

METABOTROPNI RECEPTORJI

Seminarska naloga pri predmetu Biološke membrane

Zara Bunc, Zarja Doberšek, Živa Flego, Tinkara Korošec, Teo Trost

Ljubljana, maj 2025

Metabotropni receptorji zajemajo dve skupni receptorjev: z G-proteinom sklopljeni receptorji (GPCR) aktivirajo sekundarne prenašalce, kot sta cAMP in cGMP, in posredno vplivajo na ionske kanalčke. Tirozin kinazni receptorji pa na ionske kanale vplivajo neposredno ali posredno preko fosforilacije [1].

1. GPCR

1.1. Evolucija

Z G-proteini sklopljeni receptorji in njimi povezane signalne molekule so ena od glavnih signalnih poti pri evkariontih. Ohranjeni so tako pri preprostih enoceličnih evkariontih kot tudi pri kompleksnejših živalih [2]. So največja družina transmembranskih receptorjev pri človeku in obsegajo približno 800 predstavnikov [3]. Živalski GPCR-ji so po GRAFS sistemu, ki vključuje tako filogenetske kot strukturne značilnosti, razvrščeni v pet skupin. Te skupine so glutamatni (tip C), rodopsinski (tip A), adhezijski (tip B), sekretinski (tip B), in frizzled (tip F). Poznamo tudi ne-živalske GPCR-je, kot sta na primer cAMP (tip E), ITR-like in GPR-180-like družini ter nekateri za določene rodove specifični receptorji. Večina družin GPCR receptorjev najverjetneje izvira že iz zadnjega skupnega evkariotskega prednika. Glavna mehanizma evolucije GPCR-jev sta konvergentni razvoj in preurejanje domen. Pri živalih so GPCR-ji doživeli največjo ekspanzijo. Najverjetneje so s pojavom večceličnih organizmov GPCR-ji prodobili nove funkcije, na primer medcelično signaliziranje, regulacija razvoja organizma ter zaznavanje okolice (svetlobe, vonja...) [2]. Vsem GPCR-jem je skupna transmembranska domena iz sedmih vijačnic, ki se je v evoluciji večkrat neodvisno pojavila. Med prej omenjenimi petimi skupinami receptorjev so najbolj razširjeni rodopsinski, ki pri človeku vključujejo približno 700 receptorjev. Visoko ohranjenih je zgolj nekaj določenih aminokislinskih ostankov znotraj transmembranskih vijačnic, medtem ko je celokupna ohranjenost okoli 15 % [3]. Pri živalskih GPCR-jih je N-terminalni konec proteina bolj variabilen kot pri ne-živalskih, lahko so prisotne še dodatne domene. G-proteini so strukturno bolj ohranjeni od receptorjev. Kljub temu so podenote G proteinov med evkariontskimi vrstami prisotne v različnem številu. Evolucijsko je najbolj dinamična alfa podenota, beta in gama sta bolj ohranjeni [2].

1.2. Biokemija

G-proteini so heterotrimerne molekule, ki vežejo gvaninski nukleotid [4]. Imajo tri podenote α , β , in γ . V neaktivni obliki je na α -podenoto vezan gvanozin difosfat (GDP). Ob aktivaciji GPCR-ja in vezavi G-proteina na receptor se izmenjata GDP in gvanozin trifosfat (GTP). G-protein je v neaktivni obliki vezan na znotrajcelično stran membrane, aktiviran pa omogoči asociacijo GPCR-jev z encimi ali ionskimi kanali. Možna je tudi interakcija z GPCR-ji še pred aktivacijo teh receptorjev [5]. GPCR-ji se odzivajo na ogromen nabor molekul v celici in ob vezavi aktivirajo nadaljnje znotrajcelične signalne poti in odzive. Gre za transmembranske proteine, ki prenašajo signal čez celično membrano, s konformacijsko spremembo ob vezavi ligandov. Ligandi so majhne molekule kot so hormoni, nevrotransmiterji in kemokini. Ti se vežejo na zunajcelični del receptorja, ki se najbolj razlikuje med GPCR-ji. Ob vezavi se sproži konformacijska sprememba, ki razkrije vezavno mesto za G-proteine. Transmembranska vijačnica (TMV) 6 se premakne navzven, kar razkrije vezavno mesto za G-protein, ki ga obdajajo še zanke TMV-3, 5 in 7. G-protein tvori polarne in hidrofobne interakcije, kar ga prehodno veže na receptor. Opisan znotrajcelični potek je skupen receptorjem te družine [6].

Afiniteta G-proteinov do GTP/GDP je visoka, kar pomeni, da je disociacija nukleotidov počasna. Intrinzično počasno aktivacijo pospešijo gvanin nukleotidni izmenjevalni faktorji (*angl. guanine nucleotide exchange factor*, GEF). GEF deluje tako, da vpliva na vezavno mesto za fosfat in s tem zmanjša afiniteto nukleotida do G-proteina. Izmenjava GDP in GTP povzroči konformacijsko spremembo v G-proteinu, kar ga aktivira [5],[7].

Ob vezavi GTP na podenoto α se sprostita β in γ podenoti. Ti sta tesno povezani in se obravnavata kot ena funkcionalna enota. Obe funkcionalni enoti - α in $\beta\gamma$ sta sposobni sprožiti nadaljnje signale [4]. GTP je vezan na α -podenoto, ki ima GTP-azno aktivnost in hidrolizira GTP v GDP. Hidrolizna aktivnost je ojačana, ko α -podenota interagira s specifičnimi regulatorji G-proteinskega signaliziranja (*angl. specific regulator of G protein signaling*, RGS). Proteini RGS delujejo kot GTP-aza aktivirajoči proteini (*angl. GTPase activating proteins*, GAP). Ti pospešujejo intrinzično počasno hidrolizo GTP-ja. GAP-i so strukturno nesorodni in na G-protein delujejo različno. Splošna funkcija proteinov GAP je kataliza in stabilizacija premičnega katalitičnih domen G-proteina [5],[7]. Ga se inaktivira s

hidrolizo GTP, $G\beta\gamma$ pa s ponovno vezavo na $G\alpha$ -GDP kompleks, kar zaključi cikel G-proteinov [4].

1.3. Opioidni receptor

1.3.1. Evolucija

Opioidne receptorje kodirajo štiri geni OPRD1 (δ), OPRK1 (κ), OPRM1 (μ) in OPRL1 (opiod receptor-like oziroma nociceptinski receptor). Pripadajo naddružini rodopsinu podobnih z G proteini sklopljenih receptorjev. Nahajajo se v štirih genomskih regijah, ki imajo skupen evolucijski izvor. Najverjetneje so nastali s tetraploidizacijo izvirnega gena v zgodnji evoluciji vretenčarjev [8]. V zgodnjem razvoju živali je obstajal en sam gen za opioidni unireceptor. Zgodaj v evoluciji strunarjev je prišlo do prve genomske duplikacije, s katero sta nastala predniška gena za δ in μ receptor ter za κ receptor in nociceptinski receptor. Z drugo duplikacijo so nastali štiri geni za opioidne receptorje, ki so prisotni pri večini današnjih vretenčarjev [9]. Štiri tipi opioidnih receptorjev pri vretenčarjih (delta, kapa, μ , nociceptinski receptor) imajo visoko homologna aminokislinska zaporedja. Zaporedja sedmih transmembranskih regij so praktično identična, visoko ohranjene so tudi znotrajcelične zanke. Največja raznolikost je prisotna v N-terminalni regiji [8]. μ in δ receptor sta si med seboj najbolj bolj sorodna, prav tako sta si bolj kot z drugimi receptorji sorodna κ receptor in nociceptinski receptor. To podpira hipotezo o nastanku genov za opioidne receptorje z dvakratno duplikacijo. Za duplicirane gene je značilna asimetrična divergenca – eden od genov je podvržen močnejšemu evolucijskemu pritisku in se hitreje spreminja, medtem ko se pri drugem struktura in funkcija ohranita. Pri človeku je bilo največ polimorfizmov posameznih nukleotidov (SNP-jev) identificiranih v genu za μ -opioidni receptor. Zanimivo je, da je pri ribah prišlo do še tretje duplikacije, zato obstaja hipoteza, da imajo nekatere ribe prisotne še dodatne opioidne receptorje [9].

1.3.2. Struktura

V družino opioidnih receptorjev spadajo v grobem μ -, δ - in κ -opioidni receptorji.

δ -opioidni receptorji imajo tipično strukturo GPCR s sedmimi transmembranskimi vijačnicami, intracelularno C-končno in ekstracelularno N-končno domeno.

μ -opioidni receptorji imajo ligand-vezavno mesto je delno lokalizirano na TM segmente in ECL2 (extracellular loop 2). To pomeni, da je ligand po vezavi še vedno izpostavljen zunanosti. To je tudi razlog, zakaj so razpolovne dobe razgradnje ligandov, ki se vežejo na ta receptor relativno kratke (etorfin < 1 min; alvimopan = 30 min). Taka struktura ligand-vezavnega mesta ni prisotna pri večini metabotropnih receptorjih.

Vezava liganda na μ -opioidni receptor je posledica hidrofobnih interakcij in vodikovih vezi (tako z vodo, ki je prisotna v vezavnem žepu, kot s tirozinskimi ostanki [10]).

Pri κ -opioidni receptorju opazimo poleg sedmih tipičnih TM vijačnic še osmo in deveto, ki potekata paralelno z membrano na intracelularni strani. Za razliko od ostalih GPCR,, ki vsebujejo več disulfidnih mostičkov, so pri κ -opioidnem receptorju opazili le en mostiček. Aminokislinska sestava ligand-vezavnega mesta je podobna ostalim opioidnim receptorjem z izjemo štirih ostankov, ki lahko variirajo.

Za GPCR receptorje je značilno ohranjen zaporedje Asp/Glu - Arg - Tyr na citoplazemskem delu TM3. Tvorba solnega mostička med tem argininom in kislo aminokislino na citoplazemskem delu TM6 tvori t.i. ionsko ključavnico, ki stabilizira neaktivno konformacijo receptorja. Pri κ -opioidni receptorju ne najdemo kislih aminokislinskih ostankov na delu TM6, so pa opazili tvorbo vodikove vezi med argininom TM3 in treoninom TM6, ki deluje namesto ionske ključavnice [11].

Pri δ -opioidnem receptorju je struktura podobna. Spet gre za manjše razlike v ligand-vezavnem mestu, ki določajo specifičnost za ligande [12].

1.3.3. Biokemija

Opioidni receptorji spadajo med GPCR-je in delujejo primarno z znotrajceličnimi G-proteini in β -arestini [13]. Receptorji imajo različno selektivnost za posamezne endogene opioidne peptide in tudi opioidna zdravila. Glede na ligand, ki se na receptor veže, se lahko sproži signalna pot preko G-proteinov ali β -arestina. Signalni poti pa sprožita različne fiziološke učinke [14].

Postopek je enak kot opisan v uvodu. Opioidni receptorji delujejo preferenčno z G-proteini G_i/o družine. Ti delujejo inhibitorno in manjšajo količino cAMP-ja, kar zmanjša nadaljne aktivnosti, ki so pogojene z njim. $G\beta\gamma$ pa vplivajo na 3 nadaljne poti: (1) zaprtje kalcijevih kanalčkov, kalcij ne more več vstopiti v celice. (2) odprtje povratnih kanalčkov za kalij

(GIRK), zaradi česar kalij izstopi iz celic. (3) inhibicija SNARE-ov, kar zmanjša presinaptično sproščanje nevrottransmitorjev in vodi v analgezijo. Preklop iz signalizacije z G-proteini na arestine je kontroliran z GRK-ji. Ti fosforilirajo C-konec receptorja in/ali njegove znotrajcelične zanke. β -arestin se veže ob tej fosforilaciji, receptorju takrat upade občutljivost ali se prenese z membrane v notranjost. To uravnava signalizacijo in preprečuje prekomerni celični odziv nanjo. Upad občutljivosti zaradi vezave arestinov poteka z direktno interakcijo z membransko asociiranimi klatrini in klatrinskimi adaptorskimi proteini, kar odstrani receptorje z membrane z internalizacijo. Delujejo tudi kot strukturni stabilizatorji in posredujejo celične signalne poti, kot so na primer zunajcelično signalno regulirane kinaze, ERK, JNK in MAPK. Signaliziranje z G-proteini ali arestini lahko posreduje prekrivajoče ali različne signalne poti [13].

1.3.4. Fiziologija

Fiziološka vloga opioidnih receptorjev je ključna pri uravnavanju bolečine, pa tudi pri drugih procesih v telesu, kot so razpoloženje, dihanje, prebava in nagrajevanje.

Visoko koncentracijo opioidnih receptorjev najdemo tako v centralnem (nevroni locus coeruleus) kot v perifernem živčnem sistemu. Periferni receptorji zaznavajo bolečino, signal zanje pa prenesejo do možganov [15]. Opioidni receptorji se aktivirajo z vezavo endogenih opioidov (npr. endorfini, enkefalini), ki se sproščajo ob stresu, poškodbah ali bolečini [16]. Njihova aktivacija povzroči nastanek inhibitornih impulzov, kar stimulira aktivacijo inhibitornih nevronov. Ti zmanjšajo oz. preprečijo prenos nociceptivnih (bolečinskih) signalov iz periferije do možganov, kar nam olajša bolečino [13],[16]. Bolečino pa lahko lajšamo tudi farmakološko s pomočjo eksogenih opioidov kot so zdravila, droge in sintetične snovi [17]. Med najbolj znanimi agonisti μ -opioidnih receptorjev je morfij (v obliki droge znan tudi kot heroin). Morfij je glavni alkaloid, prisoten v opiju. V medicini velja za enega najmočnejših analgetikov med naravnimi snovmi. Deluje direktno na centralni živčni sistem in povzroča lajšanje bolečine, vendar uporaba predstavlja veliko tveganje za razvoj odvisnosti in tolerance [18]. Ob vezavi na opioidni receptor morfij sproža enake biokemijske procese nagrajevanja, kot pri opravljanju ključnih preživetvenih funkcij, kot je npr. prehranjevanje. Predpisujejo ga kot protibolečinski terapevtik, vendar v primeru da ni prisotne izrazite bolečine, lahko sproži potrebo po jemanju morfija zgolj za užitek. Odvisnost

se razvije v povezavi z nevroni *locus coeruleus* (LC) [19]. Slednji so ključni za proizvodnjo in sproščanje noradrenalina po centralnem živčnem sistemu, kar omogoča uravnavanje budnosti, pozornosti, dihanja in homeostaze ostalih [20]. Ko se opiodi vežejo na receptorje na LC-nevronih, preprečijo sproščanje noradrenalina, kar povzroči upad pozornosti in zmanjšanje frekvence dihanja. Po večkratni uporabi pa se LC-nevroni prilagodijo s povečanim proizvodnjem noradrenalina. Ob prenehanju jemanja opiodov tako oseba lahko začuti odtegnitvene simptome. Zaradi prevelike količine noradrenalina, ki ni uravnan z učinki morfija, namreč čuti anksioznost, mišično krčenje in diarejo [19].

Poleg učinkov na lajšanje bolečine in nagrajevanje, lahko opiodi vplivajo tudi na zmanjšanje stresa in čustvene bolečine [21]. Veliko opiodnih receptorjev najdemo tudi v gastrointestinalnem traktu. Tam vplivajo na zmanjšano mišično krčenje (peristaltiko) in zmanjšano izločanje vode, kar povzroči zaprtost, slabost, bruhanje in bolečine v želodcu [22]. Zmanjšajo lahko tudi občutljivost možganskih centrov za CO₂, kar lahko vodi do depresije dihanja. Slednje je pogost razlog za smrt zaradi prevelikega odmerka opiodov [23].

1.3.5. Patofiziologija

Vloga opiodnih receptorjev pri patofizioloških procesih je pogosto povezana z zasvojenostjo z različnimi stimulantmi, največkrat pa pomislimo na odvisnost z opiat, saj se le-ti vežejo na te receptorje. Zasvojenost z opiat je kronična bolezen možganskega kroga za nagrajevanje, povezana z nenadzorovano potrebo po uporabi opiodnih drog. Celotna kaskada povzroči občutek ugodja, posledično pa posameznik želi ponoviti vedenje, ki ga je pripeljalo do zadovoljitve nagona (pri tem gre za nekakšno učenje navad, ki prinašajo zadovoljstvo) - v primeru zasvojenosti z drogami je to ponoven vnos. Tovrstna bolezen ne povzroča le zdravstvenih težav, temveč ima tudi resne ekonomske in socialne posledice tako na posameznika kot tudi na globalni ravni. Kot omenjeno v poglavju 1.3.3. se zaradi zmanjšane koncentracije Ca²⁺ se inhibira izločanje GABA (tj. inhibitorni nevrottransmitor) v ventralnem tegmentalnem področju, kar privede do dezinhibicije dopaminskih nevronov in poveča se sproščanje dopamina v centru za ugodje (lat. *nucleus accumbens*, občasno tudi akumbens).

Zaradi prekomerne stimulacije (previsokega nivoja opiatov) se število receptorjev zmanjša ali pa se zmanjša njihova občutljivost. Zaradi te adaptacije ima opiat in potem posledično dopamin manjši učinek na sistem nagrajevanja. Pri pogosti uporabi opiatov pride do pojava tolerance. Pri tem potrebuje oseba višji odmerek substance za enak učinek. Če oseba substance ne vzame, se pojavi odtegnitveni sindrom [24]. Pri odvisnosti se povečano stimulirajo predvsem μ opioidni receptorji v striatumu, pri psihostimulantih pa tudi κ receptorji. Podobna aktivacija μ receptorjev se pojavi pri zasvojenosti s hrano (predvsem z živili, bogatimi s sladkorjem ali maščobami) in spolnostjo [26]. Študija *Vucetic et al.* je raziskovala, kako prehrana, bogata z maščobami, ki jo matere uživajo v nosečnosti, vpliva pri potomcih na metilacijo in izražanje genov, ki so povezani z dopaminskimi in opioidnimi signalnimi potmi. Ugotovili so, da v povezavi z opiodi pride do izrazite hipometilacije in posledično povečanega izražanja gena za μ opioidni receptor (*MOR* ali *OPRM1*) in preproenkefalin, ki je eden izmed endogenih opiatnih ligandov. Potomci imajo tako kot matere tudi sami povečano tveganje za debelostjo [27]. Raziskave so pokazale, da ima pri razvoju zasvojenosti vlogo tudi genetika, predvsem preučevane so variacije gena *OPRM1*. Polimorfizem A118G (rs1799971) povzroči izgubo glikozilacijskega mesta na N-koncu ekstracelularne domene μ opioidnega receptorja, kar zmanjša vezavno učinkovitost. Posledično homozigoti GG pogosto potrebujejo več opiata za dosego enakega učinka kot homozigoti AA [28].

1.4. Dopaminski receptor

1.4.1. Evolucija

Dopamin je eden najstarejših nevrottransmiterjev in je tekom evolucije igral pomembno vlogo pri prilagoditvah obnašanja živali. Za njegov učinek je potrebno sočasno izražanje več komponent dopaminskega sistema: encimov za biosintezo dopamina, prenašalnih proteinov za dopamin, encimov za njegovo razgradnjo in dopaminskih receptorjev. Veliko komponent je prisotnih tudi pri drugih monoaminergičnih sistemih (noradrenalinski, serotoninški in histaminski), kar nakazuje na skupen izvor. [29]. Dopaminske receptorje delimo v dve skupini, D1 in D2. Filogenetske raziskave so pokazale, da si ti dve skupini dopaminskih receptorjev nista med seboj sorodni nič bolj, kot sta si sorodni z drugimi monoaminergičnimi

receptorji. Najverjetneje se je zmožnost vezave dopamina med evolucijo neodvisno pojavila dvakrat in sta dve skupini receptorjev rezultat konvergentnega razvoja [30]. Pri vretenčarjih s čeljustjo poznamo tudi več podtipov dopaminskih receptorjev. V skupino D₁ prištevamo podtipe D1A, D1B, D1C, D1D IN D1X. Ti so najverjetneje nastali z duplikacijo genov v zgodnji evoluciji vretenčarjev. Zanimivo je, da imajo sesalci zmanjšano genetsko raznolikost dopaminskih receptorjev kot drugi vretenčarji. D_{1C} in D1D receptorja sta prisotna pri vseh vretenčarjih s čeljustjo razen pri sesalcih, pri katerih sta se najverjetneje izgubila. Med D₂ dopaminske receptorje uvrščamo podtipe D₂, D₃ in D₄. Ti so prisotni pri večini vrst vretenčarjev, zato znanstveniki sklepajo, da so najverjetneje že predniki vretenčarjev s čeljustjo imeli vse tri podtipe. Pri ribah hrustančnicah je tekom evolucije prišlo do dodatnih duplikacij genov, ki pa so precej vrstno specifične. Nekatere ribe imajo tako dva ali tri paraloge genov za receptorja D₂ in D₄ [29].

1.4.2. **Struktura**

Poznamo 2 glavna podtipa dopaminskih receptorjev: D1-podobni receptorji (D1 in D5) ter D2-podobni receptorji (D2, D3 in D4). Podtipa receptorjev se razlikujeta v strukturi. Na N-koncu imata D1 in D5 dve mesti za možno N-glikozilacijo, D2 ima štiri, D3 tri, D4 pa le eno glikozilacijsko mesto. C-končni del je pri D1 in D5 približno 7 krat daljši kot pri ostalih. Pomemben je tudi ohranjen cisteinski ostanek na C koncu. Ta je prisoten pri vseh GPCR-jih. Funkcija tega ostanka je najverjetneje povezana z zasidranjem citoplazemskega repa v membrano. Pri D1 in D5 je ta ostanek na začetku C konca, medtem ko pri ostalih predstavlja zadnji aminokislinski ostanek [31].

1.4.3. Biokemija

Dopaminski receptorji se aktivirajo ob vezavi molekule na specifični membranski receptor. Dopaminergični ligandi pri vezavi ločijo skupini, receptorje znotraj skupine pa vežejo na podoben način s podobnimi afinitetami. So GPCR-ji, z G-proteini interagira regija IL3, to je tretja citoplazemska zanka. Dopaminski receptorji aktivirajo veliko število različnih signalnih poti, najboljše so raziskani učinki, ki jih posredujejo cAMP in Ca^{2+} signalizacija [32]. Skupina D1 veže G α s protein, in ob vezavi dopamina aktivira adenilat ciklazo, ki sintetizira cAMP. Obratno pa D2 skupina veže G α i/o protein in ob vezavi dopamina inhibira adenilat ciklazo in proizvodna cAMP je zmanjšana. Navzdoljnji učinki so odvisni od tega, ali se veže G α ali G $\beta\gamma$ podenota [33]. Obe skupini imata na C-koncu fosforilacijska in palmitoilacijska mesta, ki so najverjetneje vključena v upad občutljivosti receptorja [32].

1.4.4. Fiziologija

Dopaminski receptorji vplivajo na številne nevrološke, čustvene, endokrine in motorične funkcije. Aktivirajo se ob vezavi dopamina, nevrottransmitterja, ki se tvori v *substantii nigri*. Izražajo se predvsem na območju centralnega živčnega sistema in v ganglijih. Poznamo 5 različnih dopaminskih receptorjev (D1, D2, D3, D4, D5). Vsak od njih ima drugačno funkcijo in ga najdemo na drugi lokaciji [34].

Ena pomembnih funkcij je uravnavanje prostovoljnega gibanja. Pri tem sodelujejo receptorji D1, D2 in D3. Pri tem sta D1 in D2 ključna za stimulacijo gibanja, D3 pa njuno delovanje inhibira. Na ta način lahko omogočajo usklajenost gibanja.

Dopamin je ključen tudi pri učenju in spominu. Aktivacija D1, D2 in D5 receptorjev z dopaminom dokazano izboljša pomnjenje in spomin. Omogoča tudi regulacijo pozornosti in sprejemanja odločitev [35].

Dopamin ima tudi vlogo pri uravnavanju počutja in čustvovanja. V primeru neravnovesja lahko predstavlja izhodišče za številne nevrološke bolezni [36]. Na samo čustvovanje vpliva tudi prek delovanja na cirkadiani ritem, ki uravnava delovanje organizmov, da se v roku 24-ur primerno odzovejo na signale iz okolice v skladu s sončnim vzhodom in zahodom. Neravnovesje cirkadianega ritma je pogosto razlog za razvoj psiholoških in nevrodegenerativnih bolezni [37].

Predvsem receptorji D2 pa so pomembni tudi za endokrino regulacijo oz. regulacijo hormonskega sistema, zlasti preko hipotalamusno-hipofizne osi. Dopamin vpliva na izločanje prolaktina, ravnega hormona, TSH, LH in FSH. Vpliva lahko tudi na odziv telesa na stres prek uravnavanja kortizola [35],[38]. D2-receptorji pa imajo vlogo tudi pri uravnavanju oz. inhibiciji pretirane intenzitete vonja, preden signal za določen vonj doseže možgane [39].

1.4.5. Patofiziologija

Tako kot pri opioidnem receptorju je tudi dopaminski receptor povezan z nastankom odvisnosti. Anatomsko najpomembnejšo vlogo ima mezolimbični dopaminski sistem. Ko se sistem aktivira, pride do sproščanja dopamina v dopaminski sinapsi - presinaptični nevroni imajo aksone v akumbensu, kjer tvorijo dopaminsko sinapso. Na postsinaptičnem nevronu so prisotni dopaminski receptorji tipa D1 in D2. Ker ima D2 višjo afiniteto vezave za dopamin, je tudi pomembnejši pri zasvojenosti. Njegova površinska ekspresija se zaradi pogoste prisotnosti dopamina zmanjša. Če potencirane navade ostanejo močne, dolgoročno zmanjšanje izražanja dopaminskih receptorjev povzroči zmanjšano občutljivost na vrsto nagrajevalnih dražljajev, ki še niso bili potencirani kot del ustaljenih navad [40]. Neustrezno ravnovesje dopamina, bodisi prevelika, bodisi premajhna količina, je vpleteno v tudi številna druga bolezenska stanja. Ena izmed strategij terapije za regulacijo koncentracije dopamina se lahko kot tarčo uporabi tudi dopaminske receptorje, predvsem D2.

Pri Parkinsonovi bolezni, kjer je zmanjšana količina dopamina v *substantii nigri*, se to izkaže kot tremor, bradikinezija, nestabilna drža. Eden izmed agonistov D2 receptorja je bromokriptin. Po drugi strani se pri shizofreniji poveča aktivnost dopamina in posledično pride do pojava večjega števila receptorjev. Pravtako pride tudi do strukturnih sprememb receptorjev; raziskave so pokazale, da se pri shizofreniji poveča delež monomernih oblik D2 receptorjev, kar lahko vpliva na vezavo določenih ligandov in posledično na delovanje dopaminskega sistema.

Prva generacija antipsihotikov so za tarčo prav tako vzeli D2. Tipični antipsihotiki se delijo na visoko in nizko potentne glede na njihovo zmožnost vezanja na receptorje in ne na samo učinkovitost. Velika večina deluje relativno nespecifično in se povezujejo tudi z drugimi receptorji, predvsem D5 in D3 [34].

2. Tirozin kinazni receptorji

2.1. Evolucija

Tirozin kinazni receptorji so za živali specifični transmembranski receptorji, ki nadzorujejo številne celične procese (na primer celična delitev, migracija, preživetje, proliferacija in diferenciacija). Prvi tirozin kinazni receptorji so najverjetneje nastali s fuzijo epidermalnemu rastnemu faktorju podobne domene in citoplazemske tirozinske kinaze že pred pojavom živali. Število in raznolikost genov za tirozin kinazne receptorje se je tekom evolucije živali močno povečalo [41]. Glavni mehanizem evolucije tirozin kinaznih receptorjev so najverjetneje duplikacije celotnega genoma, ki so se zgodile med evolucijo živali. Zaradi tretje genomske duplikacij pri ribah hrustančnicah, imajo te več genov za tirozin kinazne receptorje kot druge živalske vrste. Raznolikost tirozin kinaznih receptorjev vretenčarjev se je še povečala kot posledica duplikacij posameznih genov [42]. Temu so bili še posebej podvrženi ephrinski receptorji, ki predstavljajo najštevilčnejšo podskupino tirozin kinaznih receptorjev pri vretenčarjih [41].

2.2. Biokemija

V splošnem vezava rastnih faktorjev na tirozin kinazne receptorje (RTK) sproži dimerizacijo njihovih zunajceličnih predelov. Bivalentni ligand, ki je ponavadi prav tako dimer, interagira hkrati z dvema receptorskima molekulama in ju prečno poveže v dimerni kompleks. Lahko pa je receptor že dimeriziran in vezava liganda povzroči strukturne spremembe v receptorju, ki aktivirajo tirozin kinazno aktivnost in celično signaliziranje.

Dimerizacija zunajceličnih predelov receptorja aktivira znotrajcelične tirozin kinazne domene. Mehanizmi aktivacije so med receptorji zelo različni in receptorji se strukturno zelo razlikujejo v neaktivnem stanju, kar jim daje različne regulatorne mehanizme. Vse tirozin kinazne domene (TKD) imajo N in C-predel. Regulatorni predeli kot so aktivacijska zanka, vijačnica αC in kinazni N-predel zavzamejo specifično konfiguracijo v vseh TKD, ki je potrebna za katalizo prenosa fosfatne skupine. Posamezna TKD je unikatno avtoinhibirana z intramolekularnimi interakcijami, specifičnimi za določen receptor. Ko se avtoinhibicija prekine ob vezavi liganda (in dimerizaciji) se RTK aktivira [43].

2.3. Inzulinski receptor

2.3.1. Evolucija

Inzulin je ključen za uravnavanje koncentracije glukoze v krvi vretenčarjev. Tudi pri drugih živalskih vrstah (na primer insektih in črvih) najdemo inzulinu sorodne peptide, ki imajo različne funkcije. V človeškem genomu je poleg gena za inzulin prisotnih še devet drugih genov, ki kodirajo inzulinu podobne peptide. [44]. Čeprav pri nevretenčarjih obstaja več inzulinu podobnih peptidov, je do zdaj znan zgolj en inzulinski receptor. Pri vretenčarjih poznamo tri receptorje, ki lahko z visoko afiniteto vežejo inzulin in IGF. To so IR, IGF1R ter IGF2R. Slednji je primarno receptor za manozo-6-fosfat, ki je pri sesalcih pridobil domeno za vezavo IGF2 in ne sodeluje v celičnem signaliziranju. Na podlagi strukturne podobnosti je bil identificiran še receptor IRR (insulin receptor-related receptor), ki pa nima znanega liganda. Receptorji IR, IGF1R in IRR imajo relativno visoko ohranjeno strukturo. Trije paralogni geni (*Ir*, *Igflr* in *Irr*) so najverjetneje nastali z dvema duplikacijama med evolucijo vretenčarjev. Prva duplikacija je dala gen za IR receptor ter predhodnik genov za receptorja IGF1R in IRR, ki pa sta nastala z drugo duplikacijo. Pri ribah hrustančnicah je najverjetneje prišlo do dodatne duplikacije; nekatere vrste imajo namreč po dve kopiji *Ir* in *Igflr* genov [45].

2.3.2. Struktura

Zapis za inzulinski receptor se nahaja na eksonu 11, ki kodira 12 aminokislin dolgo zaporedje, ki se lahko alternativno izreže, kar rezultira kot A in B izooblika. B izooblika ima na C-koncu α -podenote dodatnih 12 aminokislin.. Obe obliki pa imata strukturo $(\alpha\beta)_2$. α -podenota je v celoti ekstracelularna. N-končna domena α -podenote je sestavljena iz dveh homolognih globularnih domen L1 in L2, med njima pa je regija, bogata s cisteini (CR), ki ojača dimerizacijo.. Sledita dve fibronektinski domeni tipa III (FnIII). V FnIII 2 je 120 aminokislinskih ostankov – insercijska domena.

β -podenota je krajša in je sestavljena iz ID- β in FnIII 3 na zunajceličnem delu, temu pa sledi TM domena in znotrajcelična tirozin-kinazna domena ter C-konec. Podenoti se v funkcionalni receptor povežeta preko disulfidnih mostičkov [46].

2.3.3. Biokemija

Receptor za inzulin spada med RTK. Ena molekula inzulina se veže na receptorski dimer z visoko afiniteto, nadaljnje molekule pa z manjšo. Receptor ima tipično strukturo za RTK in je avtoinhibiran z aktivacijsko zanko, ki deluje kot pseudosubstrat in zaseda aktivno mesto. Ob vezavi liganda se sproži konformacijska sprememba transmembranskih predelov, saj se prekine L1-FnIII 2'-3' interakcija, ki stabilizira ločeni TM domeni. Te se zarotirajo, zbližajo in s tem premaknejo znotrajcelične domene in inhibicija se prekine. Takrat se avtofosforilirajo kinazne domene. Ob tej trifosforilaciji aktivacijske zanke kinaza fosforilira tirozinske ostanke zunaj kinazne domene, kar ustvari vezavna mesta za ligande z domenami SH2 (*angl. src-homology 2*) ali PTB (*angl. phosphotyrosine-binding*). Za razliko od drugih RTK, ta receptor ne veže peptidnega hormona inzulina direktno, pač pa posredno preko fosforiliranega tirozinskega ostanka v bližnji domeni signalnih adaptorskih proteinov IRS (*angl. insulin receptor substrate*). Ti tvorijo jedro signalizacijskega delca. Nadaljnje se ob njegovi vezavi na RTK sprožajo PI3K, MAPK-ERK in druge signalne poti [46].

2.3.4. Fiziologija

Inzulinski receptor igra ključno vlogo pri uravnavanju glukoze v krvi, metabolizmu, celični rasti in preživetju. Aktiviran je prek vezave inzulina, polipeptidnega hormona, ki se proizvaja v pankreasu v betacelicah. Ko inzulin vstopi v kri poskrbi za homeostazo glukoze s tem da spodbudi celice, da sprejmejo glukozo iz krvi. To so predvsem celice skeletnih mišic, jeter in maščobnega tkiva. Ob vezavi na inzulinski receptor pride do translokacije glukoznega transporterja GLUT4 na celično membrano, kar olajša prehod glukoze v celice [47]. Inzulin prek te signalne poti vpliva tudi na regulacijo metabolizma ogljikovih hidratov, saj spodbudi sintezo glikogena prek aktivacije glikogen sintaze. Inhibira glukoneogenezo in glikogenolizo v jetrih, s čemer učinkovito zmanjša koncentracijo glukoze v krvi.

Stimulira tudi lipogenezo v maščobnem tkivu. Hkrati pa inhibira lipolizo z inhibicijo lipaze, kar telesu omogoča, da shrani energijo, ko je v telesu na voljo veliko glukoze oz. energije. Prav tako spodbuja vnos aminokislin v celice in sintezo proteinov, inhibira pa razgradnjo proteinov, kar omogoča rast in obnovo tkiv.

Tudi v splošnem spodbuja celično rast in diferenciacijo z aktivacijo signalnih poti kot so PI3K/AKT in MAPK. Slednje regulirajo celično proliferacijo, rast in preživetje. Posebno v

primeru metabolnega stresa, signalizacija z inzulinom pripomore pri obvarovanju celic pred programirano celično smrtjo (apoptozo).

V centralnem živčnem sistemu inzulinski receptorji regulirajo apetit, učenje in spomin. Nepravilno inzulinsko signaliziranje v možganih povezujemo s kognitivnim upadom in razvojem nevrodegenerativnih bolezni [48],[49].

2.3.5. Patofiziologija

V 70. letih so odkrili, da se sladkorna bolezen lahko pojavi kljub prisotnosti insulina, kar je ovrglo prejšnje domneve, da je vzrok zgolj pomanjkanje tega hormona (kot pri tipu 1). Ključno je bilo namreč odkritje, da inzulinski receptor deluje kot tirozin kinaza, kar je omogočilo nadaljnje raziskave signalnih poti.

Pri sladkorni bolezni tipa 2, govorimo o diabetesu, ki je neodvisen od insulina. Pri tem gre za to, da se inzulin normalno veže na receptor, vendar je nadaljnjo signaliziranje moteno. Ker GLUT4 ne dobi signala za translokacijo na membrano, celica sladkorja ne privzame, sama koncentracija glukoze pa se poveča. Disregulacija signalne poti PI3K/Akt vodi tako v nastanek odpornosti na inzulin. Na občutljivost celic na inzulin vpliva več dejavnikov, med katerimi imajo pomembno vlogo metaboliti, nastali med lipolizo, kot so ceramidi in diacilgliceroli (DAG) [50].

Ceramidi zavirajo signalno pot Akt z aktivacijo proteinske fosfataze 2A (PP2A), medtem ko DAG pa aktivirajo protein kinazo C (PKC), ki zavira signalno pot s povečano serinsko/treoninsko fosforilacijo. Bolezen je lahko genetsko pogojena in/ali pa posledica prekomerne telesne teže v povezavi z nezdravim življenjskim slogom. Odpornost na inzulin pa se ne pojavi zgolj pri sladkorni bolezni tipa 2, temveč tudi pri kardiovaskularni bolezni, sindromu policističnih jajčnikov (PCOS) in pri nealkoholni zamaščenosti jeter [51].

VIRI

- [1] R. Milner, C. Doherty: Pathophysiology of Pain in the Peripheral Nervous System. *Nerves and Nerve Injuries: Pain, Treatment, Injury, Disease and Future Directions: Vol 2* 2015, 2, 3–22.
- [2] A. De Mendoza, A. Sebé-Pedrós, I. Ruiz-Trillo: The Evolution of the GPCR Signaling System in Eukaryotes: Modularity, Conservation, and the Transition to Metazoan Multicellularity. *Genome Biol Evol* 2014, 6, 606–619.
- [3] J. M. Bécu, J. Pelé, P. Rodien, H. Abdi, M. Chabbert: Structural Evolution of G-Protein-Coupled Receptors: A Sequence Space Approach. *Methods Enzymol* 2013, 520, 49–66.
- [4] V. Syrovatkina, K. O. Alegre, R. Dey, X. Y. Huang: Regulation, Signaling, and Physiological Functions of G-Proteins. *J Mol Biol* 2016, 428, 3850–3868.
- [5] S. Rehman, N. Rahimi, M. Dimri: Biochemistry, G Protein Coupled Receptors. *StatPearls* 2023.
- [6] N. R. Latorraca, A. J. Venkatakrishnan, R. O. Dror: GPCR dynamics: Structures in motion. *Chem Rev* 2017, 117, 139–155.
- [7] J. L. Bos, H. Rehmann, A. Wittinghofer: GEFs and GAPs: Critical Elements in the Control of Small G Proteins. *Cell* 2007, 129, 865–877.
- [8] S. Dreborg, G. Sundström, T. A. Larsson, D. Larhammar: Evolution of vertebrate opioid receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, 105, 15487–15492.
- [9] C. W. Stevens: The evolution of vertebrate opioid receptors. *Frontiers in Bioscience* 2009, 14, 1247–1269.
- [10] A. Manglik, A. C. Kruse, T. S. Kobilka, F. S. Thian, J. M. Mathiesen, R. K. Sunahara, L. Pardo, W. I. Weis, B. K. Kobilka, S. Granier: Crystal structure of the μ -opioid receptor bound to a morphinan antagonist. *Nature* 2012 485:7398 2012, 485, 321–326.
- [11] H. Wu, D. Wacker, M. Mileni, V. Katritch, G. W. Han, E. Vardy, W. Liu, A. A. Thompson, X. P. Huang, F. I. Carroll, et al.: Structure of the human κ -opioid receptor in complex with JDTic. *Nature* 2012 485:7398 2012, 485, 327–332.
- [12] S. Granier, A. Manglik, A. C. Kruse, T. S. Kobilka, F. S. Thian, W. I. Weis, B. K. Kobilka: Structure of the δ -opioid receptor bound to naltrindole. *Nature* 2012 485:7398 2012, 485, 400–404.

- [13] T. Che, B. L. Roth: Molecular basis of opioid receptor signaling. *Cell* 2023, 186, 5203–5219.
- [14] R. J. Valentino, N. D. Volkow: Untangling the complexity of opioid receptor function. *Neuropsychopharmacology* 2018 43:13 2018, 43, 2514–2520.
- [15] A. Dhaliwal, M. Gupta: Physiology, Opioid Receptor. *StatPearls* 2023.
- [16] J. McDonald Bsc, D. G. Lambert: Cellular mechanisms of action. *Continuing Education in Anaesthesia Critical Care & Pain* 2005, 5, 22–25.
- [17] MedenoSrce - Farmakoterapija bolečine
<https://www.medenosrce.net/predmeti/farmakologija/213-seminarji/441-farmakoterapija-bolecine> (accessed May 5, 2025).
- [18] T. Gelbrich, D. E. Braun, U. J. Griesser: Stable polymorph of morphine. *Acta Crystallogr Sect E Struct Rep Online* 2013, 69.
- [19] T. R. Kosten, T. P. George: The Neurobiology of Opioid Dependence: Implications for Treatment. *Sci Pract Perspect* 2002, 1, 13.
- [20] E. E. Benarroch: Locus coeruleus. *Cell and Tissue Research* 2017 373:1 2017, 373, 221–232.
- [21] P. E. Lutz, B. L. Kieffer: Opioid receptors: distinct roles in mood disorders. *Trends Neurosci* 2013, 36, 195–206.
- [22] M. Sobczak, M. Sałaga, M. A. Storr, J. Fichna: Physiology, signaling, and pharmacology of opioid receptors and their ligands in the gastrointestinal tract: Current concepts and future perspectives. *J Gastroenterol* 2014, 49, 24–45.
- [23] K. T. S. Pattinson: Opioids and the control of respiration. *Br J Anaesth* 2008, 100, 747–758.
- [24] Zapiski Patološka Fiziologija, UL MF.
- [25] C. M. Olsen: Natural Rewards, Neuroplasticity, and Non-Drug Addictions. *Neuropharmacology* 2011, 61, 1109.
- [26] Z. Vucetic, J. Kimmel, K. Totoki, E. Hollenbeck, T. M. Reyes: Maternal High-Fat Diet Alters Methylation and Gene Expression of Dopamine and Opioid-Related Genes. *Endocrinology* 2010, 151, 4756.
- [27] M. Bonenberger, P. L. Plener, R. C. Groschwitz, G. Grön, B. Abler: Polymorphism in the μ -opioid receptor gene (OPRM1) modulates neural processing of physical pain, social rejection and error processing. *Exp Brain Res* 2015, 233, 2517–2526.

- [28] K. Yamamoto, P. Vernier: The evolution of dopamine systems in chordates. *Front Neuroanat* 2011, 5, 1.
- [29] K. Yamamoto, O. Mirabeau, C. Bureau, M. Blin, S. Michon-Coudouel, M. Demarque, P. Vernier: Evolution of Dopamine Receptor Genes of the D1 Class in Vertebrates. *Mol Biol Evol* 2013, 30, 833–843.
- [30] C. Missale, S. Russel Nash, S. W. Robinson, M. Jaber, M. G. Caron: Dopamine receptors: From structure to function. *Physiol Rev* 1998, 78, 189–225.
- [31] D. Vallone, R. Picetti, E. Borrelli: Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci Biobehav Rev* 2000, 24, 125–132.
- [32] J. A. Bibb: Decoding Dopamine Signaling. *Cell* 2005, 122, 153–155.
- [33] A. Bhatia, J. R. Lenchner, A. Saadabadi: Biochemistry, Dopamine Receptors. *StatPearls* 2023.
- [34] C. Missale, S. Russel Nash, S. W. Robinson, M. Jaber, M. G. Caron: Dopamine receptors: From structure to function. *Physiol Rev* 1998, 78, 189–225.
- [35] P. Salgado-Pineda, P. Delaveau, O. Blin, A. Nieoullon: Dopaminergic contribution to the regulation of emotional perception. *Clin Neuropharmacol* 2005, 28, 228–237.
- [36] J. Kim, S. Jang, H. K. Choe, S. Chung, G. H. Son, K. Kim: Implications of Circadian Rhythm in Dopamine and Mood Regulation. *Mol Cells* 2017, 40, 450–456.
- [37] R. Pivonello, D. Ferone, G. Lombardi, A. Colao, S. W. J. Lamberts, L. J. Hofland: Novel insights in dopamine receptor physiology. *Eur J Endocrinol* 2007, 156, S13–S21.
- [38] H. Q. Zhou, L. J. Zhuang, H. Q. Bao, S. J. Li, F. Y. Dai, P. Wang, Q. Li, D. M. Yin: Olfactory regulation by dopamine and DRD2 receptor in the nose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2022, 119, e2118570119.
- [39] R. A. Wise, M. A. Robble: Dopamine and addiction. *Annu Rev Psychol* 2020, 71, 79–106.
- [40] J. Grassot, M. Gouy, G. Perrière, G. Mouchiroud: Origin and Molecular Evolution of Receptor Tyrosine Kinases with Immunoglobulin-Like Domains. *Mol Biol Evol* 2006, 23, 1232–1241.
- [41] F. G. Brunet, J. N. Volff, M. Schartl: Whole Genome Duplications Shaped the Receptor Tyrosine Kinase Repertoire of Jawed Vertebrates. *Genome Biol Evol* 2016, 8, 1600–1613.
- [42] M. A. Lemmon, J. Schlessinger: Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2010, 141, 1117–1134.

- [43] D. M. Irwin: Evolution of the Insulin Gene: Changes in Gene Number, Sequence, and Processing. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2021, 12, 649255.
- [44] C. Hernández-Sánchez, A. Mansilla, F. De Pablo, R. Zardoya: Evolution of the Insulin Receptor Family and Receptor Isoform Expression in Vertebrates. *Mol Biol Evol* 2008, 25, 1043–1053.
- [45] P. De Meyts: The Insulin Receptor and Its Signal Transduction Network. *Endotext* 2016.
- [46] J. Lee, P. F. Pilch: The insulin receptor: structure, function, and signaling. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1994.266.2.C319> 1994, 266.
- [47] E. Choi, C. Duan, X. C. Bai: Regulation and function of insulin and insulin-like growth factor receptor signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2025 2025, 1–23.
- [48] E. Vargas, N. V. Joy, M. A. C. Sepulveda: Biochemistry, Insulin Metabolic Effects. *StatPearls* 2022.
- [49] T. M. Batista, N. Haider, C. R. Kahn: Defining the underlying defect in insulin action in type 2 diabetes. *Diabetologia* 2021 64:5 2021, 64, 994–1006.
- [50] R. Y. Elkanawati, S. A. Sumiwi, J. Levita: Impact of Lipids on Insulin Resistance: Insights from Human and Animal Studies. *Drug Des Devel Ther* 2024, 18, 3337.