

Receptor GPR18 – struktura i rola w fizjologii oraz patofizjologii

STRESZCZENIE

Receptory sprzężone z białkiem G (ang. *G protein coupled receptors*, GPCR) stanowią największą rodzinę receptorów błonowych i biorą udział w utrzymaniu homeostazy organizmu. Ok. 150 receptorów GPCR to tzw. receptory sieroce, ponieważ ich funkcja w komórce i endogenne ligandy nie są dokładnie poznane. Przez długi czas receptor GPR18 był zaliczany do tej grupy, niedawno sklasyfikowano go jako receptor endokannabinoidowy, ponieważ ligandy kannabinoidowe mogą aktywować ten receptor. Ekspresja receptora GPR18 została wykazana m.in. w mózgowiu, tarczycy, leukocytach krwi obwodowej, płucach oraz jądrach. Udowodniono rolę GPR18 w regulacji ciśnienia śródgałkowego i tętniczego, neuroimmunomodulacji oraz w zaburzeniach metabolicznych. W niniejszym artykule podsumowujemy aktualny stan wiedzy dotyczącej receptora GPR18 – jego ekspresji w organizmie, ligandów oraz roli w procesach fizjologicznych, jak i patofizjologii.

WSTĘP – HISTORIA ODKRYCIA I EKSPRESJA RECEPTORA GPR18

Receptory sprzężone z białkiem G (ang. *G protein-coupled receptors*, GPCR) stanowią najliczniejszą grupę białek błonowych odpowiedzialnych za przekazywanie sygnału do wnętrza komórki, zidentyfikowano ponad 800 białek z tej rodziny [1-5]. Mnogość działania GPCR sprawia, że są jednym z podstawowych celów terapeutycznych i znajdują się w centrum zainteresowania badaczy przy projektowaniu leków [1].

Okolo 150 receptorów z rodziny GPCR jest sklasyfikowana jako tzw. receptory sieroce o nieznanym endogennym ligandach, a ich rola w organizmie pozostaje nieokreślona [1]. Receptor GPR18 do niedawna również należał do receptorów sierocych, obecnie zaliczany jest do receptorów endokannabinoidowych.

Receptor GPR18 wyizolowano w 1997 roku, udowodniono, że składa się z 331 aminokwasów tworzących siedem domen przezbłonowych. W analizie porównawczej sekwencji aminokwasów receptora GPR18 wykazano, że u psa i człowieka pokrywa się w 92%, a sekwencja nukleotydowa w 89% [6]. Wykorzystując metodę fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (ang. *fluorescent in situ hybridization*, FISH), gen GPR18 zlokalizowano na ludzkim chromosomie 13q32, gdzie sąsiaduje z genem receptora EB12 (ang. *Epstein-Barr virus-induced receptor 2*, EB12) oraz genem receptora dla leukotrienów cysteinylowych CysLT1 i CysLT2 [7].

Gantz i wsp. wykazali obecność transkryptów receptora GPR18 m.in. w śledzionie, grasicy, leukocytach krwi obwodowej, jelicie cienkim, wyrostku robaczkowym oraz w węzłach chłonnych [6]. Wysoką ekspresję GPR18 odnotowano w jądrach – transkrypty tego receptora wykryto w kilku typach komórek (Ryc. 1).

Vassilatis i wsp. określili ekspresję genów kodujących receptory z rodziny GPCR w mysich i ludzkich tkankach, wykorzystując metodę łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. *real-time polymerase chain reaction*, real time PCR). Wysznuo następujące wnioski dotyczące ekspresji genu GPR18:

- brak ekspresji – ciało migdałowate, kora czołowa, hipokamp, wątroba i mięśnie;
- niska ekspresja – kora, wzgórze, nadnercza, jelito grube, jelito cienkie, nerki, prostata, skóra, śledziona, żołądek i macica;
- umiarkowana ekspresja – płuca, jajniki, jądra, grasica i prądkowie;
- wysoka ekspresja – podwzgórze, tarczyca, leukocyty krwi obwodowej, mózdzek i pień mózgu [8].

Michalina Jurkiewicz^{1#},

Greta Steć^{1#},

mgr Adrian Szczepaniak^{1,2},

prof. dr hab. n. med. Jakub Fichna¹,

dr hab. n. med. Marta Zielińska^{1✉}

¹Zakład Biochemii, Katedra Chemii i Biochemii Medycznej, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

²Pracownia Neuroonkologii, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN, Warszawa

#równy udział autorów w pisaniu pracy

https://doi.org/10.18388/pb.2021_399

✉autor korespondujący: marta.zielinska@umed.lodz.pl

Słowa kluczowe: GPR18, receptory sieroce, receptory sprzężone z białkiem G, układ endokannabinoidowy

Wykaz skrótów: Abn-CBD – nieprawidłowy kannabidiol; ANA – anandamid; BV2 – linia komórkowa mysich komórek mikrogleju; Δ^9 -THC – Δ^9 -tetrahydrokannabinol; GPCR – receptor sprzężony z białkami G; LXA4 – lipoksyna A4; NAGly – *N*-arachidonyloglicyna; PGJ – prostaglandyna J; RvD2 – rezolwina D2

Finansowanie: Praca sfinansowana z Ministerstwa Edukacji i Nauki w ramach programu „Szkoła Orłów”, realizowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego (POWR.03.01.00-00-P015/18) oraz środków na działalność statutową dla Zakładu Biochemii, Katedry Chemii i Biochemii Medycznej (Uniwersytet Medyczny w Łodzi, #503/1-156-04/503-11-001-19-00 dla JF).

Wysoka ekspresja	Umiarkowana ekspresja	Niska ekspresja	Brak ekspresji
<ul style="list-style-type: none"> • Podwzgórze • Tarczyca • Leukocyty krwi obwodowej • Mózdzek • Pień mózgu 	<ul style="list-style-type: none"> • Płuca • Jajniki • Jądra • Grasica • Prążkowie 	<ul style="list-style-type: none"> • Kora mózgu • Wzgórze • Nadnercza • Jelito grube • Jelito cienkie • Nerki • Prostata • Skóra • Śledziona • Żołądek • Macica 	<ul style="list-style-type: none"> • Ciało migdałowe • Kora czolowa • Hipokamp • Wątroba • Mięśnie

Rycina 1. Poziom ekspresji receptora GPR18 w organizmie.

W 2006 roku Kohno i wsp. udowodnili wysoką ekspresję genu GPR18 w komórkach ludzkiej linii limfoidalnej HuT102 (ang. *Human T-cell lymphoma cell line*), natomiast nie zaobserwowali jego ekspresji w nielimfoidalnych liniach komórkowych. Co więcej, ekspresja genu receptora GPR18 była wyższa w limfocytach obwodowych (CD4+, CD4+C-D45RA+, CD4+ CD45RO+, CD8+, CD19+) w porównaniu do monocytów i komórek linii limfoidalnej [9].

Na podstawie analizy barwienia immunohistochemicznego wykazano, że receptor GPR18 zlokalizowany jest w błonie komórkowej, jak również wewnątrz komórki [10].

LIGANDY RECEPTORA GPR18

Receptor GPR18 wykazuje niską homologię w stosunku do pozostałych receptorów układu endokannabinoidowego – CB1 i CB2 (odpowiednio ~13% i ~8%), ale zidentyfikowano grupę endogennych, fitogennych oraz syntetycznych kannabinoidów, które posiadają zdolność aktywacji tego receptora [11].

Do agonistów receptora GPR18 zalicza się m.in. *N*-arachidonyloglicynę (ang. *N-Arachidonoylglycine*, NAGly), O-1602, nietypowy kannabidiol (ang. *abnormal cannabidiol*, Abn-CBD), Δ⁹-tetrahydrokannabinol (ang. Δ⁹-tetrahydrocannabinol, Δ⁹-THC), kannabidiol (ang. *cannabidiol*, CBD), anandamid (ang. *anamide*, ANA) i arachidonylocyklopropyloamid (ang. *arachidonoyl cyclopropylamide*, ACPA) (Tabela 1) [12]. Endogennym ligandem receptora GPR18

Tabela 1. Agoniści receptora GPR18 wg IUPHAR

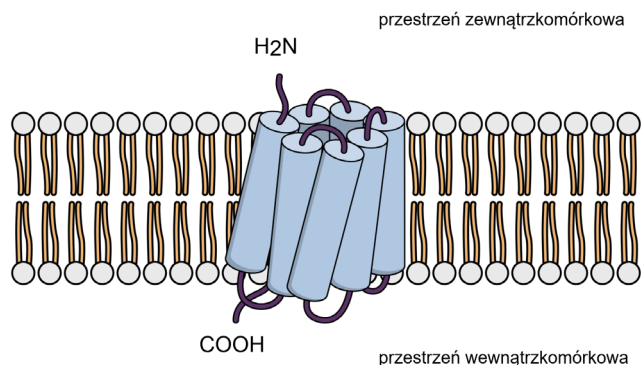
	GPR18	Receptor CB ₁	Receptor CB ₂
<i>N</i> -arachidonyloglicyna (NAGly)	pełny agonista	-	-
anandamid (ANA)	pełny agonista	częściowy agonista	częściowy agonista
O-1602	agonista	-	-
Δ ⁹ -tetrahydrokannabinol (Δ ⁹ -THC)	pełny agonista	częściowy agonista	częściowy agonista
nietypowy kannabidiol (Abn-CBD)	agonista	-	-
Arachidonylocyklopropyloamid (ACPA)	agonista	pełny agonista	-
kannabidiol (CBD)	częściowy agonista	-	-

jest rezolwina D2 – pochodna wielonienasyconych kwasów tłuszczowych [13]. Wśród antagonistów zidentyfikowano CB-5 i CB-27, O-1918 oraz CID-85469571 [14].

BUDOWA I ŚCIEŻKI SYGNAŁOWE RECEPTORA GPR18

Receptor GPR18 należy do klasy A (rodopsynopodobnych) receptorów sprzężonych z białkiem G, które zbudowane są z siedmiu transbłonowych α-helikalnych domen. GPR18, podobnie jak inne białka z rodziny GPCR, ma w swojej strukturze dwa końce po przeciwnych stronach błony komórkowej: N-końiec z wolną grupą aminową po zewnętrznej stronie błony komórkowej oraz C-końiec zakotwiczony w cytozolu. N-końiec zawiera miejsca glikozylacji oraz pętle zewnątrzkomórkowe, które uczestniczą m.in. w wiązaniu ligandów, natomiast C-końiec - miejsca fosforylacji dla kinaz receptorowych sprzężonych z białkiem G (ang. *G protein-coupled receptor kinase*, GRK) i wraz z trzecią pętlą cytoplazmatyczną łączy się z białkiem G wewnątrz komórki (Ryc. 2). Po przyłączeniu ligandu do receptora GPR18 dochodzi do zmiany konformacji białka, aktywacji białka G poprzez wymianę GDP na GTP i zapoczątkowania kaskady sygnałowej, co skutkuje modyfikacją specyficznych białek efektorowych – cykazy adenylanowej, fosfolipazy C i D, kanałów jonowych, powodując zmianę stężenia wtórnych przekaźników: cyklicznego AMP (ang. *cyclic adenosine monophosphate*, cAMP), trifosforanu inozytolu (ang. *inositol triphosphate*, IP3), Ca²⁺ i w dalszej kolejności fosforylację i defosforylację odpowiednich białek [15]. W przypadku fosforylacji receptora GPCR przez kinazy GRK dochodzi do rekrutacji β-arrestyn, co powoduje jego desensytyzację i internalizację oraz aktywację ścieżki sygnałowej niezależnej od białka G [16].

Receptor GPR18 wykazuje wysoką aktywność konstytutywną [17,18]. Receptor utrzymuje stan nieaktywny (R) dzięki obecności mostka solnego, zwanego „kluczem elektrolitycznym”, który jest tworzony zwykle przez parę przeciwnie naładowanych aminokwasów, znajdujących się na wewnątrzkomórkowym końcu trzeciej i szóstej domeny przezbłonowej (ang. *transmembrane helix 3 and 6*, TMH3, TMH6). Aktywacja receptora (R*), równoznaczna ze zmianą jego konformacji, klasycznie wywoływana jest przez przyłączenie agonisty. Aktywność konstytutywna pozwala receptorowi GPR18 osiągnąć stan aktywności bez udziału



Rycina 2. Struktura receptora GPR18

ligandów. Helisa transbłonowa TMH6 przemieszcza się od rdzenia receptora na zewnątrz, powodując zwiększenie dystansu między TMH3 i TMH6, a tym samym zerwanie „kluźca elektrolitycznego”, co wywołuje wewnątrzkomórkową lukę, w którą białko G wprowadza swoją helisę α -5 i dochodzi do połączenia z receptorem i uruchomienia kaskady sygnałowej [17-19].

W badaniu przeprowadzonym w 2014 r. przez Console-Bram i wsp. z użyciem komórek linii HEK293 (ang. *human embryonic kidney cells*) z nadekspresją receptora GPR18 zanotowano wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} i kinazy aktywowanej mitogenami (ang. *mitogen-activated protein kinase*, MAPK) w obecności pięciu ligandów kannabinoidowych: Δ^9 -THC, Abn-CBD, NAGly, O-1602 i O-1918. Ponadto zaobserwowano, że Δ^9 -THC, wiążąc się z receptorem GPR18, działa przez ścieżkę molekularną z udziałem β -arrestyny. Było to pierwsze badanie wskazujące na możliwą transdukcję sygnału przez receptor GPR18 [10]. W celu identyfikacji białek G biorących udział w przekazywaniu sygnału przez receptor GPR18, komórki HEK293-GPR18 poddano inkubacji z selektywnymi inhibitorami białek G, tj. toksyną krztuśca (ang. *pertussis toxin*, PTX) – inhibitorem $G_{ai/o}$ oraz substancją P – inhibitorem G_{aq} . Hamowanie wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} i aktywności MAPK, spowodowanego uprzednią aktywacją agonistami: NAGly, O-1602, AbnCBD i O-1918, uzyskane po zastosowaniu PTX, potwierdziło udział białka $G_{ai/o}$ w przekazywaniu sygnału przez receptor GPR18. Efekt działania Δ^9 -THC nie został całkowicie zablokowany przez PTX. Wewnątrzkomórkowy wzrost stężenia Ca^{2+} związany z działaniem ligandów: NAGly, Δ^9 -THC, O-1918 został również zahamowany przez substancję P, co świadczy o zaangażowaniu białka G_{aq} w przekazywanie sygnału przez receptor GPR18.

Na zaangażowanie obu białek G w przekazanie sygnału w przypadku aktywacji receptora GPR18 wskazuje fakt, że substancja P zablokowała całkowicie pierwotny i wtórny wzrost stężenia wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} wywołany zastosowaniem agonistów receptora GPR18; z kolei PTX zablokował jedynie pierwotny wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} , podczas gdy wtórny wzrost stężenia wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} został zachowany. Zahamowana została aktywacja kinazy białkowej C i fosforylacja kinaz ERK1/2 (ang. *extracellular signal-regulated kinase*, ERK) [10].

W 2013 r. Lu i wsp. wykonali badanie z wykorzystaniem szczurzych komórek nerwowych pochodzących ze zwoju szyjnego górnego i wykazali, że uprzednio zdefiniowani agoniści receptora GPR18: NAGly, ANA, Abn-CBD, O-1602 najprawdopodobniej nie działają przez klasyczne ścieżki sygnałowe, które podlegały badaniu [19].

Wyniki powyżej opisanych doświadczeń wskazują na wielotorowe działanie ligandów receptora GPR18. Udowodniono selektywność stroniczą, związaną z możliwością aktywacji różnych ścieżek sygnałowych przez ten sam ligand, co poniekąd wyjaśnia niespójności w literaturze dotyczące modulacji receptora GPR18 za pomocą różnych ligandów [10].

ROLA RECEPTORA GPR18 W FIZJOLOGII

Układ endokannabinoidowy odgrywa rolę w regulacji szerokości światła naczyń krwionośnych i ciśnienia tętniczego [20-27]. Wykazano, że aktywacja receptora GPR18 wywiera wpływ na napięcie mięśniówki tętnic oraz moduluje pobudzenie autonomicznego układu nerwowego, tym samym biorąc udział w regulacji ciśnienia tętniczego [23-26].

Agonista receptora GPR18, Abn-CBD, powoduje rozszerzenie tętnic krezkowych w reakcji zależnej od śródbłonna i wywołuje efekt hipotensyjny u myszy pozbawionych receptorów CB1/CB2 [20]. Aktywacja ta jest hamowana przez PTX oraz inhibitor kanału BK(Ca) (charybdotoksynę), natomiast nie jest hamowana przez inhibitor syntazy NO. Analog kannabidiolu – O-1918, który jest antagonistą receptora GPR18, powoduje zależną od stężenia inhibicję działania wazorelaksacyjnego Abn-CBD i anandamidu [21]. NAGly ma udowodnione działanie wazorelaksacyjne w tętnicach krezkowych szczurów: aktywuje receptor GPR18 i ścieżkę związaną z białkiem $G(i/o)$, w wyniku czego dochodzi do uwolnienia NO, który następnie oddziałuje na kanały dla jonów Ca^{2+} – BK(Ca) w mięśniach gładkich ściany tętnic. Możliwe jest bezpośrednie oddziaływanie NAGly poprzez receptor związany z białkiem $G(i/o)$ na kanały BK(Ca) w mechanizmie niezależnym od tlenu azotu [22].

Matouk i wsp. wykazali kardioprotekcyjne działanie Abn-CBD w modelu zwierzęcym kardiomiopatii cukrzycowej [23]. Przewlekła aktywacja receptora GPR18 zlokalizowanego w sercu przez Abn-CBD powoduje obniżenie ciśnienia tętniczego, znosi dominację współczulną w mięśniu sercowym oraz powoduje poprawę funkcji lewej komory – zwiększa kurczliwość oraz obniża ciśnienie końcoworozkurczowe w lewej komorze u szczurów. W badaniach tych wykazano, że Abn-CBD powoduje wzrost stężenia adiponektyny w sercu i osoczu, podwyższoną ekspresję syntazy NO w nabłonku aorty oraz wzrost stężenia NO, a także obniżenie stresu oksydacyjnego w mięśniu sercowym w porównaniu z grupą kontrolną. Antagonista receptora GPR18 – O-1918 powodował zniesienie tych efektów, co potwierdza mechanizm zależny od receptora GPR18 [23]. W kolejnych badaniach zaobserwowano, że Abn-CBD powoduje podwyższenie ekspresji syntazy NO

i wzrost stężenia NO w komórkach nabłonkowych aorty królików, efekt ten był również zależny od receptora GPR18 [24].

W badaniach Penumarti i Abdel-Rahman udowodnili ekspresję receptora GPR18 w przedwspółczulnych neuronach zlokalizowanych w dogłowym brzuszno-bocznym obszarze rdzenia przedłużonego (ang. *rostral ventrolateral medulla*, RVLm). Aktywacja lub blokowanie tych receptorów powoduje zmianę ciśnienia tętniczego u szczurów [25,26]. Ponadto aktywacja receptorów GPR18 zlokalizowanych w RVLm powoduje podwyższenie stężenia adiponektyny i NO oraz obniża stres oksydacyjny w RVLm, podczas gdy blokada tego receptora wywołuje odwrotną odpowiedź neurochemiczną. Adiponektyna zawarta w RVLm obniża ciśnienie tętnicze oraz produkcję reaktywnych form tlenu, a także podwyższa stężenie NO w RVLm. Selektywny antagonist receptoru GPR18 – O-1918 znosi hipotensję wywołaną przez Abn-CBD [25]. Ponadto O-1918 powoduje odpowiedź presyjną i podwyższenie ciśnienia tętniczego. Wykazano, że jednoczesne pobudzenie receptora CB1 powoduje osłabienie hipotensji powstającej w odpowiedzi na NAGly [26]. Podsumowując, potwierdzono obecność receptorów GPR18 w obrębie przedwspółczulnych neuronów w RVLm, które biorą udział w modulacji tonicznego pobudzenia układu współczulnego, co świadczy o udziale receptora GPR18 w ośrodkowej regulacji ciśnienia tętniczego.

W badaniach wykazano również udział receptora GPR18 w regulacji przepływu krwi przez naczynia siatkówki. Aktywacja receptora GPR18 zlokalizowanego w śródbłonku naczyń siatkówki przez Abn-CBD oraz NAGly, powoduje hamowanie skurczu tętniczek siatkówki, wywołanego przez endotelinę 1 [27].

OCENA DZIAŁANIA PRZECIWZAPALNEGO LIGANDÓW RECEPTORA GPR18

Zapalenie jest procesem obronnym organizmu mającym na celu usunięcie czynnika chorobotwórczego oraz przywrócenie homeostazy w organizmie [28]. W wygaszaniu stanu zapalnego uczestniczą liczne mediatory lipidowe, będące produktami przemian wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, m.in. kwasu arachidonowego (ang. *arachidonic acid*, AA) lub kwasu dokozaheksaenowego (ang. *docosahexaenoic acid*, DHA) [29].

W 2011 roku Burstein i wsp. przeprowadzili serię badań mających na celu potwierdzenie udziału NAGly w wygaszaniu stanu zapalnego i ustalenie roli receptora GPR18 w tym procesie [28]. Do eksperymentów wykorzystano komórki linii HEK293 z nadekspresją receptora GPR18 (HEK293-GPR18), które były inkubowane z NAGly i TNF- α (ang. *tumor necrosis factor α* , TNF- α) (10 ng/ml), co wywołało wzrost stężenia 15-deoksydelta-13, 14-PGJ2 (ang. *15-deoxy-delta-12,14-prostaglandin J2*, PGJ) oraz lipoksyny A4 (ang. *lipoxine A4*, LXA4) – cząsteczek uczestniczących w wygaszaniu procesu zapalnego, będących pochodnymi kwasu arachidonowego [30,31]. Inkubacja komórek z poliklonalnymi przeciwciałami skierowanymi przeciw receptorowi GPR18 istotnie obniżyła tę odpowiedź, co wska-

zuje na udział tego receptora w opisywanym procesie. Zbadano również wpływ NAGly na przeżywalność komórek HEK293-GPR18. Wykorzystując metodę barwienia aneksyną V-FITC oraz jodkiem propidyny, udowodniono, że aktywacja receptora GPR18 przez NAGly powoduje apoptozę komórek, co stanowi istotny krok w eliminacji stanu zapalnego. Efekt ten został całkowicie zablokowany po zastosowaniu przeciwciał anti-GPR18.

W ramach powyższych badań, prowadzonych przez Burstein i wsp., przeciwzapalne działanie NAGly zostało potwierdzone w mysim modelu zapalenia otrzewnej [28]. Mysiom podano dootrzewnowo tioglikolan sodu powodujący stan zapalny, a po 3 godzinach z jamy otrzewnej wyizolowano komórki. Doustne podanie zwierzętom NAGly, poprzedzające dootrzewnową iniekcję tioglikolanu sodu, spowodowało spadek liczby monocytów i neutrofilów w miejscu zapalenia o ponad 50% w stosunku do grupy kontrolnej. W tej części badania nie został jednak zbadany i potwierdzony udział receptora GPR18.

Kolejnym agonistą receptora GPR18 o udowodnionej aktywności przeciwzapalnej jest rezolwina D2 (ang. *resolvine D2*, RvD2), będąca pochodną kwasu dokozaheksaenowego (DHA). Chiang i wsp. wykazali, że RvD2 poprzez interakcję z receptorem GPR18 uczestniczy w hamowaniu ostrej odpowiedzi zapalnej [13]. Pierwszą linię obrony w zakażeniach organizmu stanowią m.in. makrofagi, które są zaangażowane w odpowiedź odpornościową poprzez proces fagocytozy. Początkowe badania *in vitro* na ludzkich makrofagach wskazały, że w obecności RvD2 makrofagi z nadekspresją receptora GPR18 znacznie efektywniej przeprowadzały proces fagocytozy w porównaniu do komórek, w których receptor ten został zablokowany przez specyficzne shRNA – zarówno w przypadku zymosanu, jak i bakterii *Escherichia coli*.

Wykorzystując model zapalenia otrzewnej indukowany przez zymosan, oceniono, czy nadekspresja receptora GPR18 u myszy może wzmacniać działanie przeciwzapalne RvD2 w stosunku do myszy z wyciszoną ekspresją tego genu [13]. Mysie makrofagi wyizolowane z jamy otrzewnej poddano transfekcji w celu uzyskania wysokiej ekspresji receptora GPR18, następnie te komórki z rezolwiną D2 wstrzyknięto myszom w ostrym stanie zapalnym. Udowodniono, że w przypadku myszy z wyciszoną ekspresją receptora GPR18 szczyt infekcji następował później niż w grupie z nadekspresją tego receptora. Zwiększała się także migracja neutrofilów do miejsca zakażenia, natomiast eferocytoza neutrofilów apoptycznych była mniej efektywna. Badania te powtórzono w modelach zapalenia wywołanych przez *Escherichia coli* oraz *Staphylococcus aureus*. Uzyskano podobne wyniki, tj. podanie RvD2 myszom z nadekspresją GPR18 spowodowało obniżoną infiltrację neutrofilów, zwiększenie efektywności fagocytozy komórek bakteryjnych oraz przyśpieszenie wygaszenia zapalenia.

Wyniki powyższych badań dowodzą, że rezolwina D2 poprzez modulację receptora GPR18 może wpływać hamująco na pojawiający się ostry stan zapalny w organizmie.

DZIAŁANIE NEUROIMMUNOMODULACYJNE LIGANDÓW RECEPTORA GPR18

Liczba komórek glejowych w mózgu jest 10-50 razy większa niż liczba neuronów. Około 10% komórek glejowych stanowią komórki mikrogleju, które są pierwszą linią obrony w przypadku wystąpienia bodźców uszkodzających ośrodkowy układ nerwowy. W przypadku aktywacji, komórki te ulegają proliferacji, przyjmują formę ameboidalną i migrują w kierunku uszkodzenia, a także wydzielają czynniki prozapalne [32-35]. Układ endokannabinoidowy reguluje migrację mikrogleju poprzez receptor CB2 i GPR18, receptor CB1 nie jest zaangażowany w ten proces [36]. W badaniu z 2010 roku wykazano, że NAGly indukuje migrację mikrogleju, a odpowiedź ta jest dwa razy silniejsza niż wywołana przez czynniki chemotaktyczne uwalniane podczas uszkodzenia lub infekcji mózgu, takie jak N-formylo-metionilo-leucylo-fenylalaninę (ang. *N-Formylmethionine-leucyl-phenylalanine*, fMLP) i kwas lizofosfatydowy (ang. *lysophosphatidic acid*, LPA) [37]. Komórki mysiego mikrogleju (BV-2) wykazują chemotaksję i przemieszczają się w kierunku źródła NAGly. Odpowiedź wywołana przez NAGly, Abn-CBD i O-1602 była hamowana poprzez zastosowanie antagonisty receptora GPR18 – O-1918 w komórkach BV-2 i HEK293-GPR18. Ponadto zastosowanie PTX zahamowało migrację tych komórek w odpowiedzi na NAGly, co świadczy o udziale białka Gi/o w mechanizmie transdukcji sygnału przez receptor GPR18. W badaniu tym oceniono również wpływ NAGly na fosforylację białek p44/42, JNK, MAPK oraz p38 MAPK, które odgrywają kluczową rolę w proliferacji, różnicowaniu, migracji i śmierci komórek. Kolejnym dowodem na udział receptora GPR18 w migracji komórek mikrogleju w kierunku źródła wydzielania NAGly jest badanie z 2012 roku. W wyniku użycia siRNA wiążącego się do receptora GPR18 w komórkach BV-2 nastąpiło zahamowanie migracji komórek, wywołanej przez NAGly [38]. Co więcej, wykazano, że NAGly, 2-Arachidonylglicerol (ang. *2-Arachidonylglicerol*, 2-AG) i ANA pobudzają proces mitozy i wpływają na proliferację komórek BV-2 [39].

ROLA RECEPTORA GPR18 W JASKRZE

Ciśnienie śródgałkowe regulowane jest przez odpływ cieczy wodnistej z przedniej komory oka przez kąć przesączania. Zachowanie prawidłowych wartości tego ciśnienia odgrywa kluczową rolę w rozwoju jaskry. Wykryto wysoką ekspresję receptora GPR18 w komorze przedniej oka mysiego, której lokalizacja w dużej mierze odpowiada ekspresji receptora CB1. Receptor GPR18 występuje w komórkach nabłonka rzęskowego, rogówce oraz w strukturach beczkowatych kąta przesączania oka (kąta rogówkowo-tęczówkowego). Taka lokalizacja wskazuje na potencjalny udział receptora GPR18 w przepływie cieczy wodnistej i regulacji ciśnienia wewnątrzgałkowego. W komorze przedniej oka wykryto wysokie stężenie NAGly, agonisty receptora GPR18, odpowiadające jego stężeniu w mózgowiu, a także wyjątkowo wysokie stężenie ANA, który jest prekursorem dla NAGly [40]. W badaniu wykazano, że wybrani agonści receptora GPR18 – Abn-CBD i NAGly obniżają ciśnienie śródgałkowe, natomiast ich działanie jest blokowane w przypadku zastosowania O-1918 – antagonisty receptora GPR18. Działanie tych ligandów receptora GPR18 jest

niezależne od receptorów CB1, CB2 i GPR55 [40]. Δ^9 -THC również obniża ciśnienie śródgałkowe, działając przez receptory GPR18 i CB1; jego silniejsze działanie stwierdzono u myszy płci męskiej, co może być związane z wyższą ekspresją receptorów GPR18 i CB1 na poziomie mRNA u samców [41].

RECEPTOR GPR18 W CZERNIAKU Z PRZERZUTAMI

Ze względu na liczne doniesienia o udziale receptorów rodziny GPCR w nowotworzeniu, w 2010 roku Qin i wsp. ocenili poziom ekspresji wybranych receptorów GPCR u pacjentów ze zmianami skórnymi o charakterze nowotworowym w celu wykrycia nowych potencjalnych punktów uchwytu dla terapii przeciwnowotworowej [17]. Metodą real time PCR zbadano poziom ekspresji 94 receptorów GPCR w grupie pacjentów, u których stwierdzono zmiany o zróżnicowanym stopniu złośliwości, od znamion łagodnych po czerniaka z przerzutami. Receptor GPR18 wykazuje istotne różnice w ekspresji w zależności od złośliwości zmiany. Z tego powodu postanowiono poddać receptor GPR18 dalszej analizie na linii komórkowej czerniaka, by ocenić, czy uczestniczy w proliferacji i śmierci komórki. Wykorzystano w tym celu komórki czerniaka Cmel 0709 (ang. *melanoma cell culture derived from a lymph node metastasis*) z nadekspresją receptora GPR18. Zablockowanie receptora GPR18 z wykorzystaniem siRNA wywołało zwiększenie liczby komórek będących w trakcie apoptozy, sugerując zaangażowanie tego receptora w śmierć komórki.

DZIAŁANIE PRZECIWNOWOTWOROWE LIGANDÓW RECEPTORA GPR18

Udział ligandów receptora GPR18 w procesie nowotworzenia udowodniono na dwóch liniach komórkowych raka piersi opornych na paklitaksel- MDA-MB-231 oraz MCF-7 [42]. W badaniu tym oceniono wpływ Abn-CBD oraz O-1602 na żywotność, apoptozę oraz migrację komórek. Wykazano, że obydwie związki obniżają żywotność komórek tych linii poprzez indukcję apoptozy. Badane związki w istotnym stopniu zahamowały migrację komórek linii MDA-MB-231. Działanie to zostało całkowicie zniesione poprzez użycie siRNA GPR55 i GPR18.

PODSUMOWANIE

W artykule podsumowaliśmy wiedzę na temat receptora GPR18, zaliczanego wcześniej do receptorów sierocych, obecnie sklasyfikowanego jako receptor endokannabinoidowy – ze względu na wspólne ligandy z receptorami kanabinoidowymi. Przegląd literatury wskazuje, że modulacja aktywności receptora GPR18 stwarza możliwości w terapii chorób zapalnych ze względu na udowodnioną skuteczność jego agonistów, m.in. NAGly i rezolwiny D2, w wygaszaniu stanu zapalnego.

Wykazano udział receptora GPR18 w procesie nowotworzenia. Wskazane różnice w ekspresji receptora w zależności od złośliwości zmian barwnikowych w czerniaku mogą uczynić receptor GPR18 czynnikiem predykcyjnym i prognostycznym. Dodatkowym atutem Abn-CBD i O-1602, agonistów receptora GPR18, jest brak ośrodkowego działa-

nia sedacyjnego i efektów psychoaktywnych, co sprawia, że mogą reprezentować nowy kierunek dla rozwoju leczenia onkologicznego, gdy pojawi się oporność na konwencjonalną chemioterapię.

Co więcej, wykazano udział receptora GPR18 w obniżaniu ciśnienia tętniczego. Nadciśnienie tętnicze jest jedną z chorób cywilizacyjnych, dlatego niezwykle cenne jest poszukiwanie skuteczniejszych metod leczenia tego schorzenia. Aktywacja receptora GPR18 ma wpływ wazorelaksacyjny na tętnice obwodowe oraz działa osrodkowo poprzez pobudzenie układu współczulnego, co niesie nadzieje w leczeniu tego schorzenia.

Obecność receptora GPR18 w strukturach oka i udowodniony wpływ jego ligandów na zmiany ciśnienia w gałce ocznej mogą wskazywać ten receptor jako potencjalny cel działania farmaceutyków obniżających ciśnienie śródgałkowe.

Istnieje możliwość zastosowania ligandów receptora GPR18 w leczeniu chorób neurodegeneracyjnych. Wspólnym elementem w patogenezie tego rodzaju schorzeń jest aktywacja komórek mikrogleju w procesie zapalnym. Wykazano, że ligandy aktywujące receptor GPR18, mogą wpływać na proliferację, różnicowanie, migrację oraz apoptozę mikrogleju.

Biorąc pod uwagę powyższe, istotne wydaje się prowadzenie dalszych badań skoncentrowanych na receptorze GPR18, gdyż zrozumienie jego udziału w procesach zachodzących w organizmie może przyczynić się do powstania nowych interwencji terapeutycznych.

PIŚMIENNICTWO

- Allen JA, Roth BL (2011) Strategies to Discover Unexpected Targets for Drugs Active at G Protein-Coupled Receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 51: 117-144
- Fredriksson R, Lagerström MC, Lundin LG, Schiöth HB (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol Pharmacol* 63: 1256-1272
- King N, Hittinger CT, Carroll SB (2003) Evolution of key cell signaling and adhesion protein families predates animal origins. *Science* 301: 361-363
- Schiöth HB, Nordström KJV, Fredriksson R (2007) Mining the gene repertoire and ESTs for G protein-coupled receptors with evolutionary perspective. *Acta Physiologica* 190: 21-31
- Craig Venter J, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG i wsp. (2001) The sequence of the human genome. *Science* 291: 1304-1351
- Gantz I, Muraoka A, Yang YK, Samuelson LC, Zimmerman EM, Cook H i wsp. (1997) Cloning and chromosomal localization of a gene (GPR18) encoding a novel seven transmembrane receptor highly expressed in spleen and testis. *Genomics* 42: 462-466
- Rosenkilde MM, Benned-Jensen T, Andersen H, Holst PJ, Kledal TN, Lüttichau HR i wsp. (2006) Molecular pharmacological phenotyping of EBI2. An orphan seven-transmembrane receptor with constitutive activity. *J Biol* 281: 13199-13208
- Vassilatis DK, Hohmann JG, Zeng H, Li F, Ranchalis JE, Mortrud MT i wsp. (2003) The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 4903-4908
- Kohno M, Hasegawa H, Inoue A, Muraoka M, Miyazaki T, Oka K i wsp. (2006) Identification of N-arachidonylglycine as the endogenous ligand for orphan G-protein-coupled receptor GPR18. *Biochem Biophys Res Commun* 347: 827-832
- Console-Bram L, Brailoiu E, Brailoiu GC, Sharir H, Abood ME (2014) Activation of GPR18 by cannabinoid compounds: a tale of biased agonism. *Br J Pharmacol* 171: 3908-3917
- Ye L, Cao Z, Wang W, Zhou N (2019) New Insights in Cannabinoid Receptor Structure and Signaling. *Curr Mol Pharmacol* 12: 239-248
- McHugh D (2012) GPR18 in microglia: Implications for the CNS and endocannabinoid system signalling. *British Journal of Pharmacology* 167: 1575-1582
- Chiang N, Dalli J, Colas RA, Serhan CN (2015) Identification of resolvin D2 receptor mediating resolution of infections and organ protection. *J Exp Med* 212: 1203-1217
- Rempel V, Atzler K, Behrenswerth A, Karcz T, Schoeder C, Hinz S i wsp. (2014) Bicyclic imidazole-4-one derivatives: A new class of antagonists for the orphan G protein-coupled receptors GPR18 and GPR55. *Medchemcomm* 5: 632-649
- Im DS (2002) Orphan G Protein-Coupled Receptors and Beyond. *Jpn J Pharmacol* 90: 101-106
- Shukla AK, Xiao K, Lefkowitz RJ (2011) Emerging paradigms of β -arrestin-dependent seven transmembrane receptor signaling. *Trends in Biochemical Sciences* 36: 457-469
- Qin Y, Verdegaal EME, Siderius M, Bebelman JP, Smit MJ, Leurs R i wsp. (2011) Quantitative expression profiling of G-protein-coupled receptors (GPCRs) in metastatic melanoma: the constitutively active orphan GPCR GPR18 as novel drug target. *Pigment Cell Melanoma Res* 24: 207-218
- Finlay DB, Joseph WR, Grimsey NL, Glass M (2016) GPR18 undergoes a high degree of constitutive trafficking but is unresponsive to N-Arachidonoyl Glycine. *Peer J* 4:e1835
- Lu VB, Puhl HL, Ikeda SR (2013) N-arachidonoyl glycine does not activate G protein-coupled receptor 18 signaling via canonical pathways. *Mol Pharmacol* 83: 267-282
- Járai Z, Wagner JA, Varga K, Lake KD, Compton DR, Martin BR i wsp. (1999) Cannabinoid-induced mesenteric vasodilation through an endothelial site distinct from CB1 or CB2 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 14136-14141
- Offertáler L, Mo FM, Bátkaí S, Liu J, Begg M, Razdan RK i wsp. (2003) Selective ligands and cellular effectors of a G protein-coupled endothelial cannabinoid receptor. *Mol Pharmacol* 63: 699-705
- Parmar N, Ho WSV (2010) N-arachidonoyl glycine, an endogenous lipid that acts as a vasorelaxant via nitric oxide and large conductance calcium-activated potassium channels. *Br J Pharmacol* 160: 594-603
- Matouk AI, Taye A, El-Moselhy MA, Heeba GH, Abdel-Rahman AA (2017) The effect of chronic activation of the novel endocannabinoid receptor GPR18 on myocardial function and blood pressure in conscious rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 69: 23-33
- McCollum LT, Howlett AC, Mukhopadhyay S (2007) Anandamide-mediated CB1/CB2 cannabinoid receptor-independent nitric oxide production in rabbit aortic endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 321: 930-937
- Penumarti A, Abdel-Rahman AA (2014) Neuronal nitric oxide synthase-dependent elevation in adiponectin in the rostral ventrolateral medulla underlies G protein-coupled receptor 18-mediated hypotension in conscious rats. *J Pharmacol Exp Ther* 351: 44-53
- Penumarti A, Abdel-Rahman AA (2014) The novel endocannabinoid receptor GPR18 is expressed in the rostral ventrolateral medulla and exerts tonic restraining influence on blood pressure. *J Pharmacol Exp Ther* 349: 29-38
- Macintyre J, Dong A, Straiker A, Zhu J, Howlett SE, Bagher A i wsp. (2014) Cannabinoid and lipid-mediated vasorelaxation in retinal microvasculature. *Eur J Pharmacol* 735: 105-114
- Burstein SH, McQuain CA, Ross AH, Salmonsens RA, Zurier RE (2011) Resolution of inflammation by N-arachidonoylglycine. *J Cell Biochem* 112: 3227-3233
- Stables MJ, Gilroy DW (2011) Old and new generation lipid mediators in acute inflammation and resolution. *Prog Lipid Res* 50: 35-51

30. Herlong JL, Scott TR (2006) Positioning prostanoids of the D and J series in the immunopathogenic scheme. *Immunol Lett* 102: 121–131
31. Bannenberg G, Serhan CN (2010) Specialized pro-resolving lipid mediators in the inflammatory response: An update. *Biochim Biophys Acta* 1801: 1260–1273
32. Banati RB (2003) Neuropathological imaging: *in vivo* detection of glial activation as a measure of disease and adaptive change in the brain. *British Medical Bulletin* 65: 121–131
33. Walter L, Franklin A, Witting A, Wade C, Xie Y, Kunos G i wsp. (2003) Nonpsychotropic cannabinoid receptors regulate microglial cell migration. *J Neurosci* 23: 1398–1405
34. Lorton D, Schaller J, Lala A, De Nardin E (2000) Chemotactic-like receptors and A β peptide induced responses in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 21: 463–473
35. Schilling T, Stock C, Schwab A, Eder C (2004) Functional importance of Ca²⁺-activated K⁺ channels for lysophosphatidic acid-induced microglial migration. *Eur J Neurosci* 19: 1469–1474
36. Franklin A, Stella N (2003) Arachidonylcyclopropylamide increases microglial cell migration through cannabinoid CB2 and abnormal-cannabidiol-sensitive receptors. *Eur J Pharmacol* 474: 195–198
37. Mchugh D, Sj Hu S, Rimmerman N, Juknat A, Vogel Z, Walker JM i wsp. (2010) N-arachidonoyl glycine, an abundant endogenous lipid, potentially drives directed cellular migration through GPR18, the putative abnormal cannabidiol receptor. *BMC Neuroscience* 11: 44
38. McHugh D, Wager-Miller J, Page J, Bradshaw HB (2012) siRNA knockdown of GPR18 receptors in BV-2 microglia attenuates N-arachidonoyl glycine-induced cell migration. *J Mol Signal* 7: 10
39. Carrier EJ, Kearns CS, Barkmeier AJ, Breese NM, Yang W, Nithipatikom K i wsp. (2004) Cultured rat microglial cells synthesize the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol, which increases proliferation via a CB2 receptor-dependent Mechanism. *Mol Pharmacol* 65: 999–1007
40. Caldwell MD, Hu SS-J, Viswanathan S, Bradshaw H, Kelly ME, Straiker A (2013) A GPR18-based signalling system regulates IOP in murine eye. *Br J Pharmacol* 169: 834–843
41. Miller S, Daily L, Leishman E, Bradshaw H, Straiker A (2018) Δ 9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol differentially regulate intraocular pressure. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 59: 5904–5911
42. Tomko A, O'Leary L, Trask H, Achenbach JC, Hall SR, Goralski KB i wsp. (2019) Antitumor activity of abnormal cannabidiol and its analog O-1602 in taxol-resistant preclinical models of breast cancer. *Front Pharmacol* 10: 1–12

GPR18 receptor - the structure and the role in the physiology and pathophysiology

Michalina Jurkiewicz^{1#}, Greta Steć^{1#}, Adrian Szczepaniak^{1,2}, Jakub Fichna¹, Marta Zielińska¹✉

¹Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Medical University of Lodz, Lodz, Poland, ²Laboratory of Neuro-Oncology, Mossakowski Medical Research Institute, Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland

#equal contribution

✉Corresponding author: marta.zielinska@umed.lodz.pl

Keywords: GPR18, orphan receptors, G protein-coupled receptors, endocannabinoid system

SUMMARY

G-protein coupled receptors constitute the largest family of membrane receptors and they participate in the maintenance of the homeostasis in the body. Some of these receptors still remain orphan receptors as there is insufficient research and ambiguous evidence concerning their function and endogenous ligands. For a long time, GPR18 belonged to this group, but recently it has been classified as an endocannabinoid receptor due to its affinity to cannabinoid ligands. GPR18 receptor is expressed in the encephalon, thyroid gland, leukocytes, lungs and testicles. The modulatory role of GPR18 receptor has been proven in the regulation of intraocular pressure, neuroimmunomodulation, regulation of arterial blood pressure and in metabolic disorders. In this article we summarize the current knowledge concerning the GPR18 receptor - its expression, ligands and the in the physiological processes and the pathophysiological conditions.

