β 6); ČERVENÁ – pre β 1; ZELENÁ – podjednotky β,γ

v receptorovém komplexu $GABA_B$ je unikátní. Heterodimerizace GPCR vnáší do celé problematiky studia transdukčních mechanismů $GABA_B$ receptorů zcela nový prvek a nabízí další možnosti vysvětlení některých funkčních vlastností těchto proteinů. Heterodimerizace je popsána u řady ionotropních receptorů, například i u $GABA_A$ receptoru, ale u metabotropních receptorů jde o jev nově studovaný. Klíčová otázka týkající se funkčních vlastností GPCRů zní: Jakým způsobem je přenášén signál z extracelulárního N-konce receptoru na vnitřní stranu buněčné membrány, kde dochází k aktivaci G proteinu?

Jak bylo uvedeno v úvodu této práce, všechny determinanty vazby ligandů na receptory třetí rodiny GPCR jsou obsaženy v extracelulární N-terminální části, která je kovalentně spojená s heptahelikální transmembránovou doménou, avšak funkčně a morfologicky tvoří samostatnou doménu. Extracelulární doména GB1 podjednotky je stěžejní pro rozpoznávání $GABA$ či dalších ligandů včetně komerčně dostupných farmak (Baklofen)^{15,16}. K vazbě ligandů dochází na základě stejných principů jako u metabotropních glutamátových receptorů při aktivaci glutamát. Extracelulární doména $GABA_B$ receptoru, tedy GB1 podjednotky, změní po navázání agonisty konformaci vazebného místa v podobě přiblížení dvou polovin k sobě, podobně jako je tomu u mGlu receptorů.

GB2 podjednotka obsahuje dostatek strukturálních determinantů pro spřažení s G-proteiny¹⁷. Tento závěr jsme popsali v publikaci, kde stěžejní roli hrál chimerický protein, který má N-konec odpovídající sekvenci GB1 proteinu (tedy vazebné místo pro agonisty je zachováno), ale heptahelikální doména GB1 je zaměněna za odpovídající sekvence z GB2. Tato

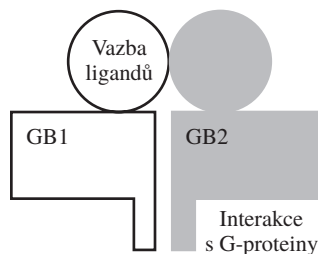
chimerická GB1/GB2 podjednotka (viz obr. 2, 3a,3b) sama o sobě není funkční. Avšak když jsme tuto podjednotku testovali spolu s GB2 podjednotkou, funkční odpovědi byly pozitivní, byť nižší než u přirozeného (wild type) receptoru. Opačné chiméry, u kterých byla heptahelikální část z GB2 vynechána a nahrazena odpovídající sekvencí z GB1, nebyly funkční, tedy nebyly schopny aktivovat G-proteiny v našem systému. Z těchto pozorování odvozujeme, že je to GB2 podjednotka, jejíž nitrobuněčná část heptahelikální domény je zodpovědná za aktivaci G-proteinů. $GABA$ či jiné ligandy interagují s GB1 podjednotkou, kde navázání agonisty v N-terminální doméně způsobí konformační změny vedoucí k aktivaci vazebného místa a následně i receptoru. Předpokládáme, že interakce mezi částmi GB1 a GB2 umožňuje přenos konformačních změn extracelulární části GB1 a s touto doménou interagující homologní domény GB2 na transmembránní úseky GB2 podjednotky. O úloze transmembránní domény GB1 podjednotky se můžeme dohadovat. Jisté je, že podjednotky GB1 a GB2 allostericky interagují.

Dále nás zajímalo, jaký je poměr mezi počtem heptahelikálních domén a partnerských G-proteinů. Proto jsme vytvořili mutace HD u chimerického receptoru GB1/2+GB2, které znemožňují spřažení daných HD s G-proteiny. Tyto mutace jsme postupně vkládali do jedné či druhé HD, a vzniklé mutanty jsme funkčně analyzovali. Získané výsledky bylo možné interpretovat jednoznačně. V receptoru, kde jsou dvě heptahelikální domény, každá sama o sobě aktivuje G-proteiny. Tento poznatek vnesl nové světlo do našeho chápání aktivace G-proteinů dimerickými receptory 3. rodiny GPCR (cit.¹⁸).

Extracelulární N-konec

Heptahelikální transmembránová doména

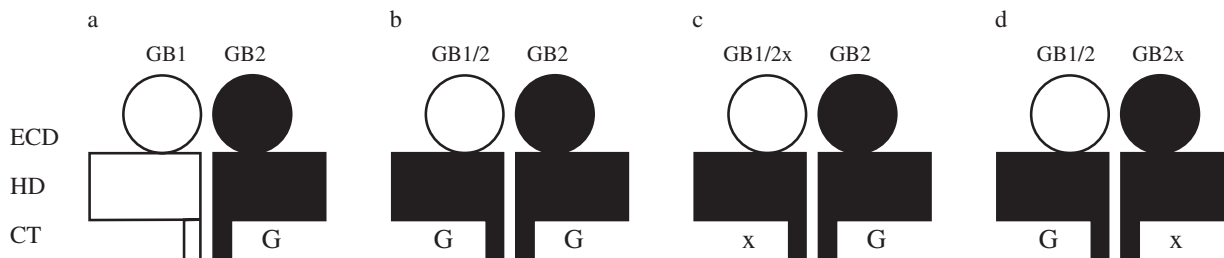
C-konec (retence GB1 v ER)



5. Závěr

V našich studiích jsme dokumentovali některé základní strukturálně-funkční závislosti u receptorů spřažených s G-proteiny pro glutamát a γ -aminomáselnou kyselinu. Metabotropní glutamátové receptory jsme si zvolili pro naše studium proto, že glutamát je hlavní excitací neurotransměř u obratlovců, zatímco $GABA$ je hlavní inhibiční mediátor. Jedinečnost a důležitost metabotropních receptorů v inter neuronální komunikaci je v tom, že modulují inter neuronální signalizaci na úrovni presynaptické i postsynaptické. Možnost ovlivňování příčin nebo následků glutamátové neurotoxicity znamená potenciální farmaceutické využití ligandů působících na tyto

Obr. 2. $GABA_B$ receptor schematicky. $GABA_B$ receptor je dimer složený z podjednotek GB1 a GB2. Každá podjednotka má unikátní úlohu



Obr. 3. Heterodimerický receptor $GABA_B$ schematicky (a). Použití chimerického receptoru GB1/2+GB2 (b) a jeho bodových mutací (x v c a d), které neumožní aktivaci G-proteinů (G) danou heptahelikální doménou (HD). ECD extracelulární doména, CT C-terminus. a) wild type receptor aktivuje G-proteiny přes GB2 podjednotku. b) chimerický receptor GB1/2+GB2 aktivuje G-proteiny oběma podjednotkami. Tento receptor je stále schopný aktivovat G-proteiny, ať už je jedna nebo druhá heptahelikální doména mutovaná tak, že není kompatibilní s G-proteinovou aktivací c) a d).

receptory. V neposlední řadě jsme se rozhodli pro studium těchto receptorů pro jejich unikátní strukturální vlastnosti, jež byly zdůrazněny v úvodu této práce. Zajímavé pro nás bylo i to, že některé jiné receptory z první a druhé rodiny byly již mnohými pracovišti zkoumány, a tak bylo možné srovnávat rozdíly a shodné výsledky mezi předešlými studii a našimi závěry. GABA_B receptor je zajímavý tím, že je receptorem pro hlavní inhibiční neuropřenašeč. Navíc je sekvenčně a strukturálně příbuzný s metabotropním glutamátovým receptorem. Pozoruhodná struktura GABA_B receptoru, totiž heterodimerizace dvou podjednotek, je dalším významným důvodem, proč nás zaujal jako model studia strukturálně-funkčních vztahů GPCR.

Naše výsledky napovídají, že dosud studované receptory z první a druhé rodiny aktivují G-proteiny podobnými mechanismy jako námi studovaní zástupci rodiny třetí, třebaže tyto proteiny navzájem nemusí mít žádnou sekvenční podobnost. Ovšem všechny tyto receptory mají přes naprostou odlišnost primárních sekvencí shodný znak a tím je přítomnost transmembránních α -helikálních domén. Prvním indikátorem shodných mechanismů a principů aktivace signálních kaskád bylo popsání části G-proteinů, které se dotýkají receptorů při aktivaci. Zde je naprosto zřejmé, že stejné struktury jsou rozpoznávány sekvenčně odlišnými receptory a tudíž, že i mechanismus aktivace těchto G-proteinů bude podléhat stejným pravidlům.

Tato práce byla řešena s podporou grantu IGA MZČR NL 6114-3/2000

LITERATURA

1. Bockaert J., Pin J.-P.: *EMBO J.* 18(7), 1723 (1999).
2. Pin J.-P., Bockaert J.: *Curr. Opin. Neurobiol.* 5(June), 342 (1995).
3. Knoflach F., Mutel V., Jolidon S., Kew J. N., Malherbe P., Vieira E., Wichmann J., Kemp J. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (23), 13402 (2001).
4. Litschig S., Gasparini F., Rueegg D., Munier N., Flor P. J., Vranesic I.-T., Prézeau L., Pin J.-P., Thomsen C., Kuhn R.: *Mol. Pharmacol.* 55, 453 (1999).
5. Urwyler S., Mosbacher J., Lingenhoechl K., Heid J., Hofstetter K., Froestl W., Bettler B., Kaupmann K.: *Mol. Pharmacol.* 60(5), 963 (2001).
6. Pin J.-P., Parmentier M. L., Prézeau L.: *Mol. Pharmacol.* 60(5), 881 (2001).
7. Pagano A., Rüegg D., Litschig S., Stoehr N., Stierlin C., Heinrich M., Floersheim P., Prézeau L., Carroll F., Pin J.-P., Cambria A., Vranesic I., Flor P. J., Gasparini F., Kuhn R. J.: *Biol. Chem.*, v tisku (2000).
8. Blahos J., Mary S., Perroy J., de Colle C., Brabet I., Bockaert J., Pin J.-P.: *J. Biol. Chem.* 273(40), 25765 (1998).
9. Franek M., Pagano A., Kaupmann K., Bettler B., Pin J.-P., Blahos J.: *J. Neuropharmacology* 38, 1657 (1999).
10. Blahos J., Fischer T., Brabet I., Stauffer D., Rovelli G., Bockaert J., Pin J.-P.: *J. Biol. Chem.* 276(5), 3262 (2001).
11. Francesconi A., Duvoisin R. M.: *J. Biol. Chem.* 273(10), 5615 (1998).
12. Havlickova M., Blahos J., Brabet I., Liu J.-F., Hruskova B., Prezeau L., Pin J.-P.: *J. Biol. Chem.*, On-line Epub June 26, 2003 (2003).
13. Kunishima N., Shimada Y., Tsuji Y., Sato T., Yamamoto M., Kumasaka T., Nakanishi S., Jingami H., Morikawa K.: *Nature* 407(6807), 971 (2000).
14. Bettler B., Kaupmann K., Bowery N.: *Curr. Opin. Neurobiol.* 8(3), 345 (1998).
15. Kniazeff J., Galvez T., Labesse G., Pin J.-P.: *J. Neurosci.* 22(17), 7352 (2002).
16. Galvez T., Prezeau L., Milioti G., Franek M., Joly C., Froestl W., Bettler B., Bertrand H.-O., Blahos J., Pin J.-P.: *J. Biol. Chem.* 275(52), 41166 (2000).
17. Galvez T., Duthey B., Kniazeff J., Blahos J., Rovelli G., Bettler B., Prezeau L., Pin J.-P.: *EMBO J.* 20(9), 2152 (2001).
18. Havlickova M., Prezeau L., Duthey B., Bettler B., Pin J.-P., Blahos J.: *Mol. Pharmacol.* 62(2), 343 (2002).

J. Blahoš, M. Havlíčková, A. Ziková, J. Trojanová, B. Hrušková, D. Franková, and V. Hlaváčková (*Department of Molecular Pharmacology, Institute of Experimental Medicine, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague*): **Activation of G-Proteins by Metabotropic Glutamate Receptors and GABA_B Receptors**

This review summarizes new findings on family 3 G-protein coupled receptors, also called metabotropic glutamate receptor (MGR) family, with respect to G-protein activation. In our studies we try to map the interface, which is crucial for G-protein activation. The interface includes intracellular loops of MGR, the loops 2 and 3 being especially important. On the GABA_B receptor, the GB2 subunit contains enough molecular determinants for G-protein activation. Similarly to MGR, also here the corresponding intracellular loops are involved. On the G-protein side, the N-terminal preB1 region, C-terminal L9 loop and the extreme C-terminus are likely to contact the receptors in their active state.