



ACADEMIA ROMÂNĂ
Școala de Studii Avansate a Academiei Române
Institutul de Biochimie

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**Modulatori ai secreției hormonului GLP-1 implicat în boli
metabolice.**

**Mecanisme de semnalizare ale receptorului GPR27, un nou
receptor adrenergic atipic**

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT
Dr. Ștefana-Maria Petrescu

DOCTORAND
Sorina-Andreea Anghel

2025

Cuprins

Abrevieri	5
Scopul tezei	9
Partea I	12
1. INTRODUCERE	13
1.1 Metabolismul glucozei și diabetul zaharat.....	13
1.1.1 Reglarea și metabolismul celular al glucozei	13
1.1.2 Patologiile secolului 21, obezitatea și diabetul zaharat.....	17
1.2 Hormonul GLP-1	18
1.2.1 Procesarea și reglarea secreției hormonului GLP-1	18
1.2.2 Metode de determinare a hormonului GLP-1 și strategii de identificare ale potențialilor secretagogi	22
2. MATERIALE ȘI METODE	24
2.1 Materiale	24
2.2 Linii celulare	24
2.3 Western blot	25
2.4 Secreția peptidei GLP-1	25
2.4.1 Testul de secreție folosind linia celulară reporter GLUTag-NLuc	25
2.4.2 ELISA.....	27
2.5 Testarea librăriei de compuși naturali.....	27
2.6 Testul de citotoxicitate bazat pe luciferază.....	27
2.7 Determinarea absorbției glucozei	27
2.8 Determinarea nivelului de ATP intracelular	28
2.9 Analiza statistică	28
3. REZULTATE ȘI DISCUȚII	29
3.1 Linia celulară GLUTag-NLuc exprimă constructul mProglucagon-NanoLuc, luciferaza fiind secretată în mediul extracelular.....	29
3.2 Linia celulară GLUTag-NLuc răspunde la secretagogi cunoscuți.....	29
3.3 Noi compuși naturali au fost identificați ca modulatori ai secreției hormonului GLP-1, folosind linia celulară reporter GLUTag-NLuc	32
3.4 Compușii naturali identificați nu sunt toxici și nu intervin în sinteza hormonului GLP-1	33

3.5 Secreția hormonului GLP-1 indusă de quercetină este dependentă de concentrație și de timp	34
3.6 Secretagogii identificați urmează calea clasică de stimulare a secreției hormonului GLP-1, dependentă de calciu și glucoză.....	35
3.7 Quercetina intervine în metabolismul celular al glucozei	37
4. CONCLUZII ȘI PERSPECTIVE	40
Partea II.....	42
1. INTRODUCERE	43
1.1 Receptori cuplați cu proteine G	43
1.2 GPR27, ce se cunoaște până la momentul actual?	46
2. MATERIALE ȘI METODE	52
2.1 Materiale	52
2.2 Plasmide și ARN interferent	53
2.3 Linii celulare	55
2.4 SDS-PAGE, western blot și coimunoprecipitare	55
2.5 Determinarea expresiei receptorilor la nivelul membranei plasmatică prin testul ELISA	56
2.6 Determinarea AMPc intracelular	57
2.7 Determinarea activării elementelor de răspuns ale factorilor de transcripție	57
2.8 Recrutarea β -arestinei 2	57
2.9 RT-qPCR	58
2.10 Secreția insulinei în linia celulară INS1E	58
2.11 Determinarea calciului intracelular în linia celulară INS1E	59
2.12 Analiza statistică	59
3. REZULTATE ȘI DISCUȚII	60
3.1 Receptorul GPR27 se exprimă la membrana plasmatică în linia celulară HEK293T	60
3.2 Receptorul GPR27 scade nivelul de AMPc intracelular independent de proteinele G ...	60
3.3 Receptorul himeric GPR27- β 1AR răspunde la liganzi adrenergici.....	61
3.4 Domeniul C-terminal al receptorului β 1-adrenergic este critic pentru răspunsul GPR27- β 1AR la izoproterenol.....	66
3.5 Domeniul C-terminal al receptorului β 1-adrenergic nu conferă răspuns la izoproterenol receptorilor GPR75 și GPR173.....	67
3.6 Receptorul GPR27 inhibă activitatea SRE în prezența izoproterenolului	68

3.7 Inhibarea activității SRE de către izoproterenol prin receptorul GPR27 este independentă de proteinele G și β -arestină	71
3.8 Liganzii adrenergici izoproterenol și adrenalina inhibă activarea SRE indusă de către factorul de creștere epidermică (EGF) dependent de receptorul GPR27.....	73
3.9 Receptorul himeric β 1AR-GPR27 inhibă SRE, în timp ce himera GPR27- β 1AR activează SRE	75
3.10 Izoproterenol inhibă activitatea SRE dependent de receptorul GPR27, fiind implicată o kinază din familia Src	77
3.11 Reducerea expresiei receptorului GPR27 are ca efect creșterea secreției de insulină stimulată de glucoză.....	80
4. CONCLUZII ȘI PERSPECTIVE	83
Concluzii finale	86
Anexe.....	89
Anexa 1. Hormonii glucoregulatori principali.....	89
Anexa 2. Diabetul zaharat și obezitatea	90
Anexa 3. Figură suplimentară în completarea figurii 3-8 (Partea II).....	91
Mulțumiri.....	92
Articole publicate în domeniul tezei de doctorat.....	94
Participare la conferințe.....	95
Lista figurilor.....	96
Lista tabelor	98
BIBLIOGRAFIE	99

Scopul tezei

Alimentația nesănătoasă și sedentarismul caracterizează societatea contemporană. Consecința devastatoare este reflectată de o glicemie necontrolată care în final poate determina creștere în greutate până la obezitate și diabet zaharat (Calella et al., 2024, Hu, 2011). Glicemia este atent reglată de către hormonii glucoreglatori principali: insulina, glucagon și incretina *glucagon-like peptide 1* (GLP-1, peptida-1 asemănătoare glucagonului). În funcție de contextul fiziologic, insulina reduce nivelul de glucoză din sânge, în timp ce glucagonul îl crește, iar hormonul GLP-1 are acțiune duală în combaterea hiperglicemiei: insulinitropică și glucagonostatică (Aronoff et al., 2004). În timp ce receptorul pentru insulină este un receptor tirozin-kinazic membranar, acțiunea glucagonului și a GLP-1 este mediată prin intermediul receptorilor cuplați cu proteine G (GPCRs) (Habegger, 2022). Totodată, secreția acestor hormoni poate fi potențată de către activarea receptorilor GPCRs (Thor, 2022, Spreckley, 2015). Acești receptori reprezintă una dintre cele mai mari familii de proteine de membrană, având șapte domenii transmembranare drept semnătură fundamentală. Sunt exprimați ubicuitar și răspund la o multitudine de semnale extracelulare, precum neurotransmițătorii și hormonii (Lefkowitz, 2007). Există însă în această familie receptori GPCRs a căror funcție și ligand nu sunt cunoscute, numindu-se orfani. Având în vedere că peste 34% dintre medicamentele aprobate de către FDA (Administrația Americană pentru Alimente și Medicamente) sau EMA (Agenția Europeană a Medicamentului) țintesc receptori GPCRs, descoperirea unor ținte terapeutice din repertoriul receptorilor orfani reprezintă o prioritate pentru industria farmaceutică și cercetarea academică (Jobe and Vijayan, 2024).

Terapia antidiabetică curentă, care include printre altele și agonști ai receptorilor GLP-1, cum ar fi semaglutida (Ozempic), a demonstrat eficiență atât în controlul glicemiei, cât și în reducerea riscului de obezitate (Lexchin and Mintzes, 2023). Totuși, identificarea unor secretagogii naturali ai peptidei GLP-1 și țintirea receptorilor GPCR orfani exprimați în celulele β -pancreatice conduc către o abordare mai completă în tratamentul diabetului de tip II. Secretagogii naturali ai peptidei GLP-1 oferă posibilitatea de a stimula producția endogenă a acestui hormon, facilitând controlul glicemic fiziologic și reducând dependența de medicamente exogene (Bodnaruc et al., 2016). În plus, receptori GPCRs orfani, odată activați de liganzi specifici, ar putea contribui la reglarea metabolismului și a apetitului, oferind noi soluții pentru combaterea disfuncțiilor metabolice (Shore and Reggio, 2015). Un astfel de receptor orfan este

SREB1 (GPR27) care face parte din familia *Superconserved Receptors Expressed in the Brain* (SREBs) (O'Dowd et al., 1998, Matsumoto et al., 2000). Receptorul GPR27 reprezintă un real interes deoarece este exprimat în numeroase țesuturi (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000170837-GPR27/tissue> (Human Protein Atlas)) și există studii, într-adevăr limitate, care arată un potențial rol în metabolism, mai precis în reglarea homeostaziei glucozei (Ku et al., 2012, Chopra et al., 2020). Pentru a caracteriza cele două proteine, GLP-1 și GPR27, lucrarea a fost structurată în două părți, partea I cuprinzând **identificarea de noi secretagogi ai hormonului GLP-1**, cea de-a doua parte fiind dedicată **deorfanzării și caracterizării receptorului GPR27, un receptor cu rol potențial în secreția de insulină**. Fiecare parte cuprinde capitolul INTRODUCERE în care sunt incluse generalitățile și relevanța teoretică care sprijină partea experimentală, un capitol de MATERIALE ȘI METODE unde sunt descrise tehnicile folosite, câte un capitol dedicat REZULTATELOR ȘI DISCUȚIILOR, un capitol de CONCLUZII ȘI PERSPECTIVE unde sunt sumarizate rezultatele și sunt discutate viitoarele perspective de cercetare, cât și un capitol de CONCLUZII FINALE care încorporează ambele direcții de cercetare abordate.

Prima parte, numită „Modulatori ai secreției hormonului GLP-1 implicat în boli metabolice” include utilizarea unei metode bioluminiscente în scopul identificării potențialilor modulatori ai secreției hormonului GLP-1 și caracterizarea compușilor selecționați. În această direcție, am folosit o clonă a liniei celulare GLUTag (GLUTag-NLuc) obținută în cadrul Institutului de Biochimie al Academiei Române. Prima activitate a cuprins optimizarea metodei de determinare a activității luciferazei care reflectă secreția peptidei GLP-1. Cea de-a doua activitate a inclus testarea unei librării ce conține 173 de compuși naturali folosind clona celulară GLUTag-NLuc. Rezultatul acestei analize funcționale a fost identificarea unor secretagogi naturali aparținând în special clasei de flavonoide. A treia activitate a vizat determinarea mecanismului de acțiune al secretagogilor peptidei GLP-1 identificați. Dintre compușii descoperiți s-a remarcat în special quercetina care are ca efect creșterea secreției peptidei GLP-1 doar în prezența glucozei. În același timp, quercetina a determinat scăderea transportului intracelular al glucozei și amplificarea metabolismului reflectată prin creșterea nivelului de ATP intracelular. Așadar, flavonoidele care se regăsesc în numeroase alimente, pot fi folosite în alimentația zilnică adăugând beneficiul prevenției bolilor metabolice (Anghel et al., 2022).

Cea de-a doua parte, numită „Mecanisme de semnalizare ale receptorului GPR27, un nou receptor adrenergic atipic” a avut ca principal obiectiv caracterizarea funcțională a receptorului orfan GPR27 și implicarea lui în secreția de insulină stimulată de glucoză. Activitatea 1 a cuprins verificarea expresiei receptorului GPR27 la suprafața membranei celulare. Cea de-a doua activitate a inclus identificarea liganzilor receptorului GPR27 și calea de semnalizare implicată. Am testat căile canonice de semnalizare intracelulară, care includ modularea nivelului mesagerilor secundari (AMPC și calciu) determinată de activarea proteinelor G heterotrimerice. Ipoteza acestor experimente a fost bazată pe identificarea unei posibile activări a receptorului GPR27 independent de ligand, fenomen cunoscut sub numele de activitate constitutivă. Astfel, s-a observat o scădere a nivelului de AMPC, sugerând că GPR27 ar fi un receptor constitutiv activ. Prin folosirea unui set de inhibitori specifici, am demonstrat în mod convingător că efectele celulare observate nu sunt mediate de către proteinele Gi inhibitorii, infirmând astfel ipoteza inițială. Pe baza acestor rezultate, am considerat că domeniul C-terminal al receptorului GPR27 ar putea fi implicat în caracteristicile funcționale observate la nivel celular. Astfel, am generat mai mulți receptori himerici în care domeniul C-terminal al receptorului GPR27 a fost înlocuit cu domeniul omolog al unor receptori cunoscuți. Prin analiza funcțională a himerelor generate, am descoperit în mod neașteptat că receptorul himeric obținut prin înlocuirea domeniului C-terminal al GPR27 cu cel al receptorului $\beta 1$ -adrenergic (GPR27- $\beta 1$ AR) funcționează identic cu receptorul $\beta 1$ -adrenergic prin recunoașterea aceluiași set de liganzi și prin activarea aceluiași tip de proteine G (din familia G stimulatorie, Gs). Prin aplicarea unei analize integrative, am demonstrat că receptorul GPR27 este un receptor adrenergic. Mai mult decât atât, semnalizarea receptorului GPR27, în prezența ligandului adrenergic izoproterenol, este una cu totul atipică, fiind independentă de proteinele G și de β -arestină, el fiind implicat în transinhibarea unui receptor tirozin-kinazic, și anume receptorul factorului de creștere epidermică (EGFR). În final, am demonstrat un potențial rol al receptorului GPR27 în modularea secreției de insulină stimulată de glucoză (activitatea 3).

Partea I

Modulatori ai secreției hormonului GLP-1 implicat în boli metabolice

1. INTRODUCERE

Administrarea intravenoasă a glucozei duce la o valoare a insulinemiei mai mică față de cea administrată oral. Acest fenomen a fost atribuit efectului incretinic – la nivelul intestinului, celulele enteroendocrine L secretă GLP-1, iar celulele K eliberează GIP. Incretinele au efect insulintropic, însă GLP-1 produce și o suprimare a secreției de glucagon (Kazafeos, 2011). Prin legarea de receptorul său GLP-1R, cuplat cu proteine G stimulatorii (Gs), GLP-1 produce scăderea motilității gastrointestinale, reglează apetitul și sațietatea, având totodată beneficii asupra sistemului cardiovascular (Krieger, 2020, Ferhatbegovic et al., 2023). În celulele β -pancreatice, promovează biosinteza și secreția insulinei, proliferarea, reducerea stresului de la nivelul reticulului endoplasmatic, cât și inhibarea apoptozei (Koole, 2013).

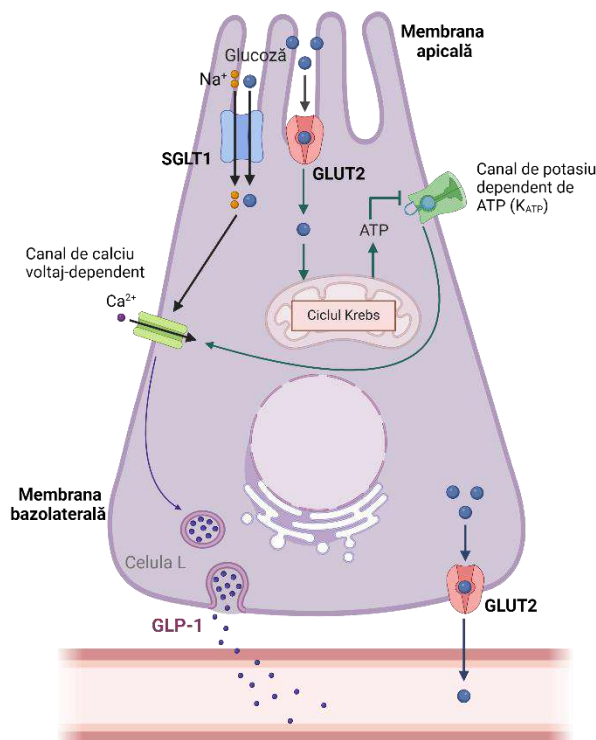
Hormonul GLP-1 este sintetizat din preproglucagon. Celulele enteroendocrine L sunt răspândite de-a lungul întregului intestin subțire (duoden, jejun, ileum), dar și în colon. Cele proximale sunt responsabile pentru faza rapidă a secreției de GLP-1, mediată de nutrienți, în timp ce celulele L de la nivelul colonului sunt stimulate de acizii biliari și metaboliții bacterieni (Kuhre et al., 2021). Declanșarea secreției GLP-1 de către nutrienți se face prin intermediul transportorilor sau a activării GPCRs (Dolanc et al.). Reglarea secreției GLP-1 de către **glucoză** seamănă în principal cu secreția de insulină din celulele β -pancreatice (Figura 1), însă există diferențe în special între specii. Astfel, în linia celulară GLUTag, linie murină obținută din tumori colonice, exocitoza GLP-1 are loc dependent de metabolismul glucozei cu închiderea canalelor K_{ATP} , dar și prin intermediul SGLT1 ce introduce în celulă două molecule de sodiu împreună cu una de glucoză (Reimann and Gribble, 2002, Gribble et al., 2003). În mod similar, are loc secreția GLP-1 din celule L primare izolate de la șoareci (Reimann et al., 2008), cât și în cazul perfuziei intestinului subțire de la șobolani (Kuhre et al., 2015). La oameni, SGLT1 are un rol major în secreția de GLP-1 stimulată de glucoză, respectându-se depolarizarea

membrana în care sunt implicate și canalele voltaj-dependente de calciu și de sodiu (Sun et al., 2017).

Terapia antidiabetică curentă utilizează medicamente bazate pe GLP-1, cuprinzând două clase: agoniști ai receptorului GLP-1 (incretinomimetice) – exenatid, liraglutid, lixisentatid, taspeglutid, albiglutid, dulaglutid și semaglutid, împreună cu inhibitori ai enzimei care degradează GLP-1, și anume DPP-4 (gliptinele) – sitagliptin, vildagliptin, saxagliptin, alogliptin și linagliptin (Gilbert and Pratley, 2020). Ambele clase promovează secreția de insulină prin creșterea expunerii la GLP-1, producând o scădere a glicemiei doar în cazul unei stări hiperglicemice (DeFronzo et al., 2014). În plus, agoniștii GLP-1R au efecte benefice asupra greutateii și a sistemului cardiovascular. În ultimii ani s-a observat o creștere a vânzărilor Ozempic (Novo Nordisk, semaglutid) pentru utilizarea off-label ca medicament pentru pierderea în greutate, având într-adevăr rezultate promițătoare (Han et al., 2023). Prin urmare, având în vedere beneficiile terapeutice ale GLP-1, identificarea unor noi secretagogi rămâne o direcție de cercetare esențială pentru dezvoltarea unor strategii mai eficiente în tratamentul diabetului și al obezității.

Figura 1. Secreția hormonului GLP-1

stimulată de glucoză. Postprandial, glucoza ajunge la nivel lumenului intestinal de unde poate pătrunde în celulele enteroendocrine de tip L prin doi transportori dispuși apical, și anume GLUT2 și SGLT1. La om, SGLT1 pare că joacă un rol mai important (Sun et al., 2017). Glucoza din celulă va fi metabolizată cu amplificarea secreției și după caz (în funcție de specie), cu închiderea canalelor K_{ATP} (Sun et al., 2017). De asemenea, GLUT2 pare că este exprimat și la nivelul membranei bazolaterale fiind implicat în transportul glucozei în circulație (Schmitt et al., 2017). Creat în BioRender. Anghel, S. (2025) <https://BioRender.com/k75e139>.



2. MATERIALE ȘI METODE

În scopul identificării secretagogilor GLP-1, am utilizat o linie celulară reporter (GLUTag-NLuc) generată în cadrul Institutului de Biochimie al Academiei Române în care hormonul este cosecretat împreună cu luciferaza NanoLuc (Figura 2A). Astfel, prin determinarea luminescenței se măsoară indirect cantitatea de hormon secretat. Validarea testului luminescent de secreție a fost realizată prin testul imunosorbant legat de enzimă (ELISA). Ulterior, metoda optimizată a fost aplicată pentru testarea unei biblioteci de compuși naturali. În plus, mecanismul de acțiune al secretagogilor a fost investigat prin metoda luminescentă dezvoltată, precum și prin determinarea absorbției glucozei și a nivelului de ATP (Anghel et al., 2022).

3. REZULTATE ȘI DISCUȚII

Inițial, testul de secreție GLP-1 bazat pe luciferază a fost optimizat prin testarea diferitelor condiții experimentale (număr de celule, mediu de secreție) folosind secretagogi cunoscuți. După ce metoda a fost optimizată, a fost testată o librărie de 173 de compuși naturali. Printre stimulatori, se observă o preponderență a flavonoidelor, precum quercetina, luteolina, apigenina, baicaleina, miricetina, crisina și fisetina (Figura 2B) (Anghel et al., 2022). Flavonoidele din alimentație au fost asociate un risc redus de apariție a diabetului zaharat sau cu alte beneficii asociate pre-diabetului sau obezității, cum ar fi creșterea sensibilității la insulină (Dinda et al., 2020, Martin and Ramos, 2021). În continuare, am investigat mecanismul celular implicat în secreția GLP-1 indusă de către flavonoide utilizând linia celulară reporter, axându-ne în principal pe quercetină. În prezența inhibitorului de canalele de calciu voltaj-dependente de tip L, nifedipină, stimularea secreției de GLP-1 de către compuși este abolită (Figura 3A). Mai mult decât atât, creșterea secreției de GLP-1 de către quercetină se observă doar în prezența glucozei (Figura 3B). Secreția de GLP-1 mediată de glucoză implică două mecanisme 1) intrarea glucozei în celule prin transportul facilitat de GLUT, creșterea metabolismului intracelular cu modificarea balanței ATP/ADP ce permite închiderea canalelor K_{ATP} sau 2) intrarea glucozei prin transportorul electrogenic SGLT1; ambele evenimente soldându-se cu modificarea potențialului de membrană care deschide canalele de calciu de tip L (Sun et al., 2017, Gribble et al., 2003). Utilizând inhibitori specifici transportorilor de glucoză – floridzină (inhibitor SGLT1) și floretină (inhibitor GLUT) quercetina eșuează în a mai stimula secreția GLP-1 cu

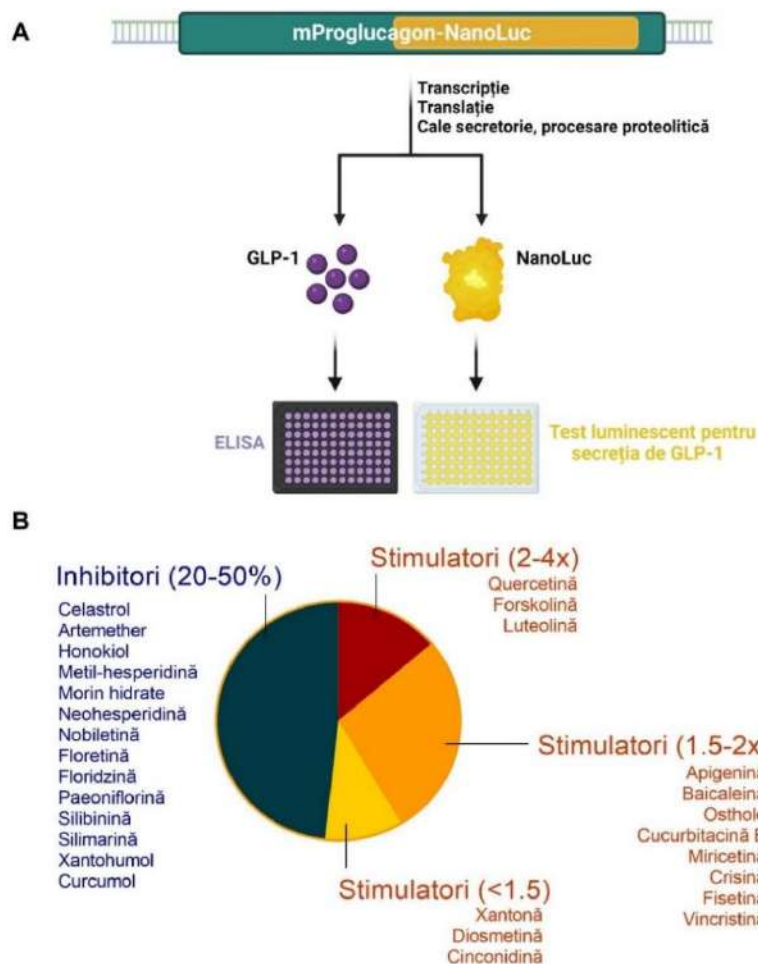


Figura 2. Noi compuși naturali au fost identificați ca modulatori ai secreției hormonului GLP-1, folosind linia celulară reporter GLUTag-NLuc **A.** Reprezentare schematică a metodei bioluminescente de cuantificare a peptidei GLP-1 secretate. Prin expresia proteinei de fuziune proglucagon-NanoLuc are loc clivarea proteolitică generându-se GLP-1 și luciferaza ce urmează a fi secretate în mediul extracelular. Luciferaza din mediu poate fi cuantificată prin detecția activității sale la un cititor de plăci, reflectând cantitatea de GLP-1 secretat. Creat în BioRender. Anghel, S. (2025) <https://BioRender.com/118u762>. **B.** Reprezentare grafică a compușilor identificați în funcție de nivelul de creștere/scădere a secreției raportat la control (DMSO). Adaptat din (Anghel et al., 2022).

aceeași eficacitate (Figura 3C). Așadar, quercetina potențează secreția de GLP-1 indusă de glucoză, implicând transportorii de glucoză, GLUT și SGLT1, cu creșterea calciului intracelular determinată de deschiderea canalele voltaj-dependente de tip L (Anghel et al., 2022). Amplificarea secreției de GLP-1 indusă de glucoză de către quercetină ar putea fi consecința

Figura 3. Quercetina intervine în metabolismul celular al glucozei. A. Activitatea luciferazei

A

Activitatea NanoLuc (RLU)

nifedipină - + control osthole - + baicaleină - + quercetină - + apigenină - +

B

Activitatea NanoLuc (RLU)

glucoză 0 mM 1 mM 16.8 mM quercetină - +

C

Activitatea NanoLuc (RLU)

control flordizină - 5 20 - floretină - - - 100 quercetină - 5 20 - - 5 20 100 μM

D

Luminescent ă (RLU)

control floretină 100 μM quercetină 10 μM quercetină 20 μM luteolină 10 μM forskolină 5 μM

E

Activitatea NanoLuc (RLU)

control oligomycină NaN3 quercetină quercetină+oligomycină quercetină+NaN3

F

ATP (nM)

control oligomycină NaN3 quercetină quercetină+oligomycină quercetină+NaN3

determinată de compuși sub influența nifedipinei (5 μ M). Datele sunt prezentate ca medie $\pm$ DS (n = 5-6). **B.** Dependența de glucoză a quercetinei. Datele sunt prezentate ca medie $\pm$ DS (n = 6); ANOVA urmată de testul post-hoc Tukey comparând quercetina în glucoză 0 mM cu compușii în glucoză 1 mM și 16.8 mM. **C.** Activitatea luciferazei determinată de quercetină în prezența inhibitorilor de transport al glucozei, floretină și floridzină. Datele sunt prezentate ca medie $\pm$ DS (n = 5, cu excepția controlului, 20 μ M floridzină și pentru quercetină în prezența a 20 sau 100 μ M floretină unde n = 6); ANOVA urmată de testul post-hoc Tukey comparând control sau quercetina minus/plus inhibitor. **D.** Utilizarea glucozei în celulele GLUtag-NLuc sub influența quercetinei și luteolinei. Floretina 100 μ M și forskolina 5 μ M au fost folosite drept control pozitiv. Datele sunt prezentate ca medie $\pm$ DS (n = 5); ANOVA urmată de testul post-hoc Tukey comparând fiecare compus cu controlul (DMSO). **E.** Activitatea luciferazei măsurată în prezența quercetinei și a inhibitorilor de lanț respirator mitocondrial (azidă de sodiu, 2 mM), respectiv de ATP sintază (oligomicină, 2 μ M). Datele sunt prezentate ca medie $\pm$ DS (n = 5); ANOVA urmată de testul post-hoc Tukey comparând controlul cu inhibitorii și quercetina cu quercetină plus inhibitori. **F.** Nivelul de ATP determinat în 16.8 mM glucoză, în prezența quercetinei și a inhibitorilor de lanț respirator mitocondrial (azidă de sodiu, 2 mM), respectiv de ATP sintază (oligomicină, 2 μ M). Datele sunt prezentate ca medie $\pm$ DS (n = 5); ANOVA urmată de testul post-hoc Tukey comparând controlul cu inhibitorii și quercetina cu quercetină plus inhibitori. Adaptat din (Anghel et al., 2022). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001.

Partea II

Mecanisme de semnalizare ale receptorului GPR27, un nou receptor adrenergic atipic

1. INTRODUCERE

Receptorii cuplați cu proteine G (GPCRs) reprezintă una dintre cele mai mari și importante familii de receptori de la nivelul membranei celulare, exprimarea lor fiind ubicuitară, participând în aproape toate procesele fiziopatologice (Lefkowitz, 2007). Activarea lor canonică

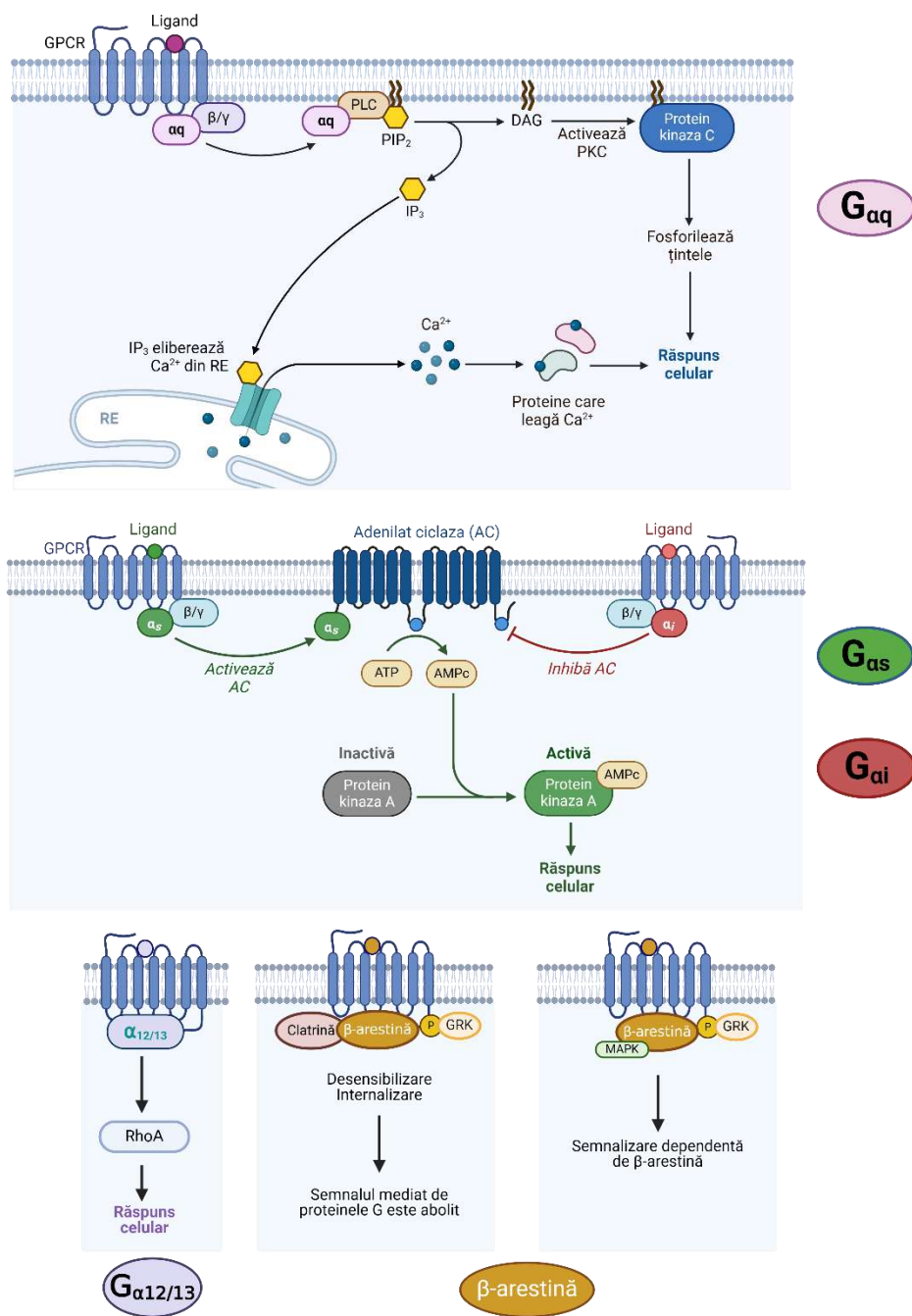


Figura 4. Semnalizarea GPCRs prin proteinele G și prin β-arestină (internalizare și semnalizare) (Jean-Charles et al., 2017, Milligan, 2006). Creat în BioRender. Anghel, S. (2025) <https://BioRender.com/q68s413>.

implică interacțiunea cu proteine G heterotrimerice, alcătuite din trei subunități (α , β , γ), care prezintă o activitate intrinsecă GTPază. În funcție de efectorii implicați și de tipul subunității α , proteinele G sunt clasificate în G_{as}, G_{ai/o}, G_{aq} și G_{α12/13} (Figura 4) (Milligan, 2006).

GPCR-omul uman este constituit din peste 800 de membri (incluzând receptorii senzoriali), însă o parte dintre aceștia sunt considerați orfani – ligandul endogen și funcția nu sunt cunoscute (Tang et al., 2012). Având în vedere exprimarea ubicuitară și importanța lor ca ținte terapeutice, receptorii orfani reprezintă o frontieră neexplorată în farmacologie care merită investigată (Hauser et al., 2017).

GPR27 (SREB1) face parte din subfamilia SREBs (Superconserved Receptors Expressed in the Brain) alături de GPR85 (SREB2) și GPR173 (SREB3), aparținând clasei A de receptori (asemănători Rodopsinei), fiind considerați orfani. Cei trei receptori sunt similari în procent de 52-63%, fiind de asemenea asemănători receptorilor aminergici (25% identitate) (O'Dowd et al., 1998, Matsumoto et al., 2000). Pentru a evidenția versatilitatea receptorului și pentru a investiga ce acțiuni poate deține și ce se cunoaște despre farmacologia lui, am căutat literatura de specialitate care îl vizează în mai multe baze de date, (Web of Science, PubMed și Scopus), folosind „GPR27” și „SREB1” ca termeni cheie. Am ales doar articolele originale pentru a fi analizate (Tabelul 1-1 din lucrarea de doctorat in extenso). După eliminarea duplicatelor și a articolelor în care nu era prevăzut GPR27, 27 de articole au fost analizate. Dintre acestea, 3 articole studiază nivelul de conservare și evoluția GPR27 (Ribrioux et al., 2008, Breton et al., 2021, Breton et al., 2023), 8 articole demonstrează farmacologia receptorului cu potențiali liganzi și căi de semnalizare (Martin et al., 2015, Yanai et al., 2016, Hossain et al., 2016, Dupuis et al., 2017, Jin et al., 2018, Pillaiyar et al., 2021, Pillaiyar et al., 2023, Kaafarani et al., 2023), 5 articole vizează implicarea GPR27 în metabolism (producție de insulină, sensibilitatea de insulină, homeostazia lipidelor și a glucozei) (Ku et al., 2012, Chopra et al., 2020, Nath et al., 2020, Dolanc et al., 2022, Rutkove et al., 2023), 5 dintre ele prevăd rolul GPR27 în cancer (Hallett et al., 2012, Lando et al., 2015, Wang et al., 2022, Pan and Gao, 2023, Cai et al., 2024), 3 articole prezintă consecințele delețiilor genice în regiunea *Gpr27* sau care include regiunea GPR27 (Petek et al., 2003, Pariani et al., 2009, Oh et al., 2023), iar alte 3 articole dovedesc rolul GPR27 în stări inflamatorii, inclusiv reacții alergice (Livingston et al., 2017, Sharma et al., 2023, Zhang et al., 2023). Așadar, se observă că GPR27 este implicat într-o paletă largă de procese celulare, în corelație cu expresia lui larg răspândită. În egală măsură, deși au fost identificați câțiva liganzi ai receptorului GPR27 (Dupuis et al., 2017, Pillaiyar et al., 2021, Pillaiyar et al., 2023, Yanai et al., 2016), el este considerat în continuare ca fiind orfan. Aparent, ar putea să recruteze β -arestina 2 printr-un mecanism ligand-depedent (Dupuis et al.,

2017, Pillaiyar et al., 2021, Pillaiyar et al., 2023), dar și proteinele Gq (Ku et al., 2012) sau proteinele Gi (Martin et al., 2015), în lipsa unui ligand, sugerând o activitate constitutivă. Totodată, se remarcă un rezultat net inconsecvent în ceea ce privește cancerul (expresia lui prezintă risc crescut sau scăzut, supraviețuirea este îmbunătățită sau scade), dar în funcție de tipul de cancer poate prezenta consecințe diferite. În aceeași timp, în baza de date The Cancer Genome Atlas Program (The Cancer Genome Atlas Program) (<https://portal.gdc.cancer.gov/>), receptorul GPR27 este frecvent asociat în diferite cancere cu mutații *loss-of-function* față de *gain-of-function* ceea ce poate sugera că GPR27 este inactiv/-at în celulele canceroase, posibil datorită unui potențial rol protector. Totodată, implicarea lui în metabolism, subliniază importanța deorfanizării și caracterizării sale, putând deservi ca o țintă farmacologică ce favorizează homeostazia glucozei prin modularea secreției și/sau acțiunii insulinei.

2. MATERIALE ȘI METODE

Receptorul GPR27 a fost caracterizat funcțional prin exprimarea heterologă în linia celulară HEK293T. Inițial, prin folosirea testului cito-ELISA, s-a verificat prezența acestuia la membrana plasmatică. Apoi, s-au utilizat instrumentele farmacologiei inverse, cât și generarea unor construcții himerice care au condus la descoperirea ligandului. Aplicând metode integrative prin care se detectează activarea unor elemente de răspuns ale factorilor de transcripție (Cheng et al., 2010), o baterie de inhibitori, dar și o metodă de recrutare a β -arestinei bazată pe complementaritatea luciferazei Firefly (Dupuis et al., 2017), calea de semnalizare a receptorului GPR27 a fost dezvăluită. Implicarea receptorului GPR27 în secreția de insulină a fost realizată prin silențierea receptorului într-o linie celulară de insulinoame, INS1E și măsurarea secreției de insulină folosind un kit HTRF (Revvity).

3. REZULTATE ȘI DISCUȚII

Receptorul GPR27 se exprimă la membrana plasmatică, după cum se observă prin testul cito-ELISA (Figura 5A). Folosind un biosenzor pentru nivelul de AMPc (sistemul Glosensor-22F), am testat potențiala activitate constitutivă a receptorilor care fac parte din familia SREBs (Figura 5B). Se observă că GPR27 și GPR173 reduc nivelul de AMPc bazal, dar și cel stimulat de forskolină, inhibarea fiind mai puternică în cazul GPR27, sugerând cuplarea cu proteinele Gi/o. Dar folosind inhibitori specifici care ADP-ribozilează proteinele din familia Gi/o blocând

interacțiunea GPCR-proteină G, și anume toxina pertussis (PTX, Figura 5C) (Locht and Antoine, 1995) sau OZITX (Figura 5D) (Keen et al., 2022), efectul GPR27 nu a putut fi reversat.

În continuare, am recurs la construirea unor receptori himerici pentru a caracteriza receptorul orfan GPR27, astfel: a) prin clonare cu enzime de restricție a fost realizată o versiune truncată a receptorului GPR27 în care domeniul C terminal este absent (GPR27ΔCt), b) domeniul C terminal al receptorului β1-adrenergic (β1AR) a fost înlocuit cu cel a receptorului GPR27, rezultând receptorul himeric β1AR-GPR27 și c) au fost sintetizați mai mulți receptori

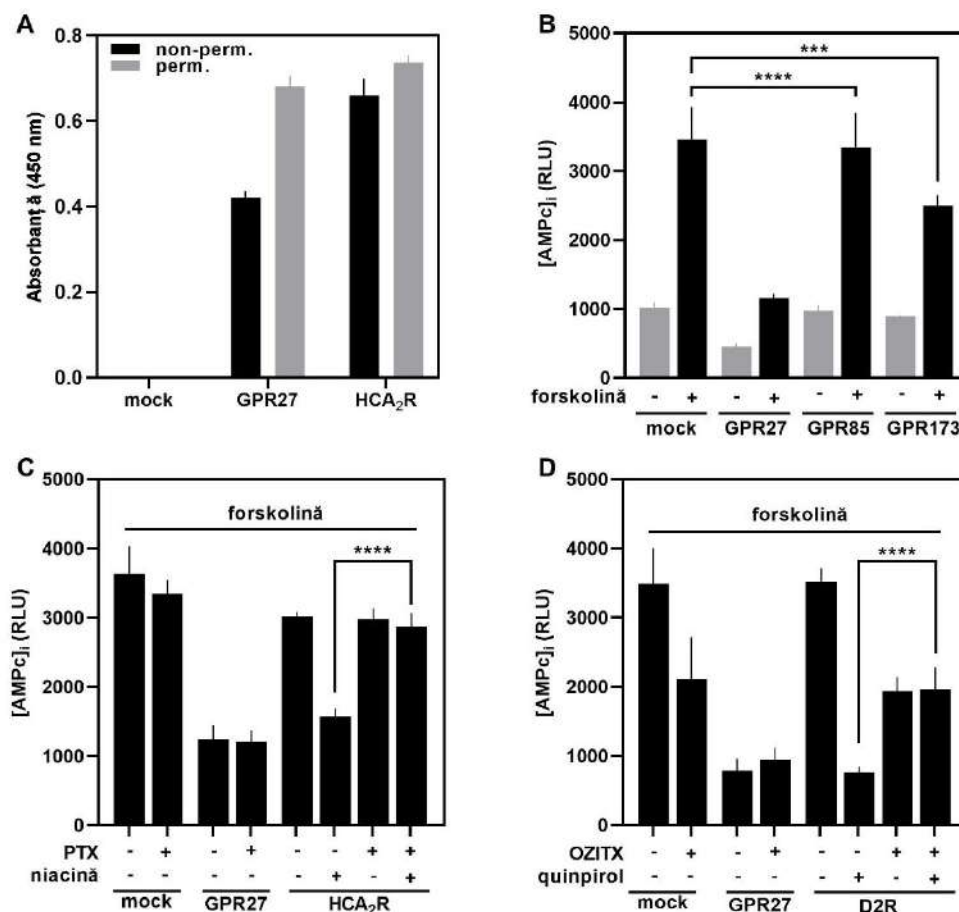


Figura 5. Receptorul GPR27 scade nivelul de AMPc intracelular independent de proteinele G. A. Cito-ELISA în celule transfectate cu vector gol (mock) respectiv transfectate cu GPR27 sau cu HCA2R. **B.** SREBs în condiții bazale (solvent) sau stimulate (forskolin, 10 μM) **C., D.** Nivelul de AMPc determinat de GPR27 în prezența PTX (inhibitor Gai/o, w/o Gaz, 100 ng/mL) (**C**), respectiv OZITX (*Ga_O*, *Gaz* and *Gai* inhibiting *Toxin* (Keen et al., 2022) (**D**). Receptorul HCA2R (receptor de niacină) a fost folosit drept control pozitiv în cazul experimentului cu PTX, în timp ce în cazul experimentului cu OZITX, a fost folosit receptorul D2. Datele sunt prezentate ca medie ± DS (n = 4-6); ANOVA urmată de testul post-hoc Tukey

comparând semnalul determinat de fiecare receptor cu mock în prezența forskolin (A) sau cel dat de prezența liganzilor minus/plus toxine (C, D). *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

himerici în care domeniul C terminal al receptorului GPR27 a fost înlocuit cu domeniul omolog al altor receptori cunoscuți, rezultând receptorii himerici GPR27- β 1AR, GPR27- α 1AR, GPR27- β 2AR, GPR27-M1 și GPR27-GPR75 (Figura 6A). Nivelul de AMPc indus de către GPR27 și de către versiunea truncată, GPR27 Δ Ct este similar (Figura 6B). Domeniul C-terminal al GPR27 în cadrul himerei β 1AR-GPR27 scade semnificativ semnalul dat de AMPc în prezența liganzilor adrenergici (izoproterenol și adrenalină), comparativ cu receptorul β 1-AR, posibil datorită abolirii cuplării cu proteinele Gs (Figura 6C, Figura 6D). Apoi, receptorul himeric GPR27- β 1AR a fost utilizat pentru a testa o bibliotecă de compuși aprobați FDA (TargetMol) alcătuită din 1403 substanțe, folosind sistemul GloSensor-22F (Tabelul 3-1, pag. 63, lucrarea de doctorat in extenso). În urma screeningului, au reieșit mai multe observații: 1) similar receptorului β 1-AR, s-a înregistrat o activitate constitutivă de creștere a AMPc, 2) am identificat numeroși liganzi care au crescut nivelul de AMPc, sugerând cuplarea cu proteinele Gs, 3) majoritar acești liganzi au fost aminergici, în mod special adrenergici, 4) orice activator al himerei GPR27- β 1AR, este un activator al receptorului β 1AR și 5) curba concentrație-răspuns a izoproterenolului (Figura 6E), cât și a adrenalinei (Figura 6F) prezintă un aspect similar în cazul celulelor ce exprimă receptorul β 1AR versus cele care exprimă himera GPR27- β 1AR. Așadar, în ceea ce privește nivelul de AMPc intracelular, himera β 1AR-GPR27 se comportă precum GPR27, în timp ce himera GPR27- β 1AR este similară receptorului β 1-AR. Celelalte himere obținute nu au determinat răspunsul GPR27 la izoproterenol.

Nivelul de AMPc dependent de GPR27 nu este modificat de izoproterenolul (1 nM), așa cum se observă în modul Gs (Figura 7A), dar și în modul Gi (Figura 7B). Astfel, doar în prezența domeniului C-terminal al receptorului β 1-AR GPR27 poate semnaliza cu recrutarea proteinelor Gs care rezultă în stimularea formării de AMPc (Figura 6E). Pentru a elimina limitările impuse de măsurarea mesagerilor secundari rezultați în urma activării GPCRs, am optat pentru o metodă mai integrativă a căilor de semnalizare, și anume activarea elementelor de răspuns de către factorii de transcripție (Cheng et al., 2010). Se observă că izoproterenolul determină activarea elementelor de răspuns la cAMP (CRE) doar în cazul celulelor care exprimă receptorul β 1AR, nu și în cazul celulelor transfectate cu GPR27 (Figura 7C). În schimb, izoproterenolul (1 μ M) inhibă activarea elementelor de răspuns la ser prin GPR27 (Figura 7D). În egală măsură,

inhibarea activității SRE determinată de izoproterenol în celulele transfectate cu GPR27, este dependentă de concentrație (Figura 7E). Antagoniștii β -adrenergici, metoprolol (β 1-selectiv) și propranolol (neselectiv) reversează inhibarea activității SRE indusă de izoproterenol mediată de GPR27, acesta fiind un alt argument puternic care sugerează că GPR27 este un receptor adrenergic (Figura 7F).

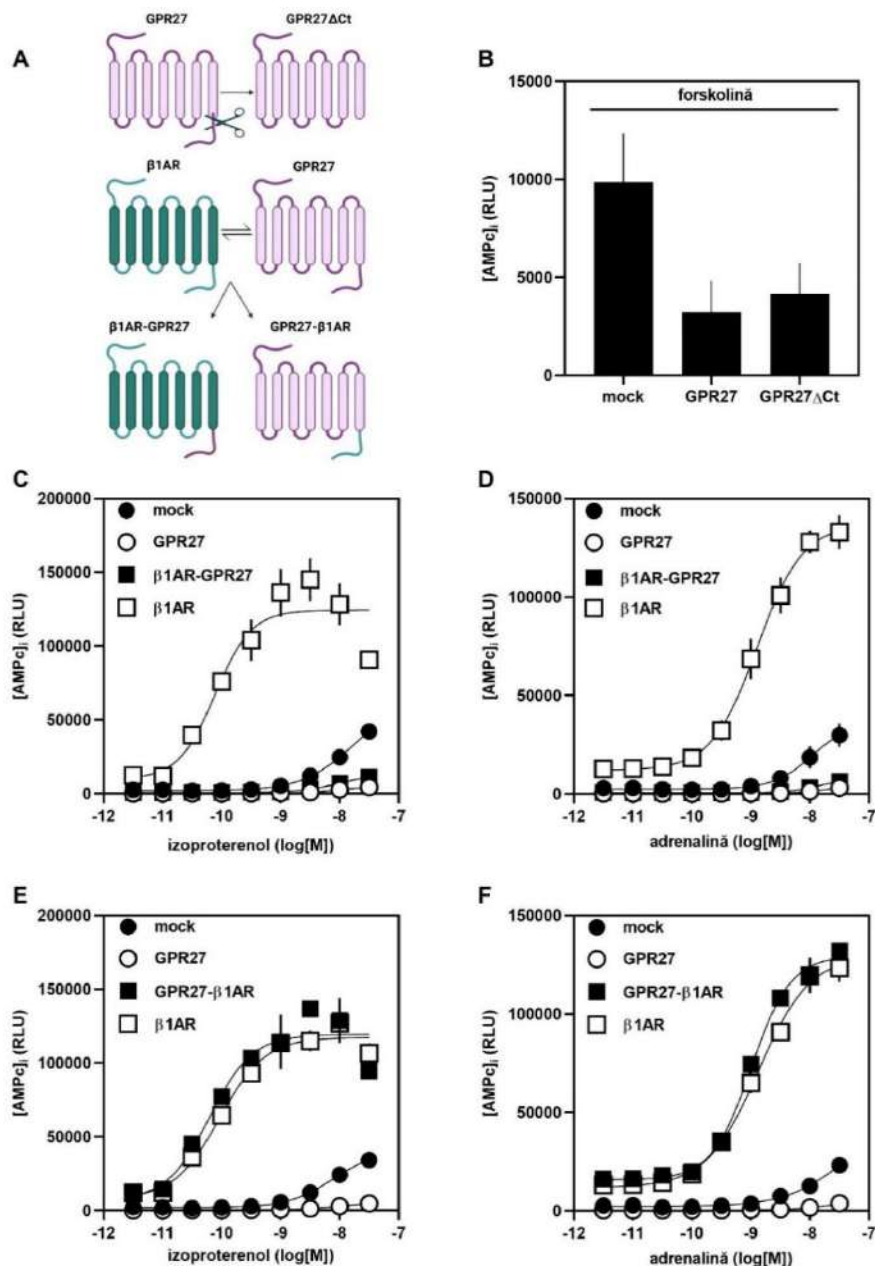


Figura 6. Receptorul himeric GPR27- β 1AR răspunde la liganzi adrenergici. A. Reprezentare schematică a receptorului GPR27 truncat (GPR27 Δ Ct) și a receptorilor himerici β 1AR-GPR27 și GPR27- β 1AR. Creat în BioRender. Anghel, S. (2025) [https:// BioRender.com/](https://BioRender.com/)

a27p278. **B.** Nivelul de AMPc determinat de mock, de celulele care exprimă GPR27 și cele care exprimă GPR27ΔCt. **C., D.** Nivelul de AMPc determinat de izoproterenol (**C**) și adrenalină (**D**) în celulele care exprimă himera β1AR-GPR27. **E., F.** Nivelul de AMPc determinat de izoproterenol (**E**) și adrenalină în celulele care exprimă himera GPR27-β1AR (**F**). Datele sunt prezentate ca medie ± DS (n = 3).

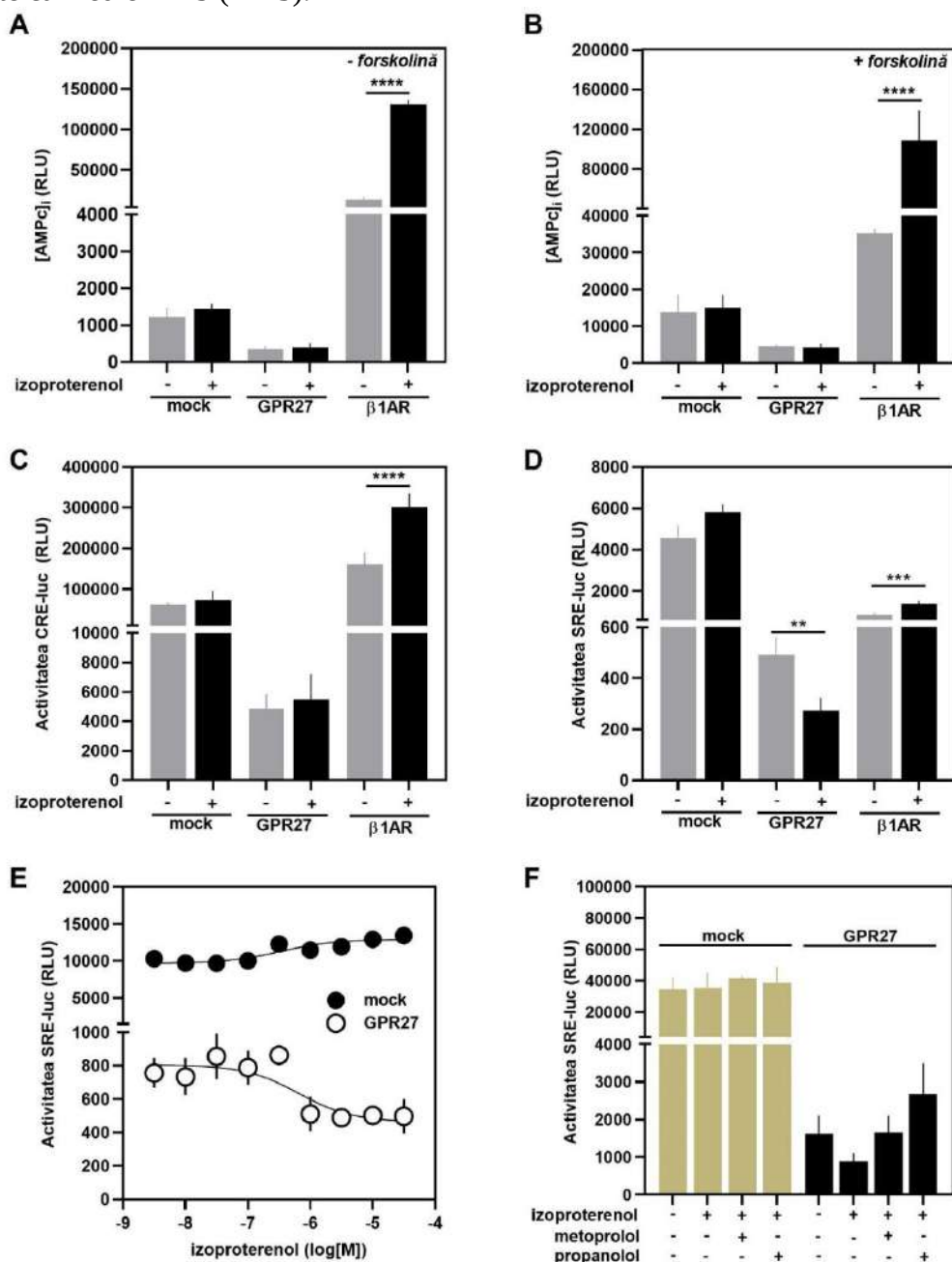


Figura 7. Receptorul GPR27 inhibă activitatea SRE în prezența izoproterenolului. A., B. Nivelul de AMPc determinat de izoproterenol (1 nM) în absența (**A**) sau prezența forskolinei (10 μM) (**B**) în celulele transfectate cu vector gol (mock), transfectate cu GPR27 și cu β1-

adrenoreceptor. **C.** Activitatea CRE modulată de izoproterenol (1 nM) în celulele care exprimă GPR27 sau receptorul β 1AR. **D.** Activitatea SRE determinată de izoproterenol (1 μ M) în celulele ce exprimă GPR27 sau receptorul β 1AR. **E.** Activitatea SRE determinată de curba concentrații crescute progresiv de izoproterenol în celule mock și transfecte cu GPR27. **F.** Activitatea SRE determinată de izoproterenol (1 μ M) și antagoniști β -adrenergici (metoprolol, propranolol 10 μ M) în celulele ce exprimă GPR27. Datele sunt prezentate ca medie $\pm$ DS (n = 4-6); Testul t Student compară semnalul determinat de fiecare receptor în lipsa izoproterenol cu cel dat de izoproterenol (**A, B, C, D**). **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001.

Căile clasice de semnalizare a GPCRs implică căi dependente de proteinele G și căi independente de proteinele G guvernate de β -arestină, deși contribuția proteinelor G în semnalizarea dependentă de β -arestină este încă dezbătută (Grundmann et al., 2018). Inhibarea activității SRE determinată de izoproterenol poate fi mediată de proteinele G, implicarea lor fiind analizată farmacologic, folosind inhibitori specifici (Figura 8A). PTX (inhibitor proteine Gi/o (Locht and Antoine, 1995)), suramina (blocant al cuplării receptorilor cu proteinele G (Chung and Kermode, 2005)), galeina (inhibitor al subunității G $\beta\gamma$ (Karuppagounder et al., 2018)), Y-27632 (calea G12/13, inhibitor specific de ROCK (Siehler, 2009)) și YM-254890 (inhibitorul subunității G α_q (Nishimura et al., 2010)) au eșuat în a reversa inhibarea dată de izoproterenol asupra activității SRE dependentă de GPR27 (Figura 8A). Fosforilarea receptorului de către GRKs precede recrutarea β -arestinei (Jean-Charles et al., 2017). În prezența unui inhibitor neselectiv pentru GRKs (Wang et al., 2016), activarea SRE de către izoproterenol în cazul β 1AR este crescută datorită blocării internalizării receptorului, efectul GPR27 fiind păstrat (Figura 8B). Implicarea β -arestinei 2 a fost investigată și printr-un test de complementaritate a luciferazei (Dupuis et al., 2017). În plus, s-au mai utilizat doi receptori himerici, GPR27-V2R și β 2AR-V2R, având domeniul C terminal înlocuit cu cel al vasopresinei 2 (V2R), bogat în situsuri de fosforilare, favorizând recrutarea β -arestinei (Dupuis et al., 2017). În timp ce β 2AR și β 2AR-V2R recrutează β -arestina 2 în prezența izoproterenolului, GPR27 și GPR27-V2R nu interacționează cu aceasta (Figura 8C). În același timp, himera GPR27-V2R se comportă precum receptorul GPR27 în ceea ce privește activitatea SRE (Figura 8D).

O altă cale de semnalizare celulară importantă a GPCRs este aceea descrisă de interacțiunea cu receptori tirozin kinazici (RTKs). Mai exact, în literatură se întâlnește termenul de transactivare – activarea GPCRs de către ligand conduce la activarea RTK,

fenomenul putând fi și reciproc (RTKs să ducă la activarea GPCRs) (Delcourt et al., 2007). Primul receptor tirozin-kinazic raportat ca fiind transactivat de un GPCR, este receptorul de creștere epidermică (EGFR) (Daub et al., 1996). Activarea EGFR determină supraviețuirea,

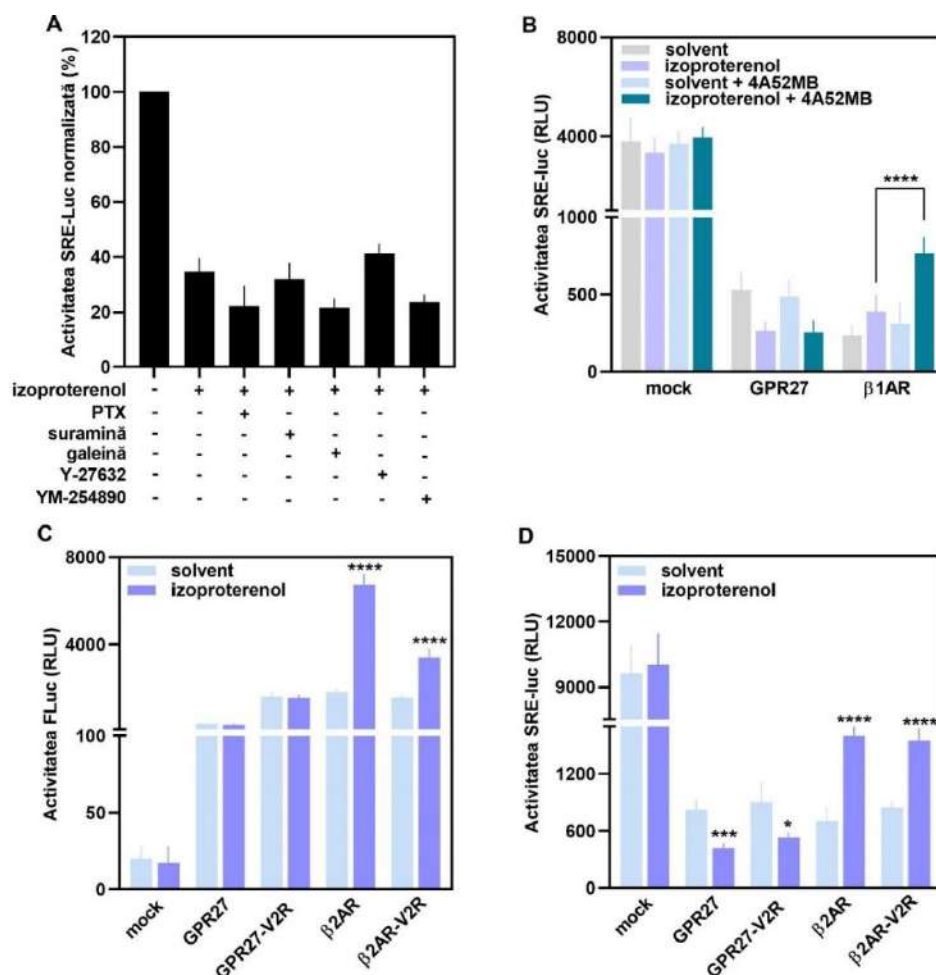


Figura 8. Inhibarea activității SRE de către izoproterenol prin receptorul GPR27 este independentă de proteinele G și β-arrestină. A. Activitatea SRE indusă de izoproterenol în prezența inhibitorilor de proteine G, și anume PTX (100 ng/mL), suramină (100 μM), galeină (100 μM), Y-27632 (10 μM) și YM-254890 (100 nM) în celule care exprimă GPR27. **B.** Activitatea SRE indusă de izoproterenol în prezența inhibitorului de GRK (4A52MB, 100 μM) asupra celulelor care exprimă GPR27 sau receptorul β1AR. **C.** Activitatea luciferazei Firefly în testul de complementaritate în prezența izoproterenol asupra mock sau a celulelor ce exprimă GPR27-FLuc, GPR27-V2R-FLuc, β2AR-FLuc, β2AR-V2R-FLuc și FLuc-β-arrestina 2. **D.** Activitatea SRE determinată de izoproterenol în celulele ce exprimă receptorii corespunzători testului de complementaritate a luciferazei Firefly din (C). Datele sunt prezentate ca medie ± DS (n = 4-6); ANOVA urmată de testul post-hoc Tukey comparând semnalul determinat de

fiecare receptor în prezența inhibitorului de GRK (4A52MB) minus/plus izoproterenol (**B**). Testul t Student compară semnalul determinat de fiecare receptor în lipsa izoproterenol cu cel dat de izoproterenol. (**C, D**). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

proliferarea și migrarea celulelor (Arteaga and Engelman, 2014). Izoproterenolul (1 μM) inhibă activarea SRE indusă de către EGF dependent de GPR27 (Figura 9A). Mai mult decât atât, inhibarea determinată de izoproterenol (Figura 9B) sau de adrenalină (Figura 9C) este dependentă de concentrație. În prezența inhibitorului tirozin-kinazic al EGFR, erlotinib (Anghel et al., 2024), efectul izoproterenolului de inhibare a activității SRE prin GPR27 este abolit (Figura 9D). Astfel, se poate preciza că receptorul GPR27 transinhibă receptorul EGFR, fenomen descris rareori în literatură ca transinactivare (Duchene et al., 2002).

Modularea activității SRE indusă de către receptorii himerici, $\beta 1\text{AR}$ -GPR27 și GPR27- $\beta 1\text{AR}$, dar și de către versiunea truncată a receptorului GPR27 (GPR27 ΔCt) (Figura 10A), se află în corelație cu datele obținute în cazul determinării nivelului de AMPc (Figura 6B, C și E). În cazul receptorului $\beta 1\text{AR}$, regiunea ICL3 este esențială pentru cuplarea receptorului cu proteinele Gs (Qiu et al., 2024). Așadar, regiunea ICL3 a receptorului $\beta 1\text{AR}$ a fost înlocuită cu cea a receptorului GPR27 generând receptorul himeric $\beta 1\text{AR}_{\text{ICL3GPR27}}$. În prezența concentrațiilor crescute de izoproterenol, nivelul de AMPc produs de către receptorul himeric $\beta 1\text{AR}_{\text{ICL3GPR27}}$ este similar cu cel indus de receptorul $\beta 1\text{AR}$, observându-se doar o deplasare spre dreapta a curbei, deci o reducere minoră a funcționalității (Figura 10B). Prin urmare, se poate considera că regiunea ICL3 a receptorului GPR27 este compatibilă cu cea a receptorului $\beta 1\text{AR}$. Am generat receptorul himeric reciproc, GPR27 $_{\text{ICL3}\beta 1\text{AR}}$ (receptorul GPR27 cu regiunea ICL3 al receptorului $\beta 1\text{AR}$). Activitatea SRE determinată de această himeră este similară receptorului GPR27 (Figura 10C). Totodată, se remarcă din nou asemănarea dintre receptorul himeric $\beta 1\text{AR}_{\text{ICL3GPR27}}$ și $\beta 1\text{AR}$. Însă, nivelul activității SRE produs de himeră GPR27 $_{\text{ICL3}\beta 1\text{AR}}$ este de 10 ori mai mare față de cel indusă de GPR27 (Figura 10D). În consecință, regiunea ICL3 a $\beta 1\text{AR}$ cauzează o reversare a efectului inhibitor al GPR27.

Datele prezentate până acum relevă două caracteristici importante ale semnalizării GPR27: 1) inhibă activitatea SRE în prezența izoproterenolului independent de proteinele G sau β -arestină și 2) transinhibă EGFR. Însă, prin ce mecanism are loc acest fenomen? Inhibarea EGFR de către GPR27 prin izoproterenol, poate fi explicată printr-un mecanism de inactivare

al EGFR, și anume defosforilarea mediată de o tirozin-fosfatază (Ceresa and Vanlandingham, 2008) sau inhibarea unei potențiale fosforilări determinată de o kinază. Interacțiunea directă

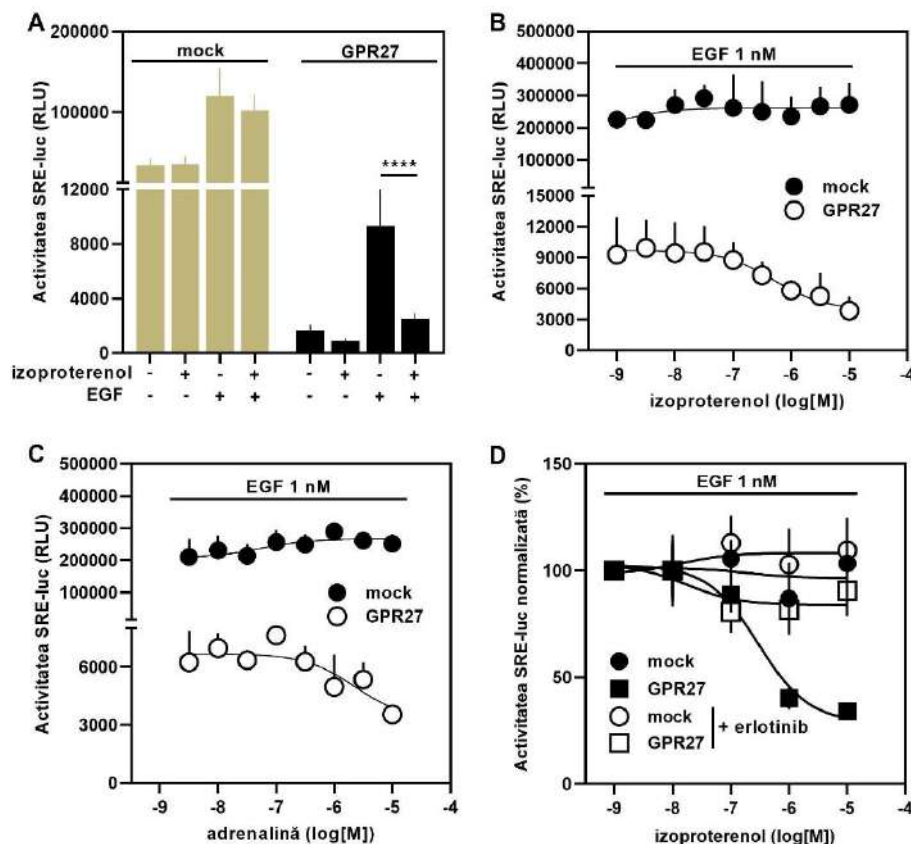


Figura 9. Liganzii adrenergici, izoproterenol și adrenalina inhibă activarea SRE indusă de către factorul de creștere epidermică (EGF) dependent de receptorul GPR27. A. Activitatea SRE indusă de EGF (1 nM) și izoproterenol (1 μ M) în celulele transfectate cu vector gol (mock) și celulele care exprimă GPR27. **B., C.** Curbă concentrație-răspuns al izoproterenolului (**B**) sau adrenalinei (**C**) în prezența a 1 nM EGF atât în cazul celulelor transfectate cu vector gol (mock), cât și în cazul celor transfectate cu GPR27. **D.** Activitatea SRE indusă de EGF și de concentrații crescânde de izoproterenol în absența sau în prezența erlotinib (10 μ M) în mock și în celulele care exprimă GPR27. Datele sunt prezentate ca medie $\pm$ DS (n = 6); ANOVA urmată de testul post-hoc Tukey comparând semnalul determinat de prezența EGF minus/plus izoproterenol (**A**). ****p<0.0001.

dintre un GPCR și kinazele Src se presupune că are loc prin domeniul C-terminal sau ICL3, dacă prezintă regiuni bogate în prolină (Berndt and Liebscher, 2021). GPR27 prezintă în regiunea ICL3 astfel de regiuni bogate în prolină, de aceea am ales să testăm un inhibitor de Src, și anume PP2 (10 μ M). Inhibarea dată de izoproterenol, în prezența EGF, dependentă de GPR27,

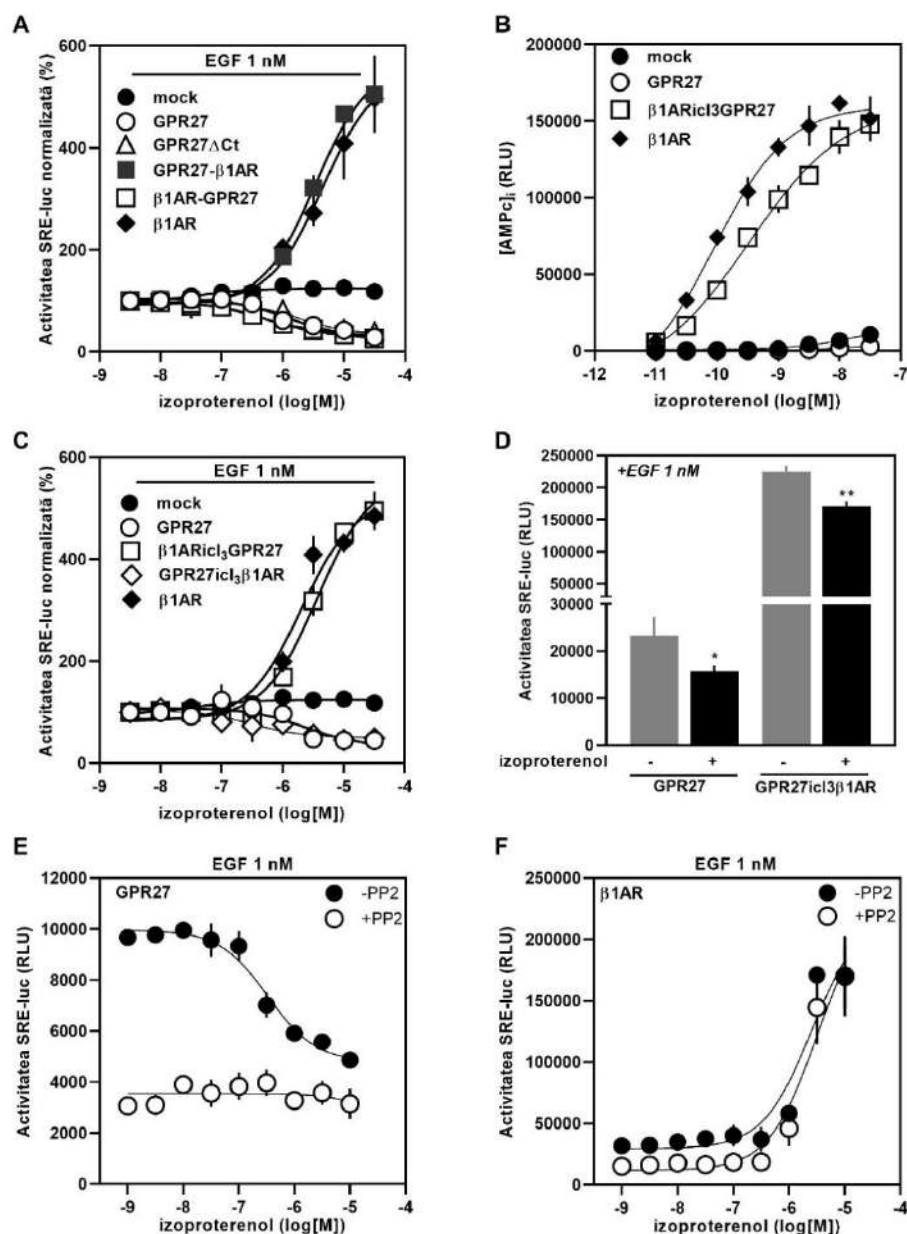


Figura 10. Izoproterenol inhibă activitatea SRE dependent de receptorul GPR27, fiind implicată o kinază din familia Src. **A.** Activitatea SRE indusă de concentrații crescute progresiv de izoproterenol, în prezența EGF, în celule care exprimă GPR27, versiunea truncată a receptorului GPR27 (GPR27 Δ Ct), receptorul β 1AR și receptorii himerici β 1AR-GPR27 și GPR27- β 1AR. **B.** Nivelul de AMPc generat de concentrații crescând de izoproterenol în celule care exprimă GPR27, β 1ARic13GPR27 și β 1AR. **C.** Activitatea SRE indusă de concentrații crescute progresiv de izoproterenol, în prezența EGF, în celule care exprimă GPR27, receptorul β 1AR și receptorii himerici β 1ARic13GPR27 și GPR27ic13 β 1AR. **D.** Activitatea SRE indusă de izoproterenol (1 μ M) în celulele ce exprimă GPR27 și receptorul himeric GPR27ic13 β 1AR

(datele brute din C). E., F. Activitatea SRE indusă de concentrații crescute de izoproterenol în prezența PP2 (10 μ M) și a EGF (1 nM) în celule care exprimă GPR27 (E) și în celule care exprimă receptorul β 1AR (F). Datele sunt exprimate ca medie $\pm$ DS (n = 3). Testul t Student compară semnalul determinat de fiecare receptor în lipsa izoproterenol cu cel dat de izoproterenol (D). *p<0.05, **p<0.01.

a fost abolită de către PP2 (Figura 10E). În egală măsură, tratamentul cu PP2 asupra celulelor care exprimă receptorul β 1 adrenergic nu produce un efect semnificativ (Figura 10F).

Reducerea expresiei receptorului GPR27 în celulele INS1E cauzează o potențare a eliberării de insulină dependentă de glucoză (Figura 11A), dar și o amplificare a activității receptorilor implicați în secreția de insulină stimulată de glucoză (Figura 11B). Aceste date se alinează cu datele obținute anterior, evidențând din nou efectul inhibitor al GPR27.

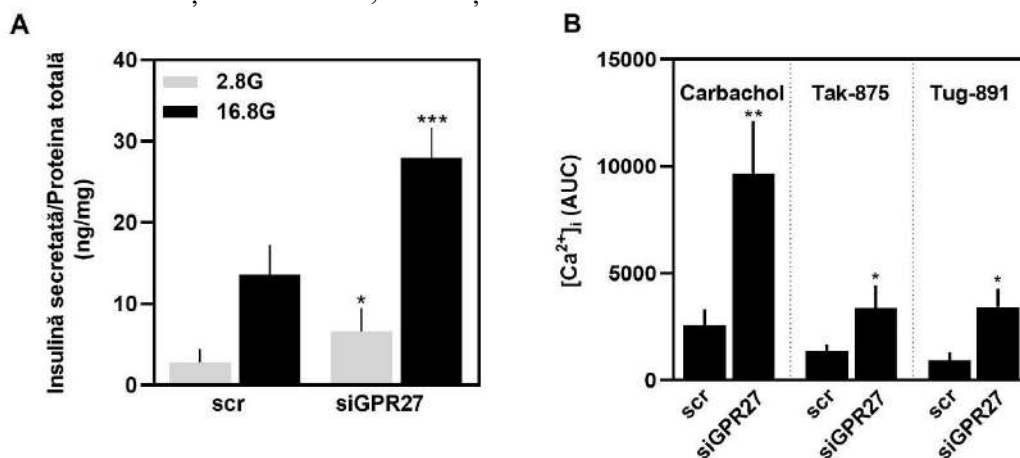


Figura 11. Reducerea expresiei receptorului GPR27 are ca efect creșterea secreției de insulină stimulată de glucoză. A. Secreția de insulină stimulată de glucoză, în două condiții – 2.8G (2.8 mM glucoză) și 16.8G (16.8 mM glucoză) în celulele transfectate cu scr sau cu siRNA specific pentru receptorul GPR27 (siGPR27). **B.** Calciu intracelular determinat de carbachol (ligand al receptorilor de acetilcolină muscarinici), Tak-875 (ligand al receptorilor de acizi grași 1, FFAR1) și Tug-891 (ligand al receptorilor de acizi grași 4, FFAR4) în celulele transfectate cu scr sau cu siGPR27. Datele sunt prezentate ca medie $\pm$ DS (n = 4-6); Testul t Student compară secreția de insulină determinată de celulele transfectate cu scr versus cele cu siGPR27 la 2,8 mM glucoză (2.8G), respectiv la 16,8 mM glucoză (16.8G) (A); Testul t Student compară semnalul determinat de carbachol, Tak-875 sau Tug-891 în celulele transfectate cu scr versus cele cu siGPR27 (B). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Concluzii finale

Prima parte a acestei lucrări demonstrează **descoperirea unor noi secretagogi naturali ai hormonului intestinal, GLP-1** care se bazează pe următoarele observații:

- Metoda pentru determinarea activității luciferazei din mediul secretat de celulele GLUTag-NLuc este rapidă și eficientă.
- Celulele GLUTag-NLuc recapitulează secreția fiziologică a hormonului GLP-1.
- Noii secretagogi identificați acoperă o gamă largă de compuși naturali, predominanți fiind flavonoidele. Acestea se regăsesc în numeroase fructe și legume (ceapă, roșie, măr, fructe de pădure).
- Din librăria de 173 compuși un singur compus a prezentat toxicitate și anume dioscina (saponină).
- Secretagogii identificați funcționează doar în prezența calciului extracelular (dovedit prin eliminarea calciului din mediu, dar și prin folosirea inhibitorului de canale de calciu de tip L, nifedipina).
- Quercetina, una dintre cele mai potente flavonoide identificate, funcționează doar în prezența glucozei, fiind implicați cei doi transportori de glucoză, SGLT1 și GLUT1. Prin blocarea farmacologică a celor doi participanți, s-a observat o scădere a secreției de GLP-1 indusă de quercetină.
- Quercetina inhibă absorbția glucozei în celule dovedit prin utilizarea unei metode non-radioactive de determinare a utilizării glucozei.
- Quercetina stimulează secreția de GLP-1 stimulată de glucoză prin creșterea nivelului de ATP, sugerând amplificarea metabolismul glucozei ca efect principal (Anghel et al., 2022).

A doua parte a acestui studiu demonstrează **apartenența receptorului GPR27 în familia receptorilor adrenergici** și ilustrează una dintre problemele deorfanzării contemporane, și anume **semnalizarea neconvențională, atipică a unor receptori GPCRs**. Punctele esențiale ale acestei părți sunt:

- Receptorul GPR27 exprimat heterolog în linia celulară HEK293T scade nivelul de AMPc în lipsa unui ligand și independent de activitatea proteinelor Gi.

- Am construit receptori himerici în care am înlocuit domeniul C-terminal al receptorului GPR27 cu domeniul C-terminal al altor receptori cunoscuți pentru a determina importanța regiunii C-terminale în semnalizarea celulară
- Am arătat prin determinarea AMPc și SRE similaritatea dintre receptorul GPR27 și receptorul himeric $\beta 1AR$ -GPR27 (receptorul $\beta 1$ -adrenergic cu domeniul C-terminal al receptorului GPR27), ambii având un efect inhibitor. Pe de altă parte, am arătat similaritatea între receptorul $\beta 1AR$ și receptorul himeric GPR27- $\beta 1AR$ (receptorul GPR27 cu domeniul C-terminal al receptorului $\beta 1AR$), amândoi demonstrând un efect stimulator în prezența liganzilor adrenergici (adrenalină și izoproterenol).
- Am testat o bibliotecă de 1403 compuși aprobați de către FDA prin determinarea nivelului de AMPc în celulele care exprimă receptorul himeric GPR27- $\beta 1AR$. Principalii liganzi identificați fac parte din compușii clasei aminergice, remarcându-se în special cei adrenergici.
- Am identificat domeniul C-terminal al receptorului $\beta 1$ -adrenergic ca fiind critic pentru efectul observat în cazul receptorului himeric GPR27- $\beta 1AR$ deoarece receptorii himerici ai GPR27 care conțin domeniul C-terminal al altor receptori (GPR27- $\alpha 1AR$, GPR27- $\beta 1AR$, GPR27- $\beta 2AR$, GPR27-M1, GPR27-GPR75), nu răspund la izoproterenol.
- Domeniul C-terminal al receptorului $\beta 1$ -adrenergic nu conferă răspuns la izoproterenol altor receptori, demonstrat prin analiza funcțională a receptorilor himerici GPR75- $\beta 1AR$ și GPR173- $\beta 1AR$ care au propriul domeniul C-terminal înlocuit cu domeniul omolog al receptorului $\beta 1AR$.
- Regiunea ICL3 a receptorului GPR27 este compatibilă cu regiunea ICL3 a receptorului $\beta 1AR$, fiind valabilă și reciprocă.
- Liganzii adrenergici nu induc modificări ale mesagerilor secundari de tipul AMPc și calciu, demonstrând în mod convingător că receptorul GPR27 nu funcționează prin activarea proteinelor G (G_i , G_s , $G_q/11$).
- Printr-o strategie de analiză funcțională integrativă bazată pe determinarea activității elementelor de răspuns ale factorilor de transcripție s-a arătat cu succes că stimularea receptorului GPR27 induce un efect celular relativ nou, slab prezentat până acum în literatura științifică, și anume transinhibarea funcției unor RTKs, precum ar fi EGFR.

- Expresia redusă a receptorului GPR27 determină creșterea secreției de insulină stimulată de glucoză.

Receptorul GPR27 este un receptor adrenergic cu o semnalizare atipică, având potențialul de a deschide un nou domeniu de cercetare a GPCRs neconvenționali. Având în vedere noutatea absolută a descoperirii și ținând cont de complexitatea fenomenului, analiza rolului *in vivo* al perechii GPR27/liganzi adrenergici va fi continuată după terminarea programului doctoral.

Articole publicate în domeniul tezei de doctorat

1. **Anghel, S. A.**, Badea, R. A., Chiritoiu, G., Patriche, D. S., Alexandru, P. R., & Pena, F. (2022). Novel luciferase-based glucagon-like peptide 1 reporter assay reveals naturally occurring secretagogues. *British journal of pharmacology*, 179(19), 4738–4753. <https://doi.org/10.1111/bph.15896>, **IF = 9.47 , Q1, AIS = 1.62**
2. Trif, C., Banica, A. M., Manolache, A., **Anghel, S. A.**, Huțanu, D. E., Stratulat, T., Badea, R., Oprita, G., Selescu, T., Petrescu, S. M., Sisignano, M., Offermanns, S., Babes, A., & Tunaru, S. (2024). Inhibition of TRPM8 function by prostacyclin receptor agonists requires coupling to Gq/11 proteins. *British journal of pharmacology*, 181(9), 1438–1451. <https://doi.org/10.1111/bph.16295>, **IF = 6.8 , Q1, AIS = 1.682**
3. **Anghel, S. A.**, Dinu-Pirvu, C. E., Costache, M. A., Voiculescu, A. M., Ghica, M. V., Anuța, V., & Popa, L. (2024). Receptor Pharmacogenomics: Deciphering Genetic Influence on Drug Response. *International journal of molecular sciences*, 25(17), 9371. <https://doi.org/10.3390/ijms25179371>, **IF = 4.9, Q1, AIS = 1.053**

Mulțumiri speciale

Doresc să-i mulțumesc conducătoarei de doctorat, Dr. Ștefana Petrescu, pentru coordonarea și sprijinul acordat, dar mai ales pentru că mi-a oferit oportunitatea de a îmi desfășura studiile doctorale în cadrul Institutului de Biochimie al Academiei Române. Prima parte a tezei de doctorat a fost realizată sub îndrumarea Dr. Florentina Pena. Celulele GLUTag-NLuc au fost generate de către echipa care a făcut parte din proiectul PLATFORMDIAB

(PED158), director de proiect Dr. Florentina Pena. De asemenea, partea a doua a lucrării a fost realizată sub îndrumarea Dr. Sorin Tunaru, în cadrul proiectului EEA-RO-NO-2018-0535 *New Generation of Drug Targets for Schizophrenia* (NEXTDRUG), în care Dr. Tunaru a fost director de proiect.

Bibliografie

- 1 Anghel, S. A., Badea, R. A., Chiritoiu, G., Patriche, D. S., Alexandru, P. R. & Pena, F. 2022. Novel luciferase-based glucagon-like peptide 1 reporter assay reveals naturally occurring secretagogues. *Br J Pharmacol*, 179, 4738-4753.
- 2 Anghel, S. A., Dinu-Pirvu, C. E., Costache, M. A., Voiculescu, A. M., Ghica, M. V., Anuta, V. & Popa, L. 2024. Receptor Pharmacogenomics: Deciphering Genetic Influence on Drug Response. *Int J Mol Sci*, 25.
- 3 Aronoff, S. L., Berkowitz, K., Shreiner, B. & Want, L. 2004. Glucose Metabolism and Regulation: Beyond Insulin and Glucagon. *Diabetes Spectrum*, 17, 183-190.
- 4 Arteaga, C. L. & Engelman, J. A. 2014. ERBB receptors: from oncogene discovery to basic science to mechanism-based cancer therapeutics. *Cancer Cell*, 25, 282-303.
- 5 Berndt, S. & Liebscher, I. 2021. New Structural Perspectives in G Protein-Coupled Receptor-Mediated Src Family Kinase Activation. *Int J Mol Sci*, 22.
- 6 Bodnaruc, A. M., Prud'homme, D., Blanchet, R. & Giroux, I. 2016. Nutritional modulation of endogenous glucagon-like peptide-1 secretion: a review. *Nutr Metab (Lond)*, 13, 92.
- 7 Breton, T. S., Fike, S., Francis, M., Patnaude, M., Murray, C. A. & Dimaggio, M. A. 2023. Characterizing the SREB G protein-coupled receptor family in fish: Brain gene expression and genomic differences in upstream transcription factor binding sites. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 285, 111507.
- 8 Breton, T. S., Sampson, W. G. B., Clifford, B., Phaneuf, A. M., Smidt, I., True, T., Wilcox, A. R., Lipscomb, T., Murray, C. & Dimaggio, M. A. 2021. Characterization of the G protein-coupled receptor family SREB across fish evolution. *Sci Rep*, 11, 12066.
- 9 Cai, C., Hu, L., Wu, K. & Liu, Y. 2024. GPR27 expression correlates with prognosis and tumor progression in gliomas. *PeerJ*, 12, e17024.
- 10 Calella, P., Di Dio, M., Pelullo, C. P., Di Giuseppe, G., Liguori, F., Paduano, G., Valerio, G., Liguori, G. & Gallè, F. 2024. Sedentary Behaviors and Eating Habits in Active and Inactive Individuals: A Cross-Sectional Study in a Population from Southern Italy. *Behav Sci*, 14, 208.
- 11 Ceresa, B. P. & Vanlandingham, P. A. 2008. Molecular Mechanisms that Regulate Epidermal Growth Factor Receptor Inactivation. *Clin Med Oncol*, 2, 47-61.
- 12 Cheng, Z., Garvin, D., Paguio, A., Stecha, P., Wood, K. & Fan, F. 2010. Luciferase Reporter Assay System for Deciphering GPCR Pathways. *Curr Chem Genomics*, 4, 84-91.
- 13 Chopra, D. G., Yiv, N., Hennings, T. G., Zhang, Y. & Ku, G. M. 2020. Deletion of Gpr27 in vivo reduces insulin mRNA but does not result in diabetes. *Sci Rep*, 10, 5629.
- 14 Chung, W. C. & Kermode, J. C. 2005. Suramin disrupts receptor-G protein coupling by blocking association of G protein alpha and betagamma subunits. *J Pharmacol Exp Ther*, 313, 191-8.
- 15 Daub, H., Weiss, F. U., Wallasch, C. & Ullrich, A. 1996. Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors. *Nature*, 379, 557-60.

- 16 Defronzo, R. A., Triplitt, C. L., Abdul-Ghani, M. & Cersosimo, E. 2014. Novel Agents for the Treatment of Type 2 Diabetes. *Diabetes Spectr*, 27, 100-12.
- 17 Delcourt, N., Bockaert, J. & Marin, P. 2007. GPCR-jacking: from a new route in RTK signalling to a new concept in GPCR activation. *Trends Pharmacol Sci*, 28, 602-7.
- 18 Dinda, B., Dinda, M., Roy, A. & Dinda, S. 2020. Dietary plant flavonoids in prevention of obesity and diabetes. *Adv Protein Chem Struct Biol*, 120, 159-235.
- 19 Dolanc, D., Zorec, T. M., Smole, Z., Maver, A., Horvat, A., Pillaiyar, T., Trkov Bobnar, S., Vardjan, N., Kreft, M., Chowdhury, H. H. & Zorec, R. 2022. The Activation of GPR27 Increases Cytosolic L-Lactate in 3T3 Embryonic Cells and Astrocytes. *Cells*, 11.
- 20 Duchene, J., Schanstra, J. P., Pecher, C., Pizard, A., Susini, C., Esteve, J. P., Bascands, J. L. & Girolami, J. P. 2002. A novel protein-protein interaction between a G protein-coupled receptor and the phosphatase SHP-2 is involved in bradykinin-induced inhibition of cell proliferation. *J Biol Chem*, 277, 40375-83.
- 21 Dupuis, N., Laschet, C., Franssen, D., Szpakowska, M., Gilissen, J., Geubelle, P., Soni, A., Parent, A. S., Pirotte, B., Chevigne, A., Twizere, J. C. & Hanson, J. 2017. Activation of the Orphan G Protein-Coupled Receptor GPR27 by Surrogate Ligands Promotes beta-Arrestin 2 Recruitment. *Mol Pharmacol*, 91, 595-608.
- 22 Ferhatbegovic, L., Masic, D. & Macic-Dzankovic, A. 2023. The benefits of GLP1 receptors in cardiovascular diseases. *Front Clin Diabetes Healthc*, 4, 1293926.
- 23 Gilbert, M. P. & Pratley, R. E. 2020. GLP-1 Analogs and DPP-4 Inhibitors in Type 2 Diabetes Therapy: Review of Head-to-Head Clinical Trials. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 11, 178.
- 24 Gribble, F. M., Williams, L., Simpson, A. K. & Reimann, F. 2003. A novel glucose-sensing mechanism contributing to glucagon-like peptide-1 secretion from the GLUTag cell line. *Diabetes*, 52, 1147-54.
- 25 Grundmann, M., Merten, N., Malfacini, D., Inoue, A., Preis, P., Simon, K., Ruttiger, N., Ziegler, N., Benkel, T., Schmitt, N. K., Ishida, S., Muller, I., Reher, R., Kawakami, K., Inoue, A., Rick, U., Kuhl, T., Imhof, D., Aoki, J., Konig, G. M., Hoffmann, C., Gomeza, J., Wess, J. & Kostenis, E. 2018. Lack of beta-arrestin signaling in the absence of active G proteins. *Nat Commun*, 9, 341.
- 26 Habegger, K. M. 2022. Cross Talk Between Insulin and Glucagon Receptor Signaling in the Hepatocyte. *Diabetes*, 71, 1842-1851.
- 27 Hallett, R. M., Dvorkin-Gheva, A., Bane, A. & Hassell, J. A. 2012. A gene signature for predicting outcome in patients with basal-like breast cancer. *Sci Rep*, 2, 227.
- 28 Han, S. H., Safeek, R., Ockerman, K., Trieu, N., Mars, P., Klenke, A., Furnas, H. & Sorice-Virk, S. 2023. Public Interest in the Off-Label Use of Glucagon-like Peptide 1 Agonists (Ozempic) for Cosmetic Weight Loss: A Google Trends Analysis. *Aesthet Surg J*, 44, 60-67.
- 29 Hauser, A. S., Attwood, M. M., Rask-Andersen, M., Schioth, H. B. & Gloriam, D. E. 2017. Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications. *Nat Rev Drug Discov*, 16, 829-842.
- 30 Hossain, M. S., Mineno, K. & Katafuchi, T. 2016. Neuronal Orphan G-Protein Coupled Receptor Proteins Mediate Plasmalogens-Induced Activation of ERK and Akt Signaling. *PLoS One*, 11, e0150846.
- 31 Hu, F. B. 2011. Globalization of Diabetes. *Diabetes Care*, 34, 1249-1257.
- 32 Human Protein Atlas RNA and Protein Expression Summary of GPR27 available from <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000170837-GPR27/tissue>, accessed on 19th February 2025.

- 33 Jean-Charles, P. Y., Kaur, S. & Shenoy, S. K. 2017. G Protein-Coupled Receptor Signaling Through β -Arrestin-Dependent Mechanisms. *J Cardiovasc Pharmacol*, 70, 142-158.
- 34 Jin, C., Kang, H., Ryu, J. R., Kim, S., Zhang, Y., Lee, Y., Kim, Y. & Han, K. 2018. Integrative Brain Transcriptome Analysis Reveals Region-Specific and Broad Molecular Changes in Shank3-Overexpressing Mice. *Front Mol Neurosci*, 11, 250.
- 35 Jobe, A. & Vijayan, R. 2024. Orphan G protein-coupled receptors: the ongoing search for a home. *Front Pharmacol*, 15, 1349097.
- 36 Kaafarani, A., Darche-Gabinaud, R., Bisteau, X., Imbault, V., Wittamer, V., Parmentier, M. & Pirson, I. 2023. Proximity Interactome Analysis of Super Conserved Receptors Expressed in the Brain Identifies EPB41L2, SLC3A2, and LRBA as Main Partners. *Cells*, 12.
- 37 Karuppagounder, V., Bajpai, A., Meng, S., Arumugam, S., Sreedhar, R., Giridharan, V. V., Guha, A., Bhimaraj, A., Youker, K. A., Palaniyandi, S. S., Karmouty-Quintana, H., Kamal, F., Spiller, K. L., Watanabe, K. & Thandavarayan, R. A. 2018. Small molecule disruption of G protein betagamma subunit signaling reprograms human macrophage phenotype and prevents autoimmune myocarditis in rats. *PLoS One*, 13, e0200697.
- 38 Kazafeos, K. 2011. Incretin effect: GLP-1, GIP, DPP4. *Diabetes Res Clin Pract*, 93 Suppl 1, S32-6.
- 39 Keen, A. C., Pedersen, M. H., Lemel, L., Scott, D. J., Canals, M., Littler, D. R., Beddoe, T., Ono, Y., Shi, L., Inoue, A., Javitch, J. A. & Lane, J. R. 2022. OZITX, a pertussis toxin-like protein for occluding inhibitory G protein signalling including Galpha(z). *Commun Biol*, 5, 256.
- 40 Koole, C., Pabreja, K., Savage, E. E., Wootten, D., Furness, S. G., Miller, L. J., Christopoulos, A., & Sexton, P. M. 2013. Recent advances in understanding GLP-1R (glucagon-like peptide-1 receptor) function. *Biochem Soc Trans*, 41, 172-179.
- 41 Krieger, J. P. 2020. Intestinal glucagon-like peptide-1 effects on food intake: Physiological relevance and emerging mechanisms. *Peptides*, 131, 170342.
- 42 Ku, G. M., Pappalardo, Z., Luo, C. C., German, M. S. & Mcmanus, M. T. 2012. An siRNA screen in pancreatic beta cells reveals a role for Gpr27 in insulin production. *PLoS Genet*, 8, e1002449.
- 43 Kuhre, R. E., Deacon, C. F., Holst, J. J. & Petersen, N. 2021. What Is an L-Cell and How Do We Study the Secretory Mechanisms of the L-Cell? *Front Endocrinol (Lausanne)*, 12, 694284.
- 44 Kuhre, R. E., Frost, C. R., Svendsen, B. & Holst, J. J. 2015. Molecular mechanisms of glucose-stimulated GLP-1 secretion from perfused rat small intestine. *Diabetes*, 64, 370-82.
- 45 Lando, M., Fjeldbo, C. S., Wilting, S. M., B, C. S., Aarnes, E. K., Forsberg, M. F., Kristensen, G. B., Steenbergen, R. D. & Lyng, H. 2015. Interplay between promoter methylation and chromosomal loss in gene silencing at 3p11-p14 in cervical cancer. *Epigenetics*, 10, 970-80.
- 46 Lefkowitz, R. J. 2007. Seven transmembrane receptors: something old, something new. *Acta physiologica*, 190, 9-19.
- 47 Lexchin, J. & Mintzes, B. 2023. Semaglutide: a new drug for the treatment of obesity. *Drug Ther Bull*, 61, 182-188.
- 48 Livingston, W. S., Gill, J. M., Cota, M. R., Olivera, A., O'keefe, J. L., Martin, C. & Latour, L. L. 2017. Differential Gene Expression Associated with Meningeal Injury in Acute Mild Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma*, 34, 853-860.
- 49 Locht, C. & Antoine, R. 1995. A proposed mechanism of ADP-ribosylation catalyzed by the pertussis toxin S1 subunit. *Biochimie*, 77, 333-40.

- 50 Martin, A. L., Steurer, M. A. & Aronstam, R. S. 2015. Constitutive Activity among Orphan Class-A G Protein Coupled Receptors. *PLoS One*, 10, e0138463.
- 51 Martin, M. A. & Ramos, S. 2021. Dietary Flavonoids and Insulin Signaling in Diabetes and Obesity. *Cells*, 10.
- 52 Matsumoto, M., Saito, T., Takasaki, J., Kamohara, M., Sugimoto, T., Kobayashi, M., Tadokoro, M., Matsumoto, S., Ohishi, T. & Furuichi, K. 2000. An evolutionarily conserved G-protein coupled receptor family, SREB, expressed in the central nervous system. *Biochem Biophys Res Commun*, 272, 576-82.
- 53 Milligan, G., Kostenis, E. 2006. Heterotrimeric G-proteins: a short history. *Br J Pharmacol*, 147, S46–S55.
- 54 Nath, A. K., Ma, J., Chen, Z. Z., Li, Z., Vitery, M. D. C., Kelley, M. L., Peterson, R. T., Gerszten, R. E. & Yeh, J. J. 2020. Genetic deletion of gpr27 alters acylcarnitine metabolism, insulin sensitivity, and glucose homeostasis in zebrafish. *FASEB J*, 34, 1546-1557.
- 55 Nishimura, A., Kitano, K., Takasaki, J., Taniguchi, M., Mizuno, N., Tago, K., Hakoshima, T. & Itoh, H. 2010. Structural basis for the specific inhibition of heterotrimeric Gq protein by a small molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 13666-71.
- 56 O'dowd, B. F., Nguyen, T., Marchese, A., Cheng, R., Lynch, K. R., Heng, H. H., Kolakowski, L. F., Jr. & George, S. R. 1998. Discovery of three novel G-protein-coupled receptor genes. *Genomics*, 47, 310-3.
- 57 Oh, J.-H., Jo, S., Park, K. W., Lee, E.-J., Lee, S. H., Hwang, Y. S., Jeon, H. R., Ryu, Y., Yoon, H. J., Chun, S.-M., Kim, C. J., Kim, T. W., Sung, C. O., Chae, S. & Chung, S. J. 2023. Whole-genome sequencing reveals an association between small genomic deletions and an increased risk of developing Parkinson's disease. *Exp Mol Med*, 55, 555-564.
- 58 Pan, J. & Gao, Y. 2023. Prognostic significance and immune characteristics of GPR27 in gastric cancer. *Aging (Albany NY)*, 15, 9144-9166.
- 59 Pariani, M. J., Spencer, A., Graham, J. M., Jr. & Rimoin, D. L. 2009. A 785kb deletion of 3p14.1p13, including the FOXP1 gene, associated with speech delay, contractures, hypertonia and blepharophimosis. *Eur J Med Genet*, 52, 123-7.
- 60 Petek, E., Windpassinger, C., Simma, B., Mueller, T., Wagner, K. & Kroisel, P. M. 2003. Molecular characterisation of a 15 Mb constitutional de novo interstitial deletion of chromosome 3p in a boy with developmental delay and congenital anomalies. *J Hum Genet*, 48, 283-287.
- 61 Pillaiyar, T., Rosato, F., Wozniak, M., Blavier, J., Charles, M., Laschet, C., Kronenberger, T., Muller, C. E. & Hanson, J. 2021. Structure-activity relationships of agonists for the orphan G protein-coupled receptor GPR27. *Eur J Med Chem*, 225, 113777.
- 62 Pillaiyar, T., Wozniak, M., Abboud, D., Rasch, A., Liebing, A. D., Poso, A., Kronenberger, T., Staubert, C., Laufer, S. A. & Hanson, J. 2023. Development of Ligands for the Super Conserved Orphan G Protein-Coupled Receptor GPR27 with Improved Efficacy and Potency. *J Med Chem*, 66, 17118-17137.
- 63 Qiu, X., Chao, K., Song, S., Wang, Y. Q., Chen, Y. A., Rouse, S. L., Yen, H. Y. & Robinson, C. V. 2024. Coupling and Activation of the beta1 Adrenergic Receptor - The Role of the Third Intracellular Loop. *J Am Chem Soc*, 146, 28527-37.
- 64 Reimann, F. & Gribble, F. M. 2002. Glucose-sensing in glucagon-like peptide-1-secreting cells. *Diabetes*, 51, 2757-63.
- 65 Reimann, F., Habib, A. M., Tolhurst, G., Parker, H. E., Rogers, G. J. & Gribble, F. M. 2008. Glucose sensing in L cells: a primary cell study. *Cell Metab*, 8, 532-9.

- 66 Ribrioux, S., Brungger, A., Baumgarten, B., Seuwen, K. & John, M. R. 2008. Bioinformatics prediction of overlapping frameshifted translation products in mammalian transcripts. *BMC Genomics*, 9, 122.
- 67 Rutkove, S. B., Chen, Z. Z., Pandeya, S., Callegari, S., Mourey, T., Nagy, J. A. & Nath, A. K. 2023. Surface Electrical Impedance Myography Detects Skeletal Muscle Atrophy in Aged Wildtype Zebrafish and Aged gpr27 Knockout Zebrafish. *Biomedicines*, 11.
- 68 Schmitt, C. C., Aranas, T., Viel, T., Chateau, D., Le Gall, M., Waligora-Dupriet, A. J., Melchior, C., Rouxel, O., Kapel, N., Gourcerol, G., Tavitian, B., Lehuen, A., Brot-Laroche, E., Leturque, A., Serradas, P. & Grosfeld, A. 2017. Intestinal invalidation of the glucose transporter GLUT2 delays tissue distribution of glucose and reveals an unexpected role in gut homeostasis. *Mol Metab*, 6, 61-72.
- 69 Sharma, A., Rijavec, M., Tomar, S., Yamani, A., Ganesan, V., Krempski, J., Schuler, C. F. T., Bunyavanich, S., Korosec, P. & Hogan, S. P. 2023. Acute systemic myeloid inflammatory and stress response in severe food allergic reactions. *Clin Exp Allergy*, 53, 536-549.
- 70 Shore, D. M. & Reggio, P. H. 2015. The therapeutic potential of orphan GPCRs, GPR35 and GPR55. *Front Pharmacol*, 6.
- 71 Siehler, S. 2009. Regulation of RhoGEF proteins by G12/13-coupled receptors. *Br J Pharmacol*, 158, 41-9.
- 72 Spreckley, E. 2015. The L-cell in nutritional sensing and the regulation of appetite. *Front nutr*, 2.
- 73 Sun, E. W., De Fontgalland, D., Rabbitt, P., Hollington, P., Sposato, L., Due, S. L., Wattchow, D. A., Rayner, C. K., Deane, A. M., Young, R. L. & Keating, D. J. 2017. Mechanisms Controlling Glucose-Induced GLP-1 Secretion in Human Small Intestine. *Diabetes*, 66, 2144-2149.
- 74 Tang, X.-L., Wang, Y., Li, D.-L., Luo, J. & Liu, M.-Y. 2012. Orphan G protein-coupled receptors (GPCRs): biological functions and potential drug targets. *Acta Pharmacol Sin*, 33, 363-371.
- 75 Targetmol https://www.targetmol.com/compound-library/fda_approved_drug_library, accessed on september 5, 2024.
- 76 The Cancer Genome Atlas Program <https://portal.gdc.cancer.gov/genes/ENSG00000170837>, accessed on september 5, 2024.
- 77 Thor, D. 2022. G protein-coupled receptors as regulators of pancreatic islet functionality. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1869, 119235.
- 78 Wang, H., Du, D., Huang, J., Wang, S., He, X., Yuan, S. & Xiao, J. 2022. GPR27 Regulates Hepatocellular Carcinoma Progression via MAPK/ERK Pathway. *Cancer Manag Res*, 14, 1165-1177.
- 79 Wang, X., Qin, W., Song, M., Zhang, Y. & Sun, B. 2016. Exogenous carbon monoxide inhibits neutrophil infiltration in LPS-induced sepsis by interfering with FPR1 via p38 MAPK but not GRK2. *Oncotarget*, 7, 34250-65.
- 80 Yanai, T., Kurosawa, A., Nikaido, Y., Nakajima, N., Saito, T., Osada, H., Konno, A., Hirai, H. & Takeda, S. 2016. Identification and molecular docking studies for novel inverse agonists of SREB, super conserved receptor expressed in brain. *Genes Cells*, 21, 717-27.
- 81 Zhang, P., Zhang, J., Kou, W., Gu, G., Zhang, Y., Shi, W., Chu, P., Liang, D., Sun, G. & Shang, J. 2023. Comprehensive analysis of a pyroptosis-related gene signature of clinical and biological values in spinal cord injury. *Front Neurol*, 14, 1141939.