

**Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze**

Katedra fyziologie živočichů

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Metabotropní glutamátové receptory a percepce bolesti

**BACHELOR THESIS**

Role of metabotropic glutamate receptors in pain and nociception

Helena Jindrová

Školitel:

Doc. MUDr. Miloslav Franěk, PhD.

Praha 2010

1 Abstrakt.....	2
2 Abstract.....	3
3 Seznam použitých zkratk.....	4
4 Zařazení metabotropních glutamátových receptorů.....	5
4.1 Receptory spřažené s G proteiny.....	5
4.2 Mechanismus účinku G proteinů.....	6
5 Metabotropní glutamátové receptory.....	7
5.1 I. skupina mGluRs.....	7
5.2 II. skupina mGluRs.....	8
6 Metabotropní glutamátové receptory a bolest.....	9
6.1 I. skupina mGluRs.....	9
6.2 II. skupina mGluRs.....	11
6.3 III. skupina mGluRs.....	12
7 Závěr.....	14
8 Použitá literatura.....	15

## **1 Abstrakt**

Tato práce obsahuje stručný úvod do problematiky receptorů spřažených s G-proteinem, a poté se zaměřuje na členy 3. rodiny GPCRs, na metabotropní glutamátové receptory. Shrnuje současné vědomosti o transdukčním mechanismu těchto receptorů, a klade důraz na jejich roli v regulaci přenosu bolestivého signálu.

### **Klíčová slova**

Bolest, Glutamát, GPCR, Hyperalgesie, Allodynie, Zánět

## **2 Abstract**

This thesis contains brief introduction into G-protein coupled receptors, and then focuses on members of family 3 GPCRs, on metabotropic glutamate receptors. Current knowledge about transduction mechanism of these receptors is summarized, and major emphasis is put on their role in regulating nociceptive transmission.

### **Keywords**

Pain, Glutamate, GPCR, Hyperalgesia, Allodynia, Inflammation

### 3 Seznam použitých zkratek

4C3HPG	4-karboxy-3-hydroxyfenylglycin
4CPG	4-karboxyfenylglycin
ADPC	aminopyrrolidin-2,4-dikarboxylát
AIDA	1-amino-2,3-dihydro-1H-inden-1,5-dikarboxylová kyselina
CPCOOEt	ethylester 7-hydroxyiminocyklopropanchromen-1 $\alpha$ -karboxylové kyseliny
DCPG	3,4-dikarboxyfenylglycin
DHPG	3,5-dihydroxyfenylglycin
GPCRs	proteiny spřažené s G proteiny
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
GDP	guanosindifosfát
GTP	guanosintrifosfát
HDAC	histon deacetyláza
L-AP4	L-2-amino-4-fosfobutanová kyselina
LCCG1	L-(karboxycyklopropyl)-glycin
mGluRs	metabotropní glutamátové receptory
MPEP	2-methyl-6-(fenylethynyl)-pyridin
MSOP	$\alpha$ -methylserin-O-fosfát
PKC	proteinkináza C

## 4 Zařazení metabotropních glutamátových receptorů

### 4.1 Receptory spřažené s G proteiny

Metabotropní receptory jsou receptory eukaryotních buněk, které jsou s efekty spojeny nepřímo přes heterotrimerní G protein (Wettschureck 2005). Je to zřejmě nejpočetnější třída receptorů; savčí genom jich kóduje přes 1 000. Aktivita buňky je zde ovlivňována nepřímo (narozdíl od receptorů ionotropních, kde je iontový kanál součástí samotného receptoru), napřed jsou vyvolány metabolické změny. G protein přenáší signál na membránový efektor, což je buďto iontový kanál, nebo enzym tvořící second messengers.

Metabotropní receptory se dělí do tří základních rodin, které mohou být snadno rozlišeny podle sekvenční podobnosti, zatímco mezi jednotlivými rodinami žádná podobnost není (Bockaert 1999). Zdá se tedy, že se jedná o případ molekulární konvergence.

#### 1. rodina

**Podrodina 1a** – tyto receptory jsou aktivovány malými molekulami (např. katecholaminy), které se váží do dutiny tvořené transmembránovými segmenty III-VI. V případě rhodopsinu je retinal kovalentně spojen s touto dutinou.

Receptory **podrodiny 1b** jsou aktivovány krátkými peptidy, které interagují s N-koncovou doménou a s extracelulárními klíčkami.

**Podrodina 1c** je aktivována velkými glykoproteiny, které se váží na dlouhou N-terminální doménu a také interagují s první a třetí extracelulární klíčkou.

#### 2. rodina

Receptory 2. rodiny jsou aktivovány velkými peptidy (například glukagon a sekretin) a jejich vazby se účastní také relativně dlouhá N-koncová doména.

#### 3. rodina

Vazebné místo 3. rodiny tvoří takzvaná Venus Flytrap doména, tvořena dvěma listy spojenými pantem, které se mohou uzavírat, čímž připomínají stejnojmennou masožravou rostlinu. Tato doména je umístěna na konci

dlouhého N-terminálního řetězce.

## **4.2 Mechanismus účinku G proteinů**

Aktivace receptoru (např. vazbou endogenního ligandu) změní jeho konformaci a umožní mu navázat G protein přes  $G\alpha$  podjednotku (Wettschureck 2005). Heterotrimerní G protein je tvořen třemi podjednotkami:  $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$ . Vazba na aktivovaný receptor umožní výměnu GDP za GTP;  $\alpha$  podjednotka s navázaným GTP disociuje od komplexu  $\beta\gamma$  a přenáší signál na efektor.  $G\alpha$  podjednotka má GTP-azovou aktivitu, takže aktivní  $G\alpha$ GTP stav po minutách končí; tento proces je urychlen vazbou na efektor. Efektor tedy působí jako GTPase-activating protein. Vzniklá  $G\alpha$ GTP rychle reasociuje s  $G\beta\gamma$  a systém je připraven k opakování procesu signalizace. Pro dlouhou aktivaci efektorů je nutné stálé aktivování receptorů.

## 5 Metabotropní glutamátové receptory

Metabotropní glutamátové receptory patří do 3. rodiny metabotropních receptorů, kam také patří Ca-senzitivní receptory, feromonové receptory, chuťové receptory a GABA-B receptor (Pin 2002). Je známo osm genů kódujících mGluRs, z nichž některé mají navíc různé splice varianty. mGluRs byly rozděleny do tří skupin na základě podobnosti sekvencí, transdukčního mechanismu a farmakologie. Podobnost sekvencí je 60-70% mezi členy jedné skupiny, a 40-45% mezi členy jiných skupin. Receptory I. skupiny jsou spojeny s Gq proteinem, receptory II. a III. skupiny jsou spojeny s G proteiny citlivými k pertusis toxinu (Gi nebo Go protein).

Do I. skupiny patří mGluR1 (splice varianty a, b, c, d, e) a mGluR5 (splice varianty a, b). Do II. skupiny patří mGluR2 a mGluR3. Ostatní receptory patří do III. skupiny, která se skládá z mGluR4 (splice varianty a, b), mGluR6, mGluR7 (splice varianty a, b) a mGluR8 (splice varianty a, b, c).

### 5.1 I. skupina mGluRs

Receptory I. skupiny aktivují G-protein třídy Gq, jehož hlavním efektem je fosfolipáza C, která po aktivaci vytváří druhé posly – inositol trifosfát a diacylglycerol. Aktivace IP3 receptorů na endoplasmatickém retikulu vede k výlevu Ca<sup>2+</sup> z intracelulárních zásob.

Tato dráha je citlivá na PKC dependentní fosforylaci těchto receptorů, na které závisí zda budou aktivovat nebo inhibovat uvolnění neurotransmiteru, případně hyperpolarizovat či depolarizovat neurony. Obecně jsou tyto receptory považovány za aktivační.

mGluRs I. skupiny regulují mnoho iontových kanálů v neuronech, jednak řadu K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> a neselektivních kationtových kanálů, stejně jako NMDA a AMPA receptory. Vylití Ca<sup>2+</sup> zprostředkované IP3 může aktivovat Ca<sup>2+</sup> aktivované K<sup>+</sup> kanály, což vede k hyperpolarizaci neuronů.

Spojení této skupiny s kationtovými neselektivními kanály je G-protein nezávislé, což je jeden z mála příkladů G-protein nezávislé kaskády ovládané



heptahelickým receptorem. Tato kaskáda zahrnuje aktivaci Src-like protein tyrosin kináz.

## **5.2 II. skupina mGluRs**

Receptory obou těchto skupin jsou spojeny s pertusis toxin sensitivními G-proteiny  $G_i$  nebo  $G_o$ . Jejich stimulace způsobuje inhibici adenylyl cyklázy a modulaci aktivity iontových kanálů, přesněji inhibici specifických typů  $Ca^{2+}$  kanálů v neuronech. Specifity je dosaženo regulací pomocí PKC a PKA. Následkem této modulace je inhibice uvolnění transmiterů do synaptické štěrbiny. Receptory těchto skupin jsou obecně vzato inhibiční.

Výjimku tvoří mGluR6, které se vyskytují výhradně v bipolárních buňkách sítnice. Tyto receptory aktivují fosfodiesterasu, která hydrolyzuje cGMP, což vede k uzavření cGMP aktivovaného kationtového kanálu a snížení vodivosti buněčné membrány. Tato kaskáda se podobá kaskádě aktivované rodopsinem. (Pin 2002)

## 6 Metabotropní glutamátové receptory a bolest

### 6.1 I. skupina mGluRs

Důležitou vlastností analgetik je, zda se jejich cíl účastní vnímání **akutní bolesti**, tedy bolesti užitečné, sloužící k ochraně před poškozením (Varney 2002). Ideální analgetikum účinkuje proti patologické hypersensitivitě, ale nenarušuje vnímání akutní bolesti. Jelikož mGluRs spíše modulují než zprostředkovávají synaptický přenos, tak by z tohoto hlediska mohly být velmi zajímavé.

Bylo zjištěno, že (S)-CHPG, antagonist mGluRs I. skupiny, je schopný snížit citlivost k mechanické i tepelné bolestivé stimulaci jak u zdravých potkanů, tak u potkanů s indukovaným (carrageenan) zánětem (Young 1997). Pokles citlivosti k bolestivé stimulaci byl prokázán také u AIDA (selektivní antagonist mGluR1) a CPCCOEt (antagonista I. skupiny) (Neugebauer 1999). Také redukce počtu mGluR1 (nikoli však mGluR5) pomocí antisense oligonukleotidů vedla k analgesii (Young 1998).

Při behaviorálních testech MPEP (selektivní antagonist mGluR5) nebyl zjištěn žádný efekt na normální vnímání bolesti, zatímco stejné dávky účinkovaly proti patologické hyperalgesii (Walker 2001a).

Zdá se tedy, že z receptorů I. skupiny se vnímání akutní bolesti účastní spíše mGluR1.

V **zánětlivé bolesti** hrají mGluRs I prokazatelně důležitou roli. Jejich antagonisté mají dobré antinocicepční účinky – lze je užít nejen pro prevenci, ale i pro léčbu zánětlivé hyperalgesie (Bhave 2001). Pro studium zánětlivé bolesti se s oblibou používá formalinový test, protože během jediného experimentu lze zkoumat jak rozvoj akutní bolesti (první fáze testu), tak i rozvoj zánětlivé bolesti (druhá fáze testu). Již před delší dobou bylo potvrzeno, že použití antagonistů I. skupiny (4CPG nebo 4C3HPG) bolest ve druhé fázi utlumuje, zatímco použití agonisty I. skupiny (DHPG) bolest v téže fázi prohlubuje (Fisher 1996).

Při zkoumání orofaciální alodynies vyvolané subkutánním podáním interleukinu 1 $\beta$  byly zjištěny pozitivní antinocicepční účinky jak u MPEP (specifický antagonist mGluR5), tak u LY367385 a CPCCOEt (specifický antagonist mGluR1) (Ahn 2005).

Naopak u zánětu vyvolaného hořčičným olejem (esenciální olej z hořčičných semínek, obsahující allyl-isothiokyanát) podaným intramuskulárně byly zaznamenány účinky pouze u antagonisty mGluR5 a u neselektivního antagonisty I. a II. skupiny, nikoli u antagonisty mGluR1 (Lee 2006). Blokace mGluR5 navíc zmenšila i zánět jako takový, což bylo zjištěno extravazací Evansovy modři z plazmy. U tohoto typu bolesti se tedy role mGluRs liší u různých vyvolávacích mechanismů.

V nesouladu s dosavadními výsledky jsou pokusy se včelím jedem (Chen 2010). Tento model je zajímavý v tom, že narozdíl od všech dosavadních modelů lze během jediného experimentu sledovat spontánní nocicepci, tepelnou a mechanickou hyperalgesii i zánětlivé reakce (např. zčervenání a otok). V těchto pokusech neměl AIDA (antagonista obou receptorů I. skupiny) na hyperalgesii signifikantní vliv, stejně jako neměl vliv na vlastní zánět. Tato zajímavá neshoda vyžaduje další výzkum.

V modelu periferní **neuropatické bolesti** spojené s ligací spinálních nervů či chronickou konstrikcí sedacího svalu bylo po použití MPEP zaznamenáno pouze slabé zmírnění mechanické alodynies (Zhu 2004). Stejný výsledek byl v téže práci zaznamenán u modelu periferní neuropatie spojené s chemoterapií, konkrétně vyvolané pomocí vinkristinu.

Další zkoumanou neuropatií byla diabetická neuropatie, která může vyvolávat jak hyperalgesii, tak alodynii (Li 2010). Tato skupina zjistila, že u diabetických potkanů je v gangliích dorzálních kořenů exprimováno více mGluR5 než v kontrolní skupině, což by znamenalo více možných cílů pro MPEP. V souladu s touto hypotézou měla blokace pomocí MPEP při elektrofyziologických testech opravdu lepší účinnost u diabetiků; naopak

blokace mGluR1 pomocí CPCOOEt neměla žádné výsledky ani u diabetiků, ani v kontrolní skupině.

## 6.2 II. skupina mGluRs

Význam role receptorů II. skupiny při vnímání **akutní bolesti** je zatím málo prozkoumaný. Při elektrofyziologických testech bylo zjištěno, že agonisté II. skupiny LY379268 a LCCG1 nemají signifikantní vliv na charakteristiky neuronů při bolestivé i nebolestivé stimulaci (Neugebauer 2000). Behaviorální testy zatím nebyly provedeny.

Aktivace mGluRs II. skupiny může účinkovat proti **zánětlivé bolesti**. Specifičtí agonisté této skupiny, LY379268 a LY389795, byli zkoumáni v několika modelech zánětlivé bolesti (Jones 2005). Oba agonisté omezili bolestivost ve druhé fázi formalinového testu, ale LY389795 takto účinkoval pouze při intracisternálním (nikoli intrathekálním) podání. U carrageenového modelu zánětu účinkovali oba proti termální hyperalgesii, ale ne proti mechanické alodynii. Dále oba agonisté účinkovali proti kapsaicinem vyvolané alodynii. Proti praktickému využití těchto poznatků se staví narušení motoriky, a zejména vznik tolerance již po čtyřech dnech užívání.

Při pokusech se včelím jedem (viz výše) byl ADPC, agonista II. skupiny, účinný proti vytrvalé spontánní bolesti i proti bolesti zánětlivé (Chen 2010). U vytrvalé spontánní bolesti bylo potvrzeno, že se jedná opravdu o účinky těchto receptorů, zvrácením účinků pomocí LY341495, antagonisty II. skupiny mGluRs. U zánětlivé bolesti bylo použití ADPC účinné proti rozvinutí mechanické hyperalgesie spojené se zánětem; tato role byla potvrzena tím, že účinek zvrátí specifický antagonist II. skupiny, nikoli však specifický antagonist III. skupiny.

Při výzkumu orofaciální alodynii způsobené interleukinem 1 $\beta$  bylo zjištěno, že agonisté II. skupiny (jak ADPC, tak DCG4) účinkují proti vzniklé alodynii (Ahn 2005). Tento účinek byl odstraněn použitím LY341495. Samotný

LY341495 žádné účinky na bolest neměl. Buněčné mechanismy těchto efektů jsou zatím neznámé. Z těchto výsledků je zřejmé, že i mGluR II. skupiny se účastní orofaciální alodynie, ale hrají jinou roli než mGluR I. skupiny.

Vzhledem k efektům aktivace receptorů II. skupiny se nabízí možnost epigenetické modulace mGlu2 pomocí inhibitorů histon deacetylázy (Chiechio 2009). Exprese mGlu2 v gangliích dorzálních kořenů je regulována acetylací, proto je možné inhibicí HDAC zvýšit jejich počet. Byly zkoumány dvě chemicky odlišné HDAC: MS-275 a SAHA, přičemž obě měly analgetické účinky, které byly vyrušeny použitím antagonisty II. skupiny mGluRs. U této metody by nemusela vznikat tolerance, protože receptory neaktivuje agonista, ale endogenní glutamát. Další výhodou je, že HDAC účinkovaly pouze ve druhé fázi formalinového testu, takže by nedošlo k narušení vnímání akutní bolesti.

### 6.3 III. skupina mGluRs

Role III. skupiny mGluRs ve vnímání bolesti je stále málo popsána, částečně díky nedostatku specifické farmakologie (Varney 2002).

Úloha těchto receptorů ve vnímání **akutní bolesti** se předpokládá zejména na základě jejich exprese v centrální nervové soustavě, protože behaviorální studie zatím provedeny nebyly. Elektrofyzilogickou studií bylo zjištěno, že použití L-AP4 (specifický agonista receptorů III. skupiny) snižuje odpověď na bolestivou stimulaci (Neugebauer 2000). Toto zjištění napovídá, že by se tyto receptory mohly účastnit vnímání akutní bolesti, jsou ale potřeba další, podrobnější studie.

U L-AP4, specifického agonisty III. skupiny, byla zjištěna schopnost snížit mechanickou alodynii u modelu **zánětlivé bolesti** vyvolané kapsaicinem (Neugebauer 2000). Po vymytí L-AP4 se sensitizace vrátila na původní úroveň.

L-AP4 byl také účinný proti vytrvalé spontánní bolesti vyvolané včelím jedem (viz výše) (Chen 2010). Tento efekt byl odstraněn použitím MSOP (antagonista III. skupiny); účinky na hyperalgesii nebyly signifikantní.

U DCPG (selektivní agonista mGluR8) byla zjištěna schopnost redukovat zánětlivou bolest vyvolanou formalinem nebo carrageenanem, a to jak termální hyperalgesii, tak mechanickou alodynii (Marabese 2007).

## 7 Závěr

Současný výzkum naznačuje, že všechny skupiny mGluRs se účastní vnímání bolesti. Role některých z nich již byla popsána velmi podrobně, jiné teprve čekají na objevení vhodných metod, které upřesní jejich vlastnosti.

Praktickému použití jejich agonistů a antagonistů k léčbě bolesti zatím brání různé problémy (nepříznivé vedlejší účinky, rychlý vznik tolerance, možné ovlivnění vnímání akutní bolesti), které je třeba podrobit dalšímu výzkumu.

## 8 Použitá literatura

Ahn DK, Kim KH, Jung CY, Choi HS, Lim EJ, Youn DH, Bae YC. Role of peripheral group I and II metabotropic glutamate receptors in IL-1beta-induced mechanical allodynia in the orofacial area of conscious rats. *Pain* 118: 53-60, 2005.

Bhave G, Karim F, Carlton SM, Gereau RW. Peripheral group I metabotropic glutamate receptors modulate nociception in mice. *Nat Neurosci* 4: 417-23, 2001.

Bockaert J, Pin JP. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J* 18:1723-9, 1999.

Chen HS, Qu F, He X, Kang SM, Liao D, Lu SJ. Differential roles of peripheral metabotropic glutamate receptors in bee venom-induced nociception and inflammation in conscious rats. *J Pain* 11: 321-9, 2010.

Chiechio S, Zammataro M, Morales ME, Busceti CL, Drago F, Gereau RW, IV, Copani A, Nicoletti F. Epigenetic modulation of mGlu2 receptors by histone deacetylase inhibitors in the treatment of inflammatory pain. *Mol Pharmacol* 75: 1014-1020, 2009.

Fisher K,Coderre TJ. The contribution of metabotropic glutamate receptors (mGluRs) to formalin-induced nociception. *Pain* 68: 255-63, 1996.

Jones CK, Eberle EL, Peters SC, Monn JA, Shannon HE. Analgesic effects of the selective group II (mGlu2/3) metabotropic glutamate receptor agonist LY379268 and LY389795 in persistent and inflammatory pain models after acute and repeated dosing. *Neuropharmacology* 49: 206-218, 2005.

Lee HJ, Choi HS, Ju JS, Bae YC, Kim SK, Yoon YW, Ahn DK. Peripheral mGluR5 antagonist attenuated craniofacial muscle pain and inflammation but not mGluR1 antagonist in lightly anesthetized rats. *Brain Res Bull* 70: 378-85, 2006.

Li JQ, Chen SR, Chen H, Cai YQ, Pan HL. Regulation of increased glutamatergic input to spinal dorsal horn neurons by mGluR5 in diabetic neuropathic pain. *J Neurochem* 112: 162-172, 2010.



Neugebauer V, Chen PS, Willis WD. Role of metabotropic glutamate receptor subtype mGluR1 in brief nociception and central sensitization of primate STT cells. *J Neurophysiol* 82: 272-282, 1999.

Pin JP, Acher F. The metabotropic glutamate receptors: structure, activation mechanism and pharmacology. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 1(3):297-317. 2002.

Varney MA, Gereau RW. Metabotropic glutamate receptor involvement in models of acute and persistent pain: prospects for the development of novel analgesics. *Curr Drug Targets* 1: 283-296, 2002.

Walker K, Bowes M, Panesar M, Davis A, Gentry C, Kesingland A, Gasparini F, Spooren W, Stoehr N, Pagano A, Flor PJ, Vranesic I, Lingenhoehl K, Johnson EC, Varney M, Urban L, Kuhn R. Metabotropic glutamate receptor subtype 5 (mGlu5) and nociceptive function. I. Selective blockade of mGlu5 receptors in models of acute, persistent and chronic pain. *Neuropharmacology*: 40 1-9, 2001.

Wettschureck N, Offermanns S. Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev* 85: 1159-1204, 2005.

Young MR, Fleetwood-Walker SM, Dickinson T. Behavioural and electrophysiological evidence supporting a role for group I metabotropic glutamate receptors in the mediation of nociceptive inputs to the rat spinal cord. *Brain Res* 777:161-9, 1997.

Young MR, Blackburn-Munro G, Dickinson T, Johnson MJ, Anderson H, Nakalembe I, Fleetwood-Walker SM. Antisense ablation of type I metabotropic glutamate receptor mGluR(1) inhibits spinal nociceptive transmission. *J Neurosci* 18: 10180-10188, 1998.

Zhu CZ, Wilson SG, Mikusa JP, Wismer CT, Gauvin DM, Lynch JJ, III, Wade CL, Decker MW, Honore P. Assessing the role of metabotropic glutamate receptor 5 in multiple nociceptive modalities. *Eur J Pharmacol* 506: 107-18, 2004.