



Faculty
of Science

Palacký University
Olomouc

RECEPTOROVÁ TEORIE

Prof. RNDr. Zdeněk DVOŘÁK, DrSc., PhD
Katedra buněčné biologie a genetiky

Buněčná biologie II. (KBB/BB2)

RECEPTOROVÁ TEORIE - HISTORIE

- poprvé ji postuloval John Newport Langley (1878)
 - experimentoval s analogy nikotinu a kurare na svalovou kontrakci
 - s využitím izolovaných svalových vláken pozoroval účinky pilokarpinu (kontrakce) a atropinu (inhibice)
 - učinil závěr, že dvě sloučeniny soutěží o třetí, ale neznámou látku
-
- pokračovatelem byl Paul Ehrlich (1854-1915)
 - prokázal nezbytnost stereoselektivity v signalizaci léčivo-receptor



John N. Langley



Paul Ehrlich

RECEPTOROVÁ TEORIE - HISTORIE

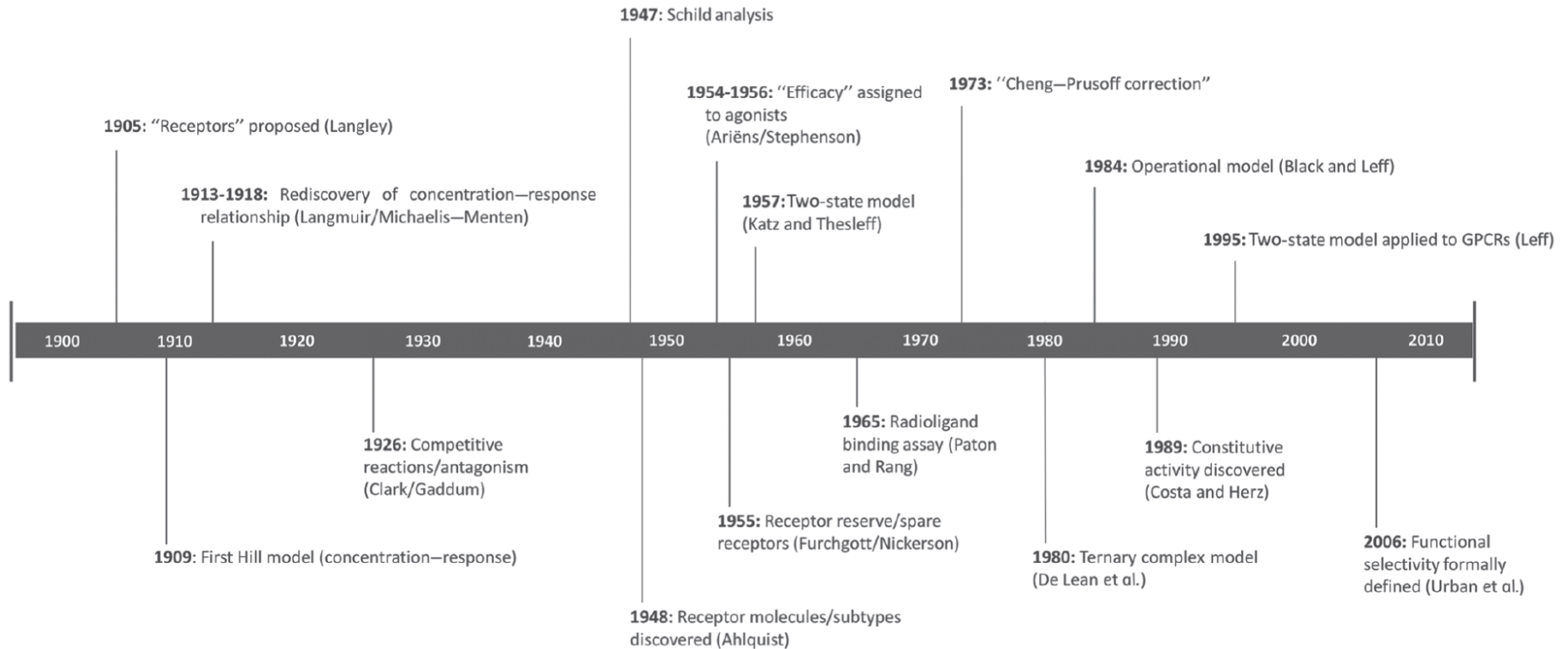


FIGURE 1 Timeline of receptor theory, 1905–2006

RECEPTOROVÁ TEORIE - SOUČASNOST

- implementace „omics“ a „high-throughput“
- sekvenace lidského (a dalších) genomu
- většina receptorů již byla identifikována, izolována, biochemicky charakterizována
- geny kódující receptory byly klonovány a sekvenovány
- obdobný stupeň poznání i na úrovni interagujících, regulujících a regulovaných systémů (genů)
- studium pomocí mutantních proteinů; *in silico* přístupy

RECEPTOR

„Je cílová substance, která je zodpovědná za iniciaci buněčné odpovědi.“

LIGAND (hormon, léčivo, signální molekula...)

„Je substance, která se povinně váže na receptor.“

“*Corpora non agunt nisi fixate*” (agents will not work unless they are bound)

Paul Ehrlich

- Receptor determinuje kvantitativní vztah mezi ligandem a biologickým (farmakologickým) účinkem
- Receptory zodpovídají za selektivitu účinku ligandu
- Receptor vykazuje strukturní a sterickou specificitu pro ligand a strukturně blízká analoga
- Receptory zprostředkovávají účinky ligandů (agonistů a antagonistů)
- Vazba ligandu na receptor je reversibilní
- Receptory jsou satureovatelné a v limitovaném množství (existuje konečný počet vazebných míst)
- Vazba ligandu na receptor může být buněčně specifická

FUNKČNÍ VLASTNOSTI RECEPTORU

VAZBA LIGANDU NA RECEPTOR = RECOGNITION

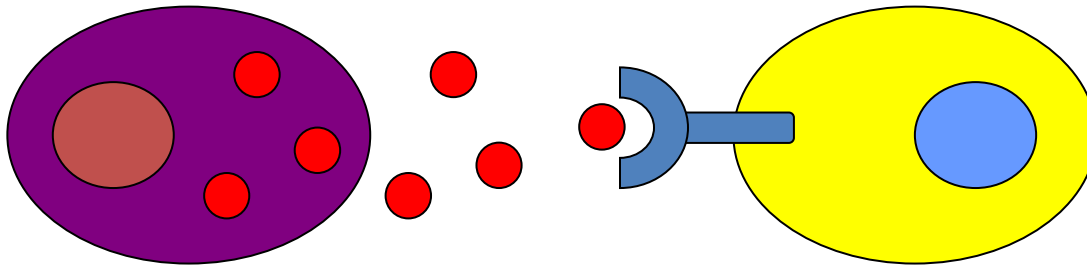
- Receptor existuje v konformačním stavu, který umožňuje rozpoznání a vazbu ligandu
- Reversibilita vazby ligandu na receptor
- Saturovatelnost receptoru
- Selektivita interakce ligand-receptor
- Vliv difuze, metabolismu, vazby na plasmatické proteiny, transportu

AKTIVACE RECEPTORU LIGANDEM = TRANSDUCTION

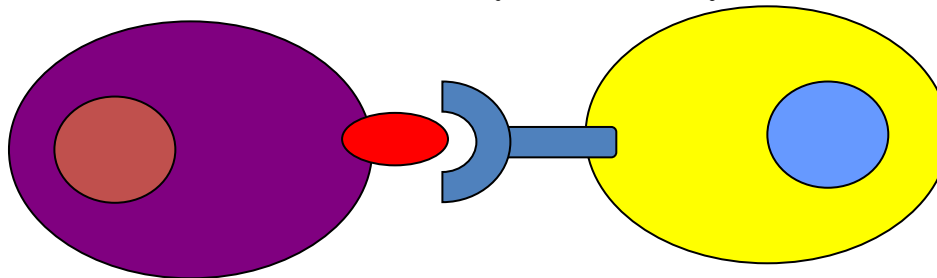
- Vazba ligandu (agonisty) na receptor musí být přeměněna do funkční odpovědi (biologické nebo fyziologické); bezprostředně po vazbě musí nastat „early chemical event“
- Různé typy receptorů jsou spojeny s příslušnými efektorovými systémy buď přímo nebo prostřednictvím jednoduchých či komplexních systémů pro bezprostřední amplifikaci signálu.

MEZIBUNĚČNÁ SIGNALIZACE

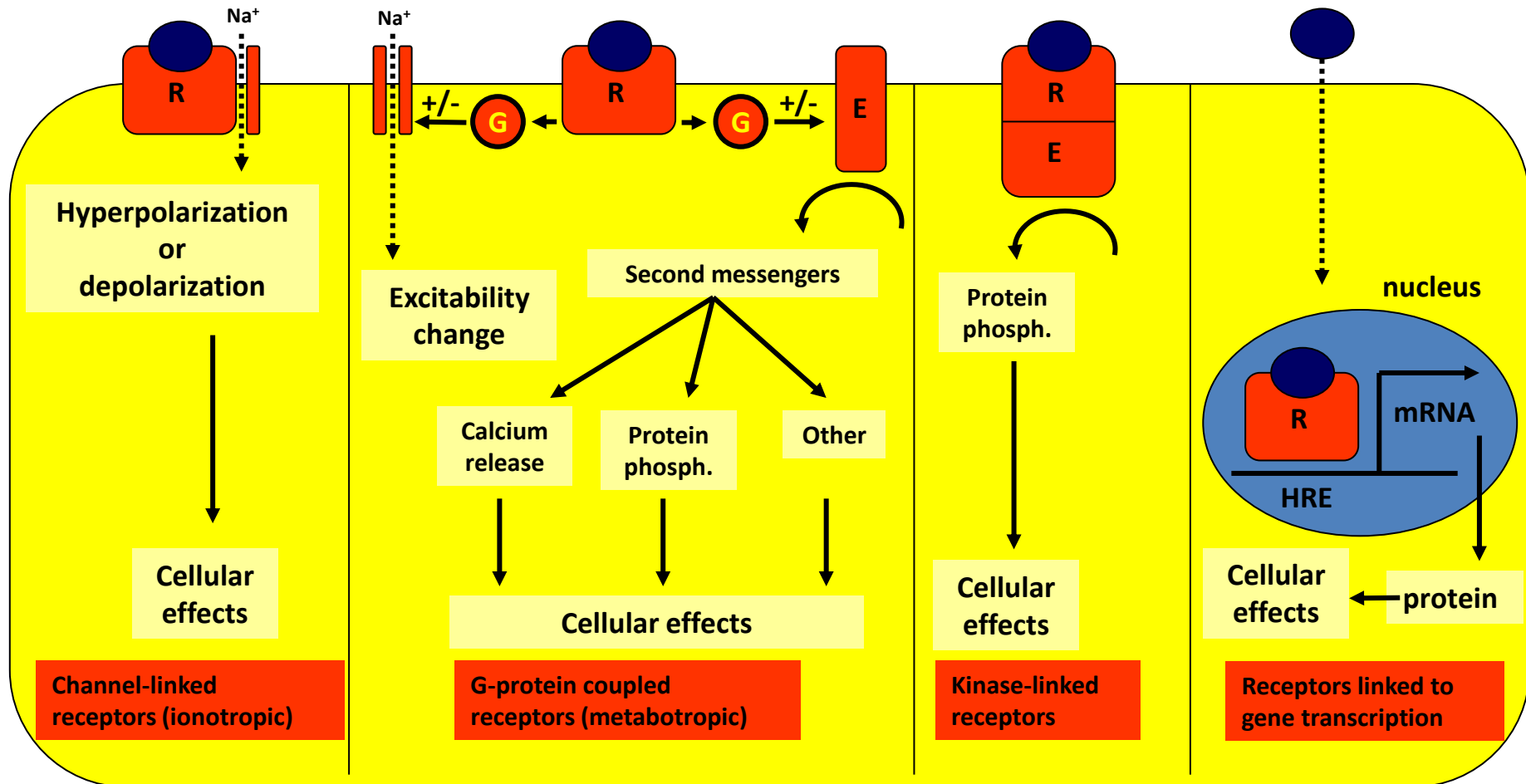
- signalizace sekretovanými molekulami



- signalizace molekulami vázanými na plasmatickou membránu



TYPY RECEPTORŮ



milliseconds

- nicotinic ACh r.
- GABA_A r.

seconds

- adrenoreceptors
- muscarinic ACh r.

minutes

- insulin r.
- growth factors r.
- cytokine r.

hours

- steroid/thyroid r.
- MR, GR, AR, ER
- GR, TR, VDR, PR

DEFINICE POJMŮ

AFINITA („*affinity*“; K_D)

- ochota s jakou se ligand váže na daný receptor
- rovnovážná disociační konstanta (K_D)

ÚČINNOST („*efficacy*“; „*intrinsic efficacy*“; E_{MAX})

- schopnost ligandu vyvolat funkční odpověď ve srovnání s referenčním ligandem
- E_{MAX} = *maximal effective concentration*

POTENCE („*potency*“; EC_{50})

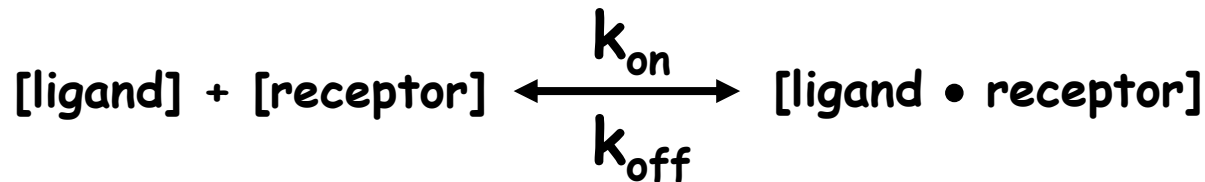
- schopnost látky vyvolat měřitelnou funkční změnu
- comparativní veličina - srovnává koncentraci 2 látek, která vyvolá MAX odpověď
- EC_{50} = *half maximal effective concentration*

AKTIVITA („*intrinsic activity*“; IA)

- relativní maximální účinek ligandu ve srovnání s endogenním ligandem
- integruje schopnost ligandu se vázat na receptor a vyvolat funkční odpověď
 - Full agonist*; IA = 1 (totožné s endogenním ligandem)
 - Antagonist*; IA = 0
 - Partial agonist*; IA = 0 ~ 1 (submaximální odpověď i při max. saturaci)
 - Inverse agonist*; IA < 0

VAZBA LIGANDU NA RECEPTOR

- vazba ligandu na receptor se řídí **zákonem o působení aktivní hmoty**
- integrováno s teorií obsazenosti (**receptor occupancy theory; Gaddum&Clark**)
- **primární předpoklad**: ligand se váže na homogenní populaci receptorů



• k_{on} = počet vazeb (událostí) / čas (rychlost/míra asociace)
 $[\text{ligand}] \bullet [\text{receptor}] \times k_{\text{on}} = \text{M}^{-1}\text{min}^{-1}$

• k_{off} = počet disociací (událostí) / čas (rychlost/míra disociace)
 $[\text{ligand} \bullet \text{receptor}] \times k_{\text{off}} = \text{min}^{-1}$

VAZBA LIGANDU NA RECEPTOR

- k vazbě dochází když ligand a receptor kolidují ve správné orientaci a se správnou energií
- interakce ligandu s receptorem je REVERSIBILNÍ
- rychlost formace $[L] + [R]$ nebo disociace $[LR]$ závisí jen na počtu receptorů, koncentraci ligandu a rychlostních konstantách k_{on} a k_{off}
- jakmile dojde k vazbě ligandu, zůstává ligand vázaný na receptor po náhodný časový interval
- pravděpodobnost disociace je stejná v jakýkoliv okamžik po asociaci
- neexistuje částečná vazba; receptory jsou buď volné nebo obsazené
- všechny receptory jsou rovnocenné pro vazbu ligandu
- po disociaci ligandu by ligand i receptor měly zůstat nezměněny; pokud je některý z nich fyzicky pozměněn, neplatí zákon o působení aktivní hmoty
- aktivace receptorů a cílová buněčná odpověď jsou přímo úměrné stupni OBSAZENOSTI RECEPTORU
- POZOR: koncentrace ligandu při které je obsazena $\frac{1}{2}$ populace receptorů ligandem (K_D) je často nižší než koncentrace potřebná k vyvolání poloviční maximální biologické odpovědi (EC_{50}) - nezaměňovat tyto dvě veličiny!!!! i když křivky jsou si podobné!!!

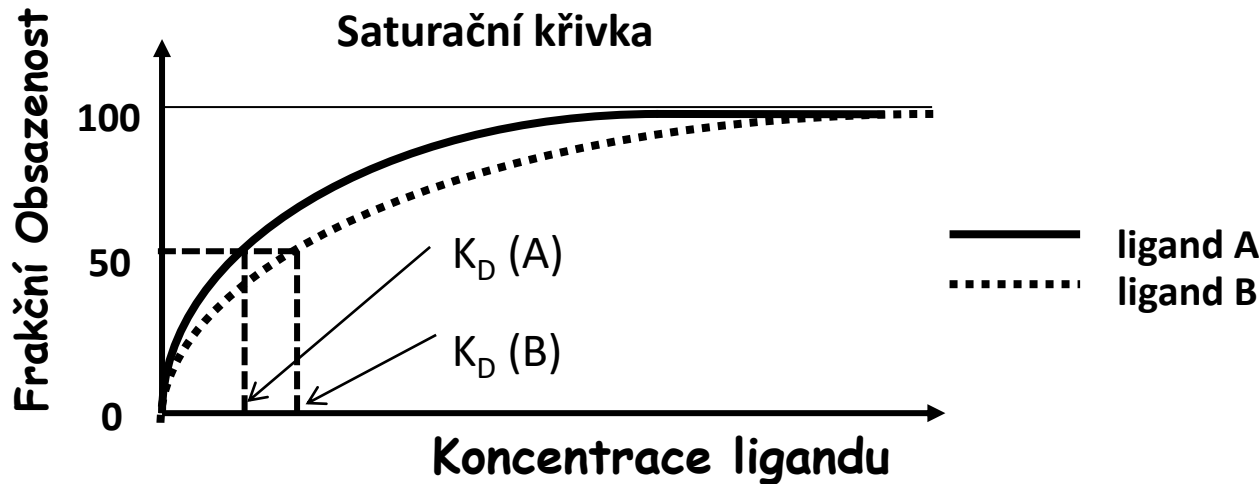
VAZBA LIGANDU NA RECEPTOR

- v rovnováze je rychlost tvorby komplexu [LR] rovna rychlosti disociace:



- K_D je rovnovážná disociační konstanta
- K_D je vyjádřena v molárních jednotkách (M/L) a vyjadřuje **AFINITU** ligandu k receptoru

$$K_D = k_{off}/k_{on} = \frac{[L] \times [R]}{[LR]}$$

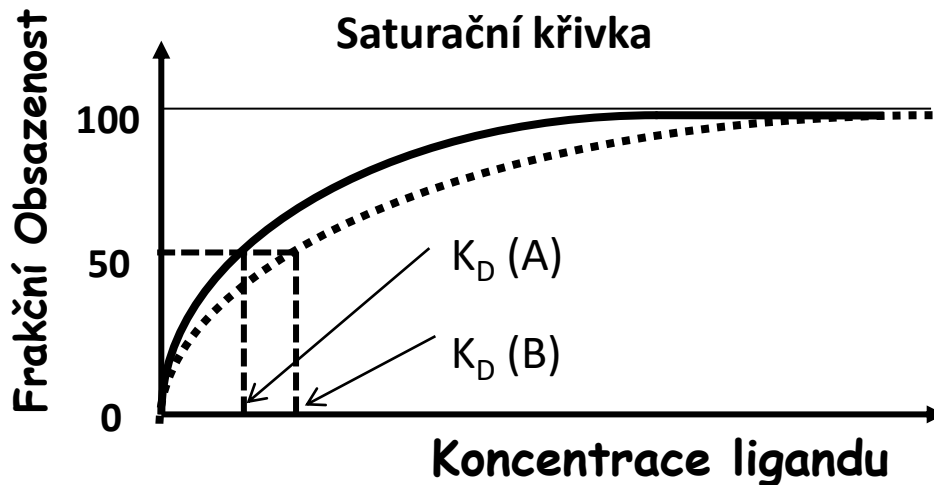


FRAKČNÍ OBSAZENOST RECEPTORU

$$\text{F.O.} = \frac{[\text{LR}]}{[\text{celkový receptor}]} = \frac{[\text{LR}]}{[\text{LR}] + [\text{R}_{\text{free}}]}$$

• Nyní dosadíme vzorec pro výpočet K_D

$$[\text{R}] = \frac{K_D \times [\text{LR}]}{[\text{L}]} \quad \rightarrow \quad \text{F.O.} = \frac{[\text{L}]}{[\text{L}] + K_D}$$

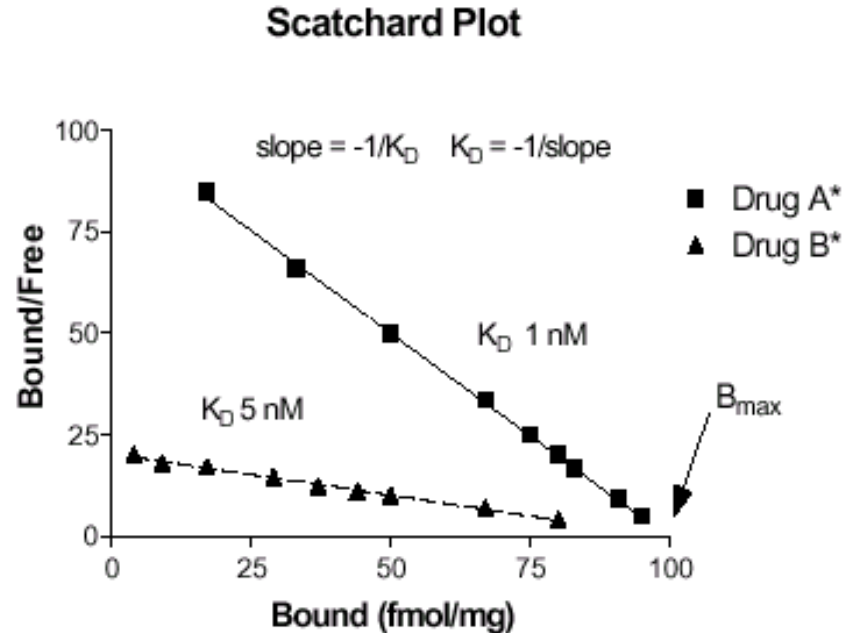
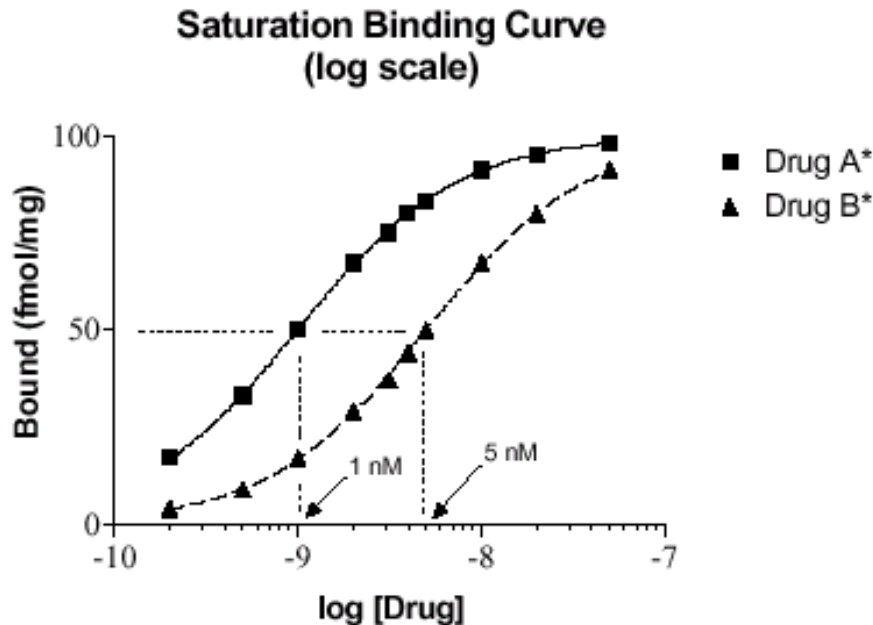


$[\text{L}] = K_D$	F.O. = 50%
$[\text{L}] = \frac{1}{2} K_D$	F.O. = 33%
$[\text{L}] = 10 \times K_D$	F.O. = 90%
$[\text{L}] = 0$	F.O. = 0%

— ligand A
 ligand B

VAZBA LIGANDU NA RECEPTOR

- transformace F.O. pro snadnější interpretaci (logaritmická, Scatchard)



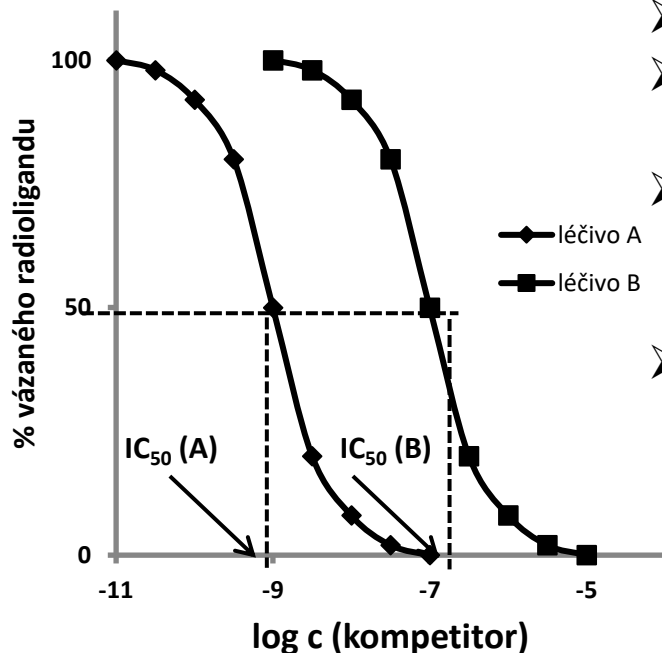
- využívají se radioaktivně značené ligandy (^{125}I , ^{35}S , ^3H)
- volba vhodného ligandu (agonista vs. antagonist); antagonisté mají často vyšší afinitu, ale déle se ustavuje rovnováha
- saturační vazebná křivka odpovídá steady-state (rovnováha je teoretická)
- vazbu ligandu na receptor lze popsat analogicky vazbě substrátu na enzym

$$\text{Bound} = \frac{B_{\max} \times [\text{radioligand}]}{K_D + [\text{radioligand}]}$$

$$V_0 = \frac{V_{\max} \times [S]}{K_M + [S]}$$

KOMPETITIVNÍ VAZEBNÉ ESEJE

- umožňují stanovit hrubým odhadem afinitu nezačleněného ligandu k receptoru
- není-li při studiu vazby ligandu L k dispozici radioaktivně značený ligand L^* , lze provést kompetici jiným, neradioaktivním ligandem B , který se rovněž váže na receptor R
- přidavek L do inkubační směsi, povede k tomu, že ligand L soutěží s L^* (B) o obsazení R , a že méně molekul R bude dostupných pro vazbu ligandu L^* (B); tj. sníží se množství vytvořeného komplexu $[L^*R]$ ($[BR]$)
- Technické provedení: jedna koncentrace L^* (B) + rostoucí koncentrace L



- IC_{50} : koncentrace L , která vytěsňuje 50% L^* (B)
- použijeme-li L^* , IC_{50} je rovna K_D
- použijeme-li B , IC_{50} není rovna K_D (jedná se jen o odhad - byl použit jiný ligand s odlišnou afinitou)
- K_i : rovnovážná disociační konstanta inhibitoru; koncentrace soutěžícího ligandu, která by se vázala na 50% vazebných míst v nepřítomnosti L^*
- pro stanovení K_i je třeba nejprve znát IC_{50}

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[radioligand]}{K_D}}$$

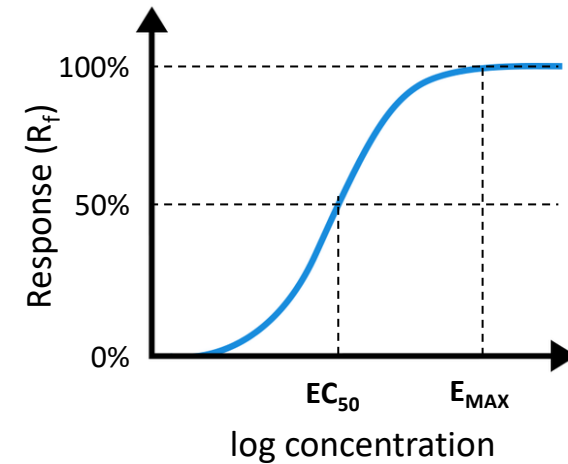
rovnice Chenga a Prusoffa

AKTIVACE RECEPTORU LIGANDEM

- Receptorová teorie definuje dvě klíčové události:
 - **recognition** \Rightarrow vazba **L** na **R**
 - **transduction** \Rightarrow aktivace **R** po vazbě **L**, tj. vyvolání buněčné odpovědi
- Podle schopnosti ligandu vyvolat funkční odpověď po vazbě na receptor, dělíme ligandy na **AGONISTY** a **ANTAGONISTY**
- **Ligand je nadřazený pojem pro agonistu a antagonist:**
 - Agonista je ligand, který se váže na **R** a aktivuje jej
 - Antagonista je ligand, který se váže na **R** ale neaktivuje jej
 - Ligand se váže na **R** a jedná se buď o agonistu nebo antagonistu
- Aktivace či inhibice aktivity receptoru může probíhat mechanismem nezávislým na vazbě ligandu.
- Sloučeniny, které receptor aktivují či inhibují se nazývají **AKTIVÁTORY** a **INHIBITORY**. Tyto pojmy nejsou zaměnitelné s pojmy agonista / antagonist (nedochází k vazbě na receptor)
- Např. kovalentní modifikace receptoru fosforylací - aktivací / inhibicí protein kinas a protein fosfatas je modifikována aktivita receptoru

FRAKČNÍ ODPOVĚĎ - (FULL) AGONISTA

- **E_{max} = maximal effective concentration**
 - koncentrace agonisty vyvolávající maximální odpověď
 - je mírou účinnosti agonisty: **EFFICACY**
- **EC_{50} = half-maximal effective concentration**
 - koncentrace agonisty vyvolávající 50% max. odpovědi
 - je mírou potence agonisty: **POTENCY**
- míra funkční odpovědi (R_f) vyvolané agonistou **D** je nepřímým odhadem vazby **D** na **R** (F.O.)
- **Clarkova teorie**: účinek agonisty je přímo úměrný frakci receptorů obsazených tímto agonistickým ligandem. Při maximální obsazenosti receptoru (F.O. = 100%) je vyvolána max. odpověď E_{MAX} , tj $R_f = 100\%$
- Je toto vždy pravda?
- Ne není, platí jen pro tzv. **full agonisty**



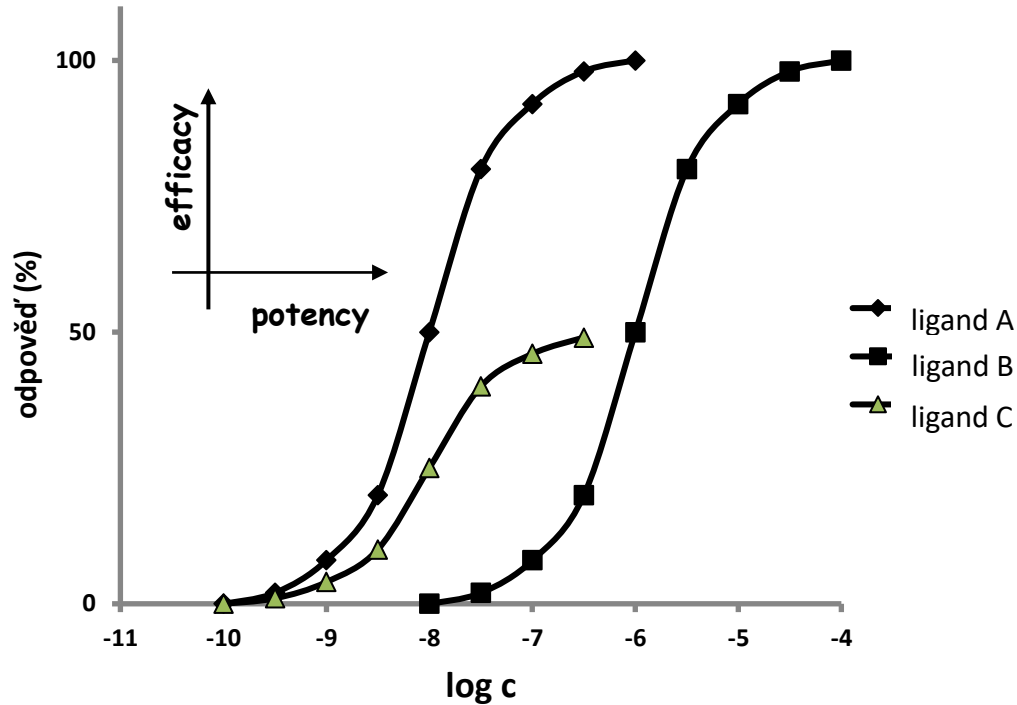
$$R_f = \frac{[D]}{EC_{50} + [D]}$$

Frakční odpověď

$[D] = EC_{50}$	$R_f = 50\%$
$[D] = 10 \times EC_{50}$	$R_f = 90\%$
$[D] = 100 \times EC_{50}$	$R_f = 99\%$

AKTIVACE RECEPTORU - PARCIÁLNÍ AGONISTA

- parciální agonisté nevyvolají maximální odpověď ($R_f < 1$), přestože jsou všechny receptory obsazeny (F.O. = 100%) !!!
- vztah mezi **obsazeností** (occupancy) a **odpovědí** (response) popisuje **vnitřní aktivita (IA: intrinsic activity)** = schopnost přeměnit vazbu ligandu na aktivaci receptoru
- Ve srovnání s full agonisty mají parciální agonisté podobnou potenci (EC_{50}), ale nižší efficacy (E_{MAX}) ($0 < IA < 1$)
- ligand s vysokou IA musí obsadit méně receptorů aby vyvolal stejnou odpověď (E) jako ligand s nízkou IA
- mohou nastat různé konformační změny působením různých agonistů
- parciální agonisté budou vykazovat velmi malou funkční odpověď, a to přesto, že podstatné množství receptorů bude obsazeno



Full agonista	IA = 1
Parciální agonista	$0 < IA < 1$
Antagonista	IA = 0

ligand A × ligand B:

- A, B - full agonisté
- Efficacy A = B
- Potency A > B

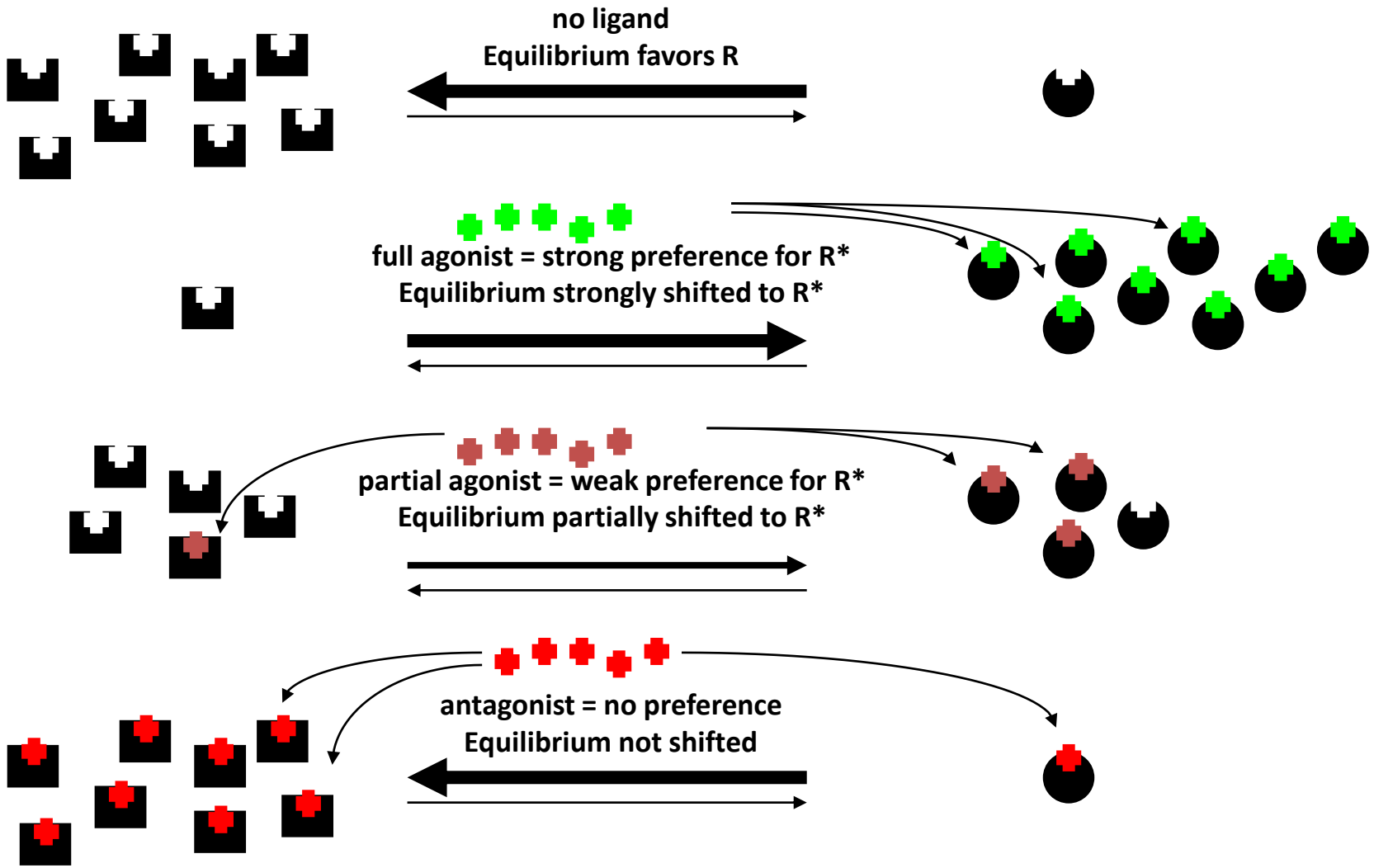
ligand C:

- parciální agonista
- Efficacy C < A, C < B
- Potency C > B, C < A

TWO STATE MODEL

Resting State R

Activated State R*



RECEPTOROVÝ ANTAGONISMUS

➤ ANTAGONISMUS

- chemický (interakce v roztoku - vznik komplexů, dithiokarbamáty atd.)
- farmakokinetický (snížení koncentrace léčiva v místě účinku)
- **receptorový** (kompetitivní vs nekompetitivní)
- fyziologický (opačný účinek - např. insulin a glukagon)

➤ antagonisté blokují odpověď vyvolanou agonisty - brání vazbě agonistického ligandu a/nebo vyvolání adekvátní odpovědi

➤ vnitřní aktivita antagonisty: $IA = 0$

➤ u antagonistů definujeme selektivitu, afinitu (K_D) a potenci (IC_{50} ; K_i)

IC_{50} = half-maximal inhibitory concentration

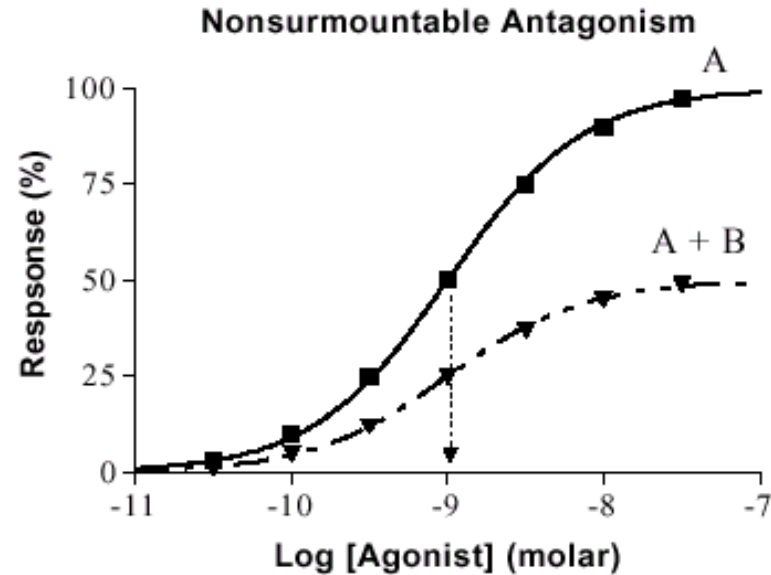
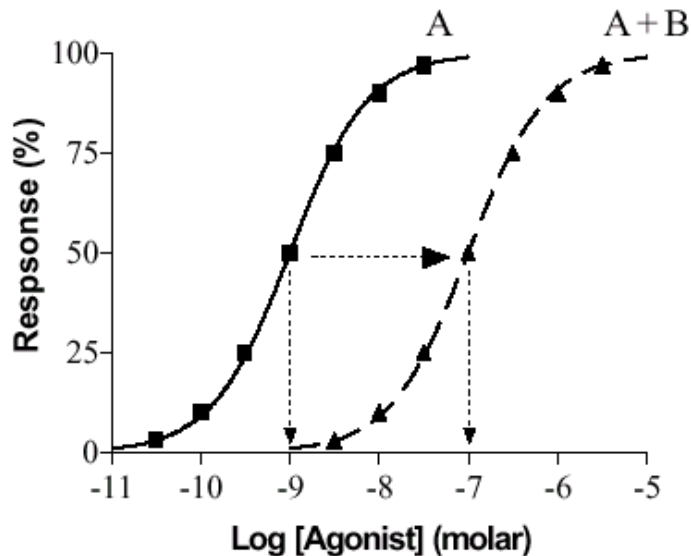
- koncentrace antagonisty způsobující 50% inhibici odpovědi vyvolané agonistou
- míra **POTENCE** antagonisty

K_i = inhibitory constant

- IC_{50} normalizovaná na použitou koncentraci agonisty
- Cheng-Prusoff equation

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[L]}{[EC_{50}]}}$$

RECEPTOROVÝ ANTAGONISMUS



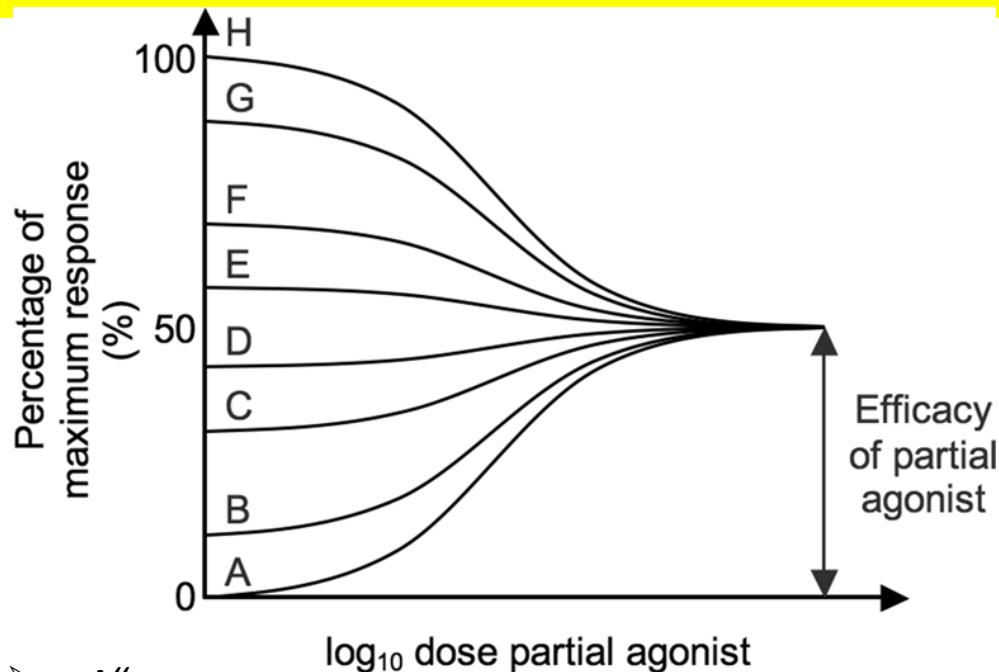
KOMPETITIVNÍ ANTAGONISMUS

- orthosterická vazba (jako agonista)
- překonatelný nadbytkem agonisty
- často off-targets
- neomezený potenciál inhibice
- posun křivek FO / R_f doprava
- zvyšuje se EC₅₀
- nemění se E_{MAX} a B_{MAX}

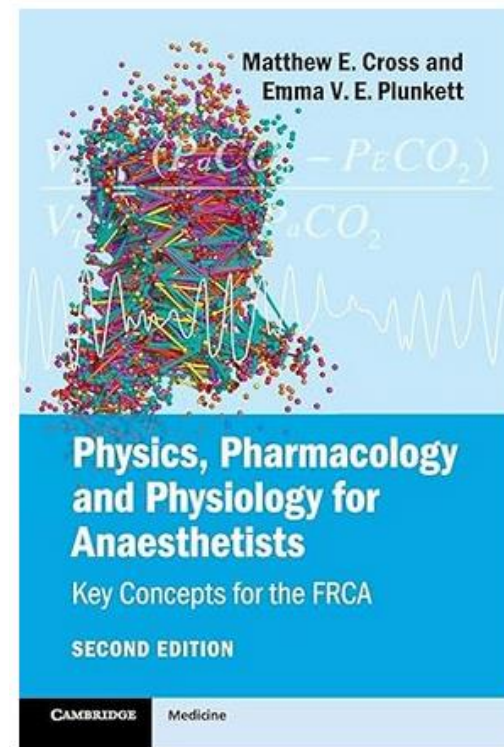
NEKOMPETITIVNÍ ANTAGONISMUS

- allosterická vazba (jinde než agonista)
- nepřekonatelný nadbytkem agonisty
- lepší selektivita
- možnost jemného ladění inhibice, strop účinku
- klesá sklon křivek FO / R_f
- nemění se EC₅₀
- klesá E_{MAX} a B_{MAX}

PARCIÁLNÍ AGONISTA SE V KOMBINACI S FULL AGONISTOU CHOVÁ JAKO ANTAGONISTA



- „A“:
 - koncentrace full agonisty nulová = žádná odpověď (0%)
 - s rostoucí koncentrací parciálního agonisty roste odpověď, nedosáhne ale 100%
- „H“:
 - nejvyšší koncentrace full agonisty = maximální odpověď (100%)
 - s rostoucí koncentrací parciálního agonisty klesá odpověď full agonisty, až na účinnost parciální agonisty v nejvyšší koncentraci (50%)



IREVERSIBILNÍ ANTAGONISTÉ

- váží se nevratně, obvykle dochází ke kovalentní modifikaci receptoru (např. N-ethylmalemid a další SH- nebo alkylační činidla; protilátky)
- orthosterická i alosterická vazba
- mechanismus nekompetitivní
- nízká selektivita
- dochází k fyzické destrukci receptoru; tj. efektivně a prakticky snížené množství receptorů schopné vázat agonisty
- analogický efekt má mutace receptoru (proteinu) či fyzikálně/chemické poškození
- přídavek dalšího agonisty je neúčinný
- jediné řešení obnovy signální funkce receptoru je de novo proteosyntéza

LIGAND

AKTIVACE

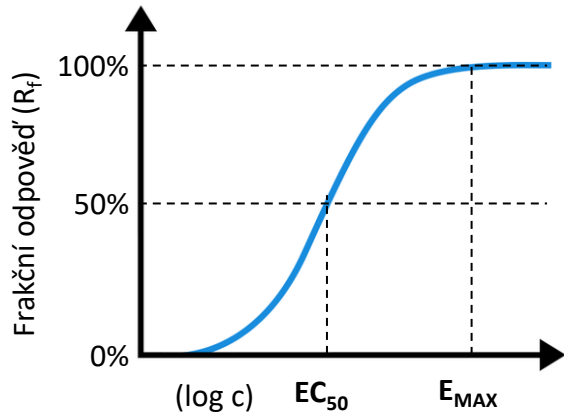
agonisté

POTENCE (EC_{50})

- half-maximal effective concentration
- „jak málo/moc je dost“

ÚČINNOST (%; E_{MAX})

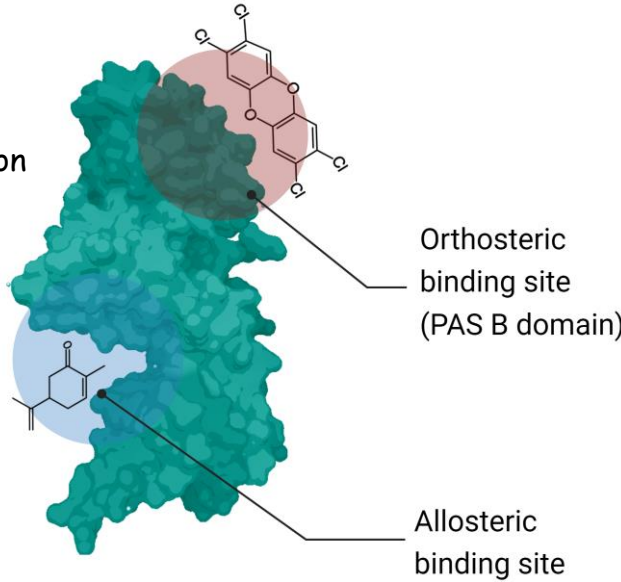
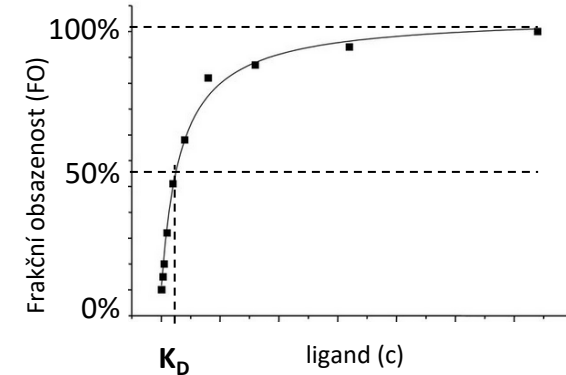
- maximal effective concentration
- velikost odpovědi



VAZBA

AFINITA (K_D)

- rovnovážná disociační konstanta
- ochota ligandu se vázat na receptor



antagonisté

POTENCE ($IC_{50}; K_i$)

- IC_{50} = half-maximal inhibitory concentration
- K_i = inhibiční konstanta (rovnice Cheng-Prusoff)

KOMPETITIVNÍ

- orthosterická vazba
- surmountable
- Posun křivek FO / R_f doprava
- zvýšení EC_{50}
- nemění se E_{MAX} a B_{MAX}

NEKOMPETITIVNÍ

- allosterická vazba
- nonsurmountable
- pokles strmosti křivek FO / R_f
- nemění se EC_{50}
- pokles E_{MAX} a B_{MAX}

VNITŘNÍ AKTIVITA (IA)

- vztah mezi afinitou (vazbou; obsazeností) a odpovědí
- schopnost ligandu proměnit vazbu v odpověď



full agonista ($IA = 1$) partiální agonista ($0 < IA < 1$) antagonist ($IA = 0$)

RECEPTOR-EFFECTOR COUPLING

➤ vazba agonisty na receptor a následně vyvolaná konformační změna jsou obvykle jen prvními kroky z mnoha kroků potřebných k dosažení výsledného buněčného (farmakologického) účinku

➤ SROVNEJME

nikotinový acetylcholinový receptor a β -adrenergní receptor:

- nikotinový AChR po vazbě acetylcholinu bezprostředně otevírá kanál a ionty mohou ihned proudit skrz pór
- β -adrenergní receptor je GPCR, aktivuje G-protein a následně cAMP kaskádu, dále PKA, enzymy metabolismu glukosy a glykogenu....atd....mnoho kroků po finální metabolickou odpověď - např. glykogenolýzu

➤ proces přenosu (informace) mezi obsazeným receptorem a konečnou buněčnou odpovědí na agonistický ligand se nazývá „coupling“

➤ účinnost couplingu částečně závisí na počáteční konformační změně receptoru; tj. účinek full agonistů může být efektivněji „coupled“ než účinek parciálních agonistů

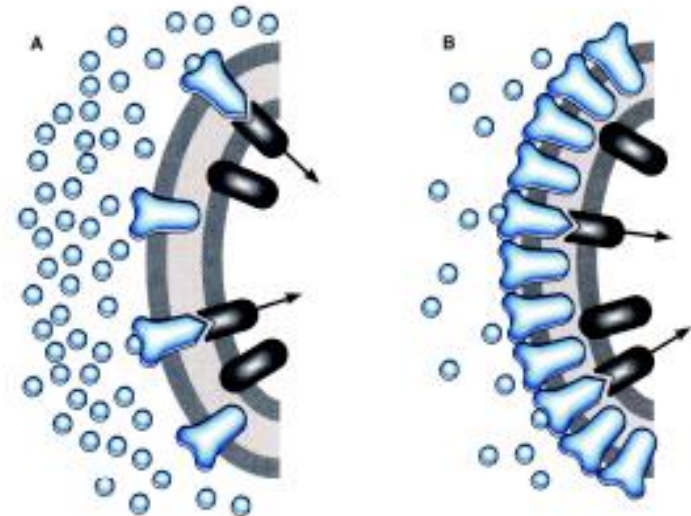
➤ účinnost couplingu je ale také dána biochemickými událostmi, které zajišťují přenos od obsazeného receptoru do buněčné odpovědi

„SPARE“ RECEPTORY

- maximální odpověď ($R_f = 100\%$) je vyvolána agonistou v koncentraci, která nedostačuje k plné obsazenosti dané populace receptorů (F.O. $< 100\%$)
- de facto opačné chování než u parciálních agonistů
- „spare“ - spořivé, postradatelné receptory
- průkaz SPARE receptorů pomocí ireversibilních antagonistů - tito snižují aktivní pool receptorů schopných vázat ligand a přesto nedojde k inhibici odpovědi
- mechanismy mohou být různé; někdy známé
 - např. vazba GTP na intermediátor dlouho přetrvává po interakci agonista-receptor; tato „spareness“ je nepřímá a dočasná
 - někdy se aplikuje představa že jsou receptory SPARE v počtu

A - necht' je koncentrace volného agonisty $[L] = K_D$; tj. je dostatečná k obsazení 50% receptorů. Tzn., že ze 4 přítomných R jsou obsazeny 2 R, které vyvolají odpověď přes dva efektory; protože jsou obsazeny 2 ze 4 R (F.O. = 50%), dosáhne se 50% maximální odpovědi ($R_f = 50\%$)

B - necht' je koncentrace $[R]$ desetinasobná oproti situaci **A**; hodnota K_D je nezměněná. Nyní velmi malá $[L]$ ($= 0.05 \times K_D$) postačí k obsazení 2 R a k následné aktivaci 2 efektorů. Dosáhneme tedy ($R_f = 50\%$) stejně jako v případě **A**, ale při mnohem nižší $[L]$ a (F.O. $< < 50\%$)



PODTYPY RECEPTORŮ

- u mnoha receptorů existuje více podtypů
- pro jednotlivé podtypy - selektivní agonisté a antagonisté
- každý podtyp může být couplingovaný s jiným systémem
- formace různých kvartérních struktur
- orgánově / tkáňově / buněčně specifické biologické efekty

Serotoninové (5-hydroxytryptamine, 5-HT) receptory

receptor	Typ / coupling	agonisté	antagonisté
5-HT _{1A}	G_i/G_0 coupled / ↓ cAMP	LSD, psilocin, MDMA	Ergotamin, yohimbin
5-HT _{1B}		Ergotamin, sumatripan	Risperidon, yohimbin
5-HT _{1D}		sumatripan	Ergotamin, yohimbin
5-HT _{1E}		LSD, BRL54443	-
5-HT _{1F}		BRL54443	
5-HT _{2A}	G_q/G_{11} coupled / ↑ IP ₃ ; ↑ DAG	Meskalin, psilocin, LSD	Mirtazapin, trazodon
5-HT _{2B}		LSD, fenfluoramin	yohimbin
5-HT _{2C}		YM-384	mesulergin
5-HT ₃	Na ⁺ /K ⁺ iontové k. / depolarizace	quipazin	Mirtazapin, ondansetron
5-HT ₄	G_s coupled / ↑ cAMP	Cisaprid, metoklopramid	piboserod
5-HT _{5A}	G_i/G_0 coupled / inhibice AC	LSD	SB-699
5-HT ₆	G_s coupled / ↑ cAMP	LSD	SB-271
5-HT ₇	G_s coupled / ↑ cAMP	LSD	Risperidon, methiotepin

DESENZITIZACE & DOWN-REGULACE

DESENZITIZACE RECEPTORU

- Ztráta afinity agonisty k receptoru, ale ne počtu receptorů po chronické stimulaci agonistou
- Homologní
 - uncoupling (např. GPCR: fosforylace, arrestiny)
 - endocytosa
- Heterologní - jeden agonista způsobí desenzitizaci vůči vícero jiným agonistům; příp. cross-desenzitizace (jeden receptor vyřadí druhý)
- posun křivek FO / R_f doprava; nemění se E_{MAX} a B_{MAX} , zvyšuje se EC_{50}

DOWN-REGULACE RECEPTORU

- pokles množství molekul receptorů
- proteolytická degradace (endosomy, lysosomy, proteasom)
- down-regulace exprese genu
- klesá sklon křivek FO / R_f , klesá E_{MAX} a B_{MAX} , nemění se EC_{50}

