

## NOVÉ POHLEDY NA ÚČINKY G PROTEINU SPOJENÉHO S RECEPTOREM, VÝZNAM PŘI HLEDÁNÍ NOVÝCH LÉČIV

Věnováno prof. MUDr. Tomáši Zimovi, DrSc., k jeho 50. narozeninám

VĚRA KLENEROVÁ a SIXTUS HYNIE

Univerzita Karlova v Praze, 1. LF UK ÚLBLD, Albertov 4,  
128 00 Praha 2

vera.klenerova@LF1.cuni.cz

Došlo 8.9.16, přijato 24.10.16.

Klíčová slova: signalizace, G protein, receptor spřažený s G proteinem, biased ligandy, arrestin, struktura receptorů, objev nových léčiv

### Obsah

1. Úvod
2. Přenos signálu na molekulární a buněčné úrovni
  - 2.1. Hypotéza druhého messengeru
  - 2.2. Objev G proteinu
  - 2.3. G protein
  - 2.4. Molekulové přepínače a konformace G proteinu
3. Receptory spřažené s G proteiny (GPCR)
4. Zaměření výzkumu GPCR
  - 4.1. Přínos výzkumu R. J. Lefkowitz a B. K. Kobilky
  - 4.2. Funkce ligandů a GPCR
5. Receptorové adaptační mechanismy
  - 5.1. Desensitizace
  - 5.2. Arrestin
  - 5.3. Vazebná místa na receptoru a funkce ligandů
6. Nové technologie studia receptorů
  - 6.1. Izolace a purifikace GPCR
  - 6.2. Konformační změny GPCR
  - 6.3. Krystalografie a další fyzikální metody
  - 6.4. Modelování prostorové struktury GPCR
  - 6.5. Hledání optimálních kandidátů na léčiva
7. Závěr

### 1. Úvod

Mezioborový výzkum posledního období se vyznačuje pozoruhodnými poznatky o mezibuněčné komunikaci. Sofistikovaná komunikační síť umožňuje udržení homeostázy organismu s využitím chemických messengerů. Objev G regulačních proteinů nastartoval rozsáhlý výzkum receptorů spřažených s regulačními mechanismy. Pro snazší prezentaci novějších informací stručně shrnujeme některé ze základních údajů o transdukčních pochodech. Na regulaci buněčných funkcí se podílí extracelulární signální

molekuly, jako jsou hormony, neurotransmitery a jiné působky, a také informace zprostředkované smysly, zrakem, čichem a chutí. Působení těchto tzv. prvních posílů na receptory lokalizované v plazmatické membráně vede k tvorbě druhých posílů, po stimulaci efektorového enzymu, s následnou aktivací příslušných proteinkinaz a fosforylaci proteinů zapojených v buněčném metabolismu<sup>1</sup>. Významnými posly jsou 3',5'-cyklický AMP (cAMP); 3',5'-cyklický GMP (cGMP); 1,2-diacylglycerol (DAG); inositol 1,4,5-trisfosfát (IP<sub>3</sub>); fosfoinositidy a vápenaté ionty. Základní typy přenosu signálů jsou dnes již uváděny v běžných učebnicích fyziologie<sup>2</sup>, chemie a biochemie<sup>3,4</sup>, neurobiologie<sup>5</sup> i farmakologie<sup>6,7</sup>.

Samostatnou kapitolu tvoří procesy regulující dostupnost a funkčnost receptorů a význam ligandů. Velkým přínosem byly také objevy nových signálních molekul, které regulují buněčné funkce na úrovni přepisu genetické informace. Odkazujeme na české přehledové články se souborným zpracováním daného tématu<sup>8–12</sup>.

V našem přehledu se zaměřujeme především na poznatky, které se týkají nově objevených funkcí receptorů spřažených („coupled“) s G regulačními proteiny (GPCR) s možností jejich potenciálního využití, a na výsledky odhalující podrobnou strukturu těchto receptorů. Umístění vazebných míst pro ligandy na GPCR činí z těchto míst pochopitelné cíle pro terapeutické zásahy<sup>9,13</sup>.

### 2. Přenos signálu na molekulární a buněčné úrovni

Hormony, neurotransmitery a další látky, např. léčiva, toxiny aj., jsou nositeli signálu, který je předáván na cílové buňky. Na základě těchto poznatků bylo formulováno mnoho hypotéz o příčinách a vzniku řady onemocnění. U těchto onemocnění je zdůrazňována biologická podstata, avšak k získání terapeutických prostředků je nutná znalost mechanismu přenosu signálu, především úlohy signálních molekul, tzv. ligandů. Mechanismus účinku ligandů závisí na jejich rozpustnosti v polárním nebo nepolárním prostředí a dle toho je dělíme na hydrofilní a lipofilní. Lipofilní ligandy pronikají do nitra buňky, kde aktivují cytoplazmatické nebo jaderné receptory. Jejich účinky jsou dlouhodobé v důsledku stimulace transkripce a následné tvorby funkčních proteinů.

U receptorů spřažených s G proteiny působí především hydrofilní ligandy, které zůstávají extracelulárně, neboť cytoplazmatická membrána je pro ně nepropustná. Pro jejich účinek je v plazmatické membráně nutná přítomnost specifických receptorů a podle typu ovlivňovaného receptor-efektorového systému dochází ke kaskádovitě aktivaci příslušných nitrobuněčných enzymových systémů.

Teprve nedávné studie ukázaly, že aktivace G proteinu umožňuje zprostředkování efektu nejen druhými posly působícími v cytoplasmě, ale i mechanismy, které využívají prepis genetické informace v jádře<sup>4</sup>. V našem přehledu se zaměřujeme především na výsledky, které se týkají nově objevených funkcí GPCR, tj. spřažení efektoru s receptorem pomocí G regulačního proteinu a jejich ovlivnění různými typy ligandů.

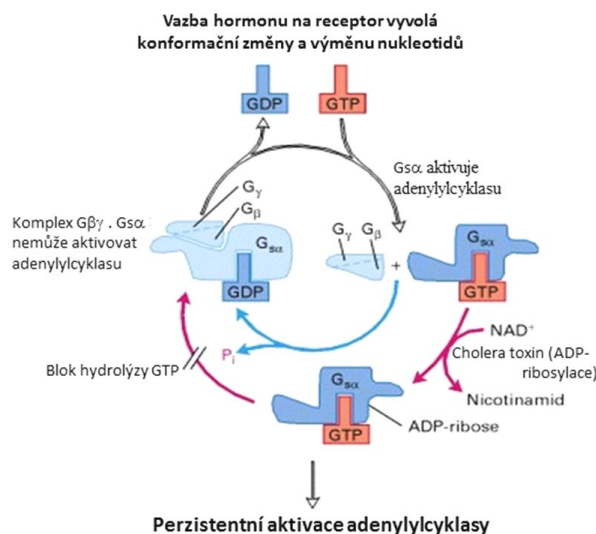
### 2.1. Hypotéza druhého messengeru

Přelomem v poznání regulačních mechanismů byl objev E. W. Sutherlanda, který při svých výzkumech týkajících se mechanismu účinku adrenalinu objevil úlohu cAMP jako druhého posla hormonálních účinků. Tento objev, oceněný Nobelovou cenou za medicínu a fyziologii pro rok 1971 (cit.<sup>14,15</sup>), viz přehled<sup>10</sup>, měl a dosud má velký praktický význam pro všechny teoretické i klinické medicínské obory. Objev cAMP zahájil intenzivní výzkum a následující objevy týkající se transdukčních pochodů, z nichž mnohé byly také oceněny Nobelovou cenou, daly Sutherlandovi plně za pravdu. Objevy týkající se zprostředkování účinku druhých poslů prostřednictvím fosforylace nitrobuněčných proteinů<sup>16</sup> byly oceněny Nobelovou cenou pro Paula Greengarda v r. 2000. Významné novější poznatky se týkají především receptorů spřažených s G regulačními proteiny (GPCR). Tento komplex se zdá být hlavním místem zásahu nejen klasických agonistů a antagonistů příslušných receptorů, ale také novodobých látek s alosterickými účinky na receptorech nebo látek, jejichž účinnost („efficacy“) spočívá v ovlivnění některých jiných pochodů, které nesouvisí bezprostředně s aktivací receptoru, tzv. adaptačních změn receptorů (viz níže). Této perspektivní oblasti, která umožní přípravu nových typů látek, je v současnosti věnována mimořádná pozornost.

### 2.2. Objev G proteinu

Za objev a popsání funkce G proteinu obdrželi v roce 1994 Alfred G. Gilman<sup>17</sup> a Martin Rodbell<sup>18</sup> Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu (viz cit.<sup>10</sup>). Gilman a Rodbell se původně snažili vysvětlit mechanismus stimulace buněk adrenalinem. Zjistili, že příslušné nitrobuněčné enzymové systémy, jako např. adenylylcyklasa, nejsou aktivovány receptorem přímo, ale prostřednictvím G proteinu<sup>19,20</sup>.

Z řady objevných studií o existenci a úloze G proteinu jsou i práce českého vědce Sixta Hynieho o účinku guaninových nukleotidů a cholera toxinu<sup>21</sup>. Cholera toxin vyvolal dlouhodobé zvýšení aktivity adenylylcyklasy způsobenou perzistentní aktivací G proteinu, aniž by ovlivňoval aktivitu fosfodiesterasy. Vysoké hladiny cAMP nastartovaly kaskádu reakcí vedoucí ke klinické manifestaci cholery<sup>22</sup>. T. W. Rall<sup>23</sup> popsal tento objev S. Hynieho následovně: „During the past decade several important clues have been unearthed which have led to marked advances in our understanding of the mechanisms involved in the regulation of adenylate cyclase activities by hormones.



Obr. 1. Účinek cholera toxinu na aktivaci adenylylcyklasy. Za normálního stavu je GTP v aktivním komplexu  $G_{\alpha s}$ -GTP rychle hydrolyzován (modrá šipka) a díky tomu je aktivace adenylylcyklasy a vzestup cAMP pouze při působení hormonu či jiného ligandu. V přítomnosti cholera toxinu (červená šipka) je  $G_{\alpha s}$  ireverzibilně modifikován přítomností ADP-ribosylu, což brání hydrolyze GTP a působí permanentní aktivaci adenylylcyklasy. Obrázek je převzat z učebnice Molecular Cell Biology<sup>4</sup>, kterou plně doporučujeme pro velmi přehledný a srozumitelný text

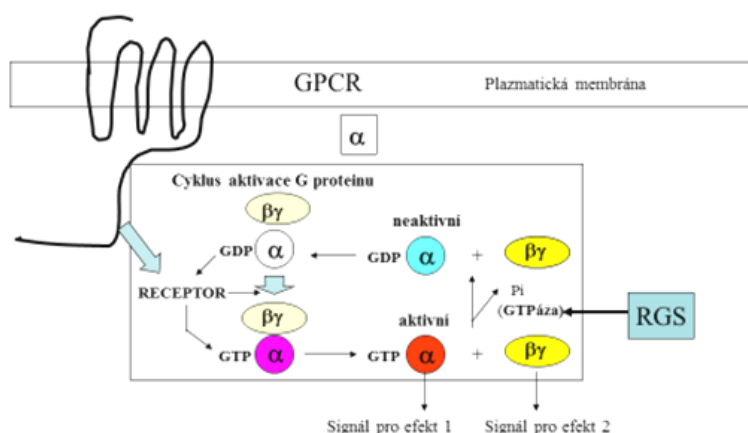
*Two of the most significant findings, the stimulatory effect of guanyl nucleotides<sup>20</sup> or cholera toxin<sup>21</sup> on adenylate cyclase activity, were reported within a few months of each other. These observations developed into more or less independent lines of investigation which recently have converged dramatically“.*

Na obr. 1 je demonstrován permanentní účinek cholera toxinu na aktivitu adenylylcyklasy, vedoucí k 100násobnému i vícenásobnému zvýšení hladiny cAMP v cytozolu. Studie s bakteriálními toxiny značně přispěly k pochopení funkcí různých G proteinů a tyto informace byly klíčové nejen pro pochopení mechanismu signalizace, ale také pro objevení nových ligandů ovlivňujících tento mechanismus.

### 2.3. Složení a funkce G protein

Regulační G proteiny mají funkci transduceru a jsou složeny ze tří podjednotek alfa, beta a gama, podle snižující se molekulární hmotnosti, a vytvářejí heterotrimer. Komplex beta-gama je funkčně shodný u většiny G proteinů, zatímco odlišnosti v alfa podjednotce určují typ a funkci G proteinu. Dělí se podle aminové sekvence  $G_{\alpha}$  do 4 tříd (alfa stimulační, inhibiční/o,  $G_{q/11}$  a  $G_{12/13}$ ). Všechny  $\alpha$  podjednotky mají schopnost vázat GTP a po navázání na efektor mají GTPasovou aktivitu. Na obr. 2 jsou znázorněny podjednotky G proteinu, alfa ( $G_{\alpha}$ ) s navázaným GDP

Membránový GPCR a vliv regulátoru G-proteinové signalizace (RGS) na urychlení rozkladu GTP.



Obr. 2. Cyklus aktivace G proteinů a možnost jeho ovlivnění regulátory G proteinové signalizace (RGS). Na schématu je demonstrována dvojitá aktivace G proteinů:  $\alpha$  podjednotky jsou klasickými signály aktivace enzymových efektorů (signál pro efekt 1), zatímco  $\beta/\gamma$  podjednotky jsou signály jen několika málo efektorů, jako jsou např. iontové kanály (signál pro efekt 2). Na schématu jsou uvedeny regulátory G proteinové signalizace (RGS), které vazbou na  $G\alpha$ -GTP urychlují rozklad GTP a tím urychlují ukončení aktivního stavu G proteinu. Převzato z práce<sup>9</sup>

a beta a gamma ( $G_{\beta\gamma}$ ), které jsou těsně spojeny. Jakmile dojde k vazbě GTP na  $\alpha$  podjednotku, komplex  $G_{\alpha}$ -GTP se odděluje od  $G_{\beta\gamma}$ . Podjednotka  $G_{\alpha}$  s navázaným GTP aktivuje efektorové proteiny, dokud nedojde k hydrolyze navázaného GTP na GDP.  $G_{\alpha}$  podjednotka je sama GTPasou, a je tak schopná katalyzovat vlastní inaktivaci. Po hydrolyze GTP se inaktivovaná  $G_{\alpha}$  opět asociuje s  $G_{\beta\gamma}$  a vzniklý heterotrimer má za následek ukončení aktivace receptor-effektorového komplexu.

Podle zastoupení G podjednotek, lze G proteiny rozdělit na dvě skupiny, na velké heterotrimerické G proteiny tvořené podjednotkami  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  a druhou skupinu tzv. malých G proteinů, která je tvořena pouze  $\alpha$  podjednotkou a patří do rodiny Ras malých GTPas<sup>24</sup>. Malé GTPasy vážou podobně jako heterotrimerické G proteiny GDP a GTP, a jsou také zodpovědné za přenos signálu. Do této třídy patří regulační proteiny z pěti rodin, Ras, Rho, Rab, Ran a ArfSar, blíže přehled<sup>25</sup>. Na rozdíl od heterotrimerických G proteinů existují jako monomery a fungují jako samostatná  $G_{\alpha}$  podjednotka, na kterou je navázané GDP. Diskrepance v rychlosti zastavení biologického pochodu, který byl stimulován aktivovanou Gas a *in vitro* vyšší rychlostí rozkladu GTP na navázané  $\alpha$  podjednotce, vedly k objevu regulátorů G proteinové signalizace, které vazbou na G-GTP urychlují rozklad GTP<sup>26</sup>.

#### 2.4. Molekulové přepínače a konformace G proteinu

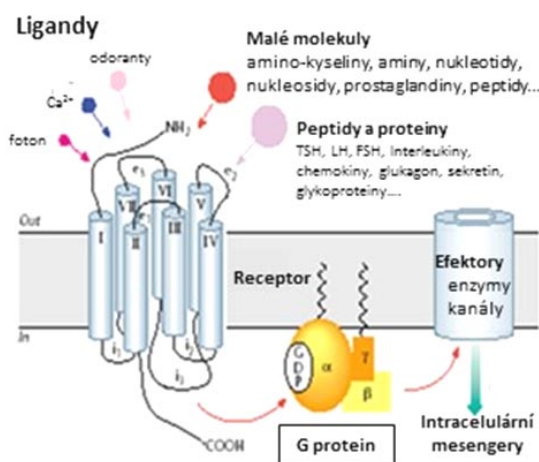
Podle tradičního receptorového modelu se receptory nacházejí ve dvou stavech, aktivním ( $R^*$ ) s vysokou afini-

ty a inaktivním ( $R$ ) stavu s nízkou afinitou ke G proteinu. Vazba ligandu na receptor mění rovnováhu mezi oběma stavy tak, že ji posouvá směrem k  $R^*$  stavu. Z toho vyplývající biologická odpověď se označuje jako účinnost ligandu, tzv. „ligand efficacy“ a používá se k popisu účinku ligandů na funkční vlastnosti receptoru<sup>27</sup>. Schopnost ligandu vyvolat měřitelnou funkční změnu se označuje jako potence. Aktivita receptorů může být buď zvýšena, nebo snížena, v závislosti na typu ligandu, a vazba ligandu je reverzibilní. Vazba agonisty na receptor vyvolá konformační změnu, která je prvním krokem ke vzniku výsledné odpovědi. Protein s navázaným GTP má jinou konformaci a jiné vlastnosti než protein s navázaným GDP. Vazbou GTP se konformace proteinu mění v aktivní, tj. „zapnuto“, vazbou GDP v konformaci inaktivní, tj. „vypnuto“. Přechod konformace proteinu z jeho inaktivní formy na aktivní je doprovázen překonáním určité energetické bariéry. Hydrolyza GTP je ireverzibilní, a tak cyklus probíhá pouze jedním směrem<sup>28</sup>. Přepínání mezi těmito stavy je zprostředkováno proteinem GEF („guanine nucleotide-exchange factor“), který katalyzuje disociaci GDP z G proteinu; k vazbě GTP pak dochází samovolně v důsledku jeho vyšší koncentrace v cytoplasmě. Rychlost hydrolyzy GTP závisí mimo jiné na aktivitě proteinu GAP, „GTPase-accelerating protein“, který může také reagovat na extracelulární signály<sup>29</sup>.

### 3. Receptory spřažené s G proteiny (GPCR)

V dalším výzkumu následovaly studie o G proteinech a jeho receptorech. V lidském genomu bylo nedávno odhaleno více než 800 GPCR receptorů, které odpovídají na široké spektrum chemických entit, od fotonů, protonů a kalciových iontů, malých organických molekul (včetně odorantů a neurotransmiterů) až k peptidům a glykoprotei-  
nům.

GPCR je transmembránový protein tvořený sedmi doménami procházejícími plazmatickou membránou, označovaný také jako 7TM (viz obr. 3). Tyto úseky peptidového řetězce<sup>30</sup>, tzv.  $\alpha$ -helixy (šroubovice) jsou číslovány TM I–VII od N-konce. N-konec receptoru je lokalizován na vnější straně membrány spolu se třemi extrabuněčnými smyčkami, které slouží jako vazebná místa pro ligandy. Na intrabuněčné straně tři smyčky umožňují spolu s karboxylovým C-koncem receptoru vazbu  $\alpha$  podjednotky G proteinu<sup>31</sup>. Přirozené, tzv. ortosterické ligandy, se váží v oblasti mezi sedmi transmembránovými helixy receptorové molekuly s nejvýraznější změnou na pozici TMVI, nebo na peptidu N-konce nebo konečně na receptorové struktuře připojené k N-konci. Na základě podobnosti sekvencí konfigurace helixů TMVII mohou být tyto lidské GPCR receptory rozděleny do 5. rodin, s největším počtem Rhodopsin GPCR (klasifikace GRAFS viz cit.<sup>25</sup>). U části



Obr. 3. Schéma obecné topologie receptoru spřaženého s G proteinem. GPCR je tvořen sedmi transmembránovými doménami (I–VII), které při průchodu membránou tvoří tři extracelulární smyčky ( $e_1$ ,  $e_2$ ,  $e_3$ ) a tři intracelulární smyčky ( $i_1$ ,  $i_2$ ,  $i_3$ ). Heterotrimerické G proteiny jsou tvořeny třemi podjednotkami  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , které jsou vždy spojeny za fyziologických podmínek. Alfa podjednotka na jedné straně a  $\beta\gamma$  na straně druhé jsou kovalentně vázány na lipidy, umožňující jejich spojení s membránou. Na obrázku je demonstrována diverzita ligandů GPCR. Upraveno se svolením J. Bockaerta z publikace *G protein coupled receptors, Encyclopedia of Life Sciences*, 2001 (cit.<sup>34</sup>)

GPCR nejsou doposud známy přirozené endogenní ligandy a jejich fyziologická funkce je neznámá. Tyto receptory jsou označovány jako orphan GPCRs, tzv. sirotčí GPCR. Sirotčí receptory jsou středem zájmu jako slibná skupina cílů pro farmaceutický průmysl (blíže viz revue<sup>32</sup>). Byly identifikovány efekторы pro GPCR, které jsou nezávislé na G proteinech, což zcela mění staré názory na tento způsob přenosu signálu heterotrimerními G proteiny (viz cit.<sup>33</sup>).

Receptory spřažené s G proteiny a i samotné G proteiny hrají důležitou úlohu nejen při zajištění transdukce za fyziologických podmínek jako univerzální chemické senzory, ale také u celé řady poruch a nemocí. Jsou cílem více než poloviny moderních léků. Je proto přirozené, že výzkum úlohy receptorů spřažených s G proteinem pokračoval v řadě laboratoří směrem k dalšímu terapeutickému využití G proteinů<sup>35</sup>.

### 4. Zaměření výzkumu GPCR

#### 4.1. Přínos R. J. Lefkowitz a B. K. Kobilky

Význačných úspěchů ve výzkumu struktury a dynamiky změn GPCR s možností dalšího využití získaných výsledků v biomedicině dosáhli pracovní skupiny amerických vědců Roberta J. Lefkowitz a Briana K. Kobilky. Jejich dlouhodobá práce byla oceněna v r. 2012 Nobelovou cenou za chemii s názvem „A brief history of G-protein coupled receptors“. Přednesli dvě Nobelovy přednášky: R. J. Lefkowitz „A brief history of G-protein coupled receptors“ a B. K. Kobilka „The Structural Basis of G Protein Coupled Receptor Signaling“. Úplný text obou přednášek je zveřejněn na internetu pod heslem Nobel lecture – Nobelova cena za chemii 2012 a je publikován v plném znění (viz<sup>36,37</sup> s bohatým souborem citací). Oba ve svých přednáškách shrnuli, že GPCR mají daleko širší signální repertoár a jsou klíčovými molekulami pro další výzkum nových látek a jejich využití jako léčiv. „Poznatky o GPCR jsou tak největším přínosem pro lidstvo“ (převzato z Informace pro veřejnost o Nobelově ceně za chemii 2012 Královské švédské akademie věd).

#### 4.2. Funkce ligandů a GPCR

V průběhu dlouholetého výzkumu prof. Lefkowitz a prof. Kobilky došlo ke změně náhledu na funkce ligandů a G protein receptorů. Dříve se předpokládalo, že ligand navázaný na GPCR receptor vyvolá jednu definovanou účinnost, kdežto výzkum prokázal, že ligand může mít účinností více. Agonisté mají ve skutečnosti mnohonásobný efekt v závislosti na specifitě G proteinů a na využití konkrétní signální cesty<sup>38</sup>. GPCR mohou aktivovat G protein i v nepřítomnosti agonistů a vyvolat tzv. konstitutivní aktivitu, vysvětlovanou schopností receptoru přecházet mezi jednotlivými stupni konformace od inaktivní až do aktivní konformace (viz přehled<sup>39</sup>). Kromě obsazení míst pro agonisty a antagonisty může každá látka mít mno-

ho dalších účinků, které ovlivní alosterická místa, vazbu na efekторы, místa ovlivňující trafficking receptorů a další funkce. Testování širšího spektra účinností může napomoci zjištění skrytých terapeutických aktivit. Klasická farmakodynamika nepředpokládala takovou rozmanitost a složitost účinku agonistů, dnes označované jako funkční selektivita. Funkční selektivita je v literatuře také označována jako „agonist trafficking“, „biased agonism“, „biased signalling“, „ligand bias“ a „differential engagement“.

Navzdory dobře probádané signalizaci prostřednictvím GPCR zůstával mechanismus působení některých ligandů ovlivňujících tyto receptory nejasný. Přirozené a syntetické ligandy lze rozdělit podle jejich účinnosti na několik skupin, na plně agonisty schopné vyvolat maximální stimulaci receptoru; partiální agonisty, které nejsou schopné vyvolat maximální aktivitu ani v saturačních koncentracích; neutrální antagonisty bez účinku na bazální signální aktivitu, ale svou vazbou k receptoru bránící dalším ligandům navázání na receptor; inverzní agonisty, které snižují hladinu bazální a konstitutivní aktivity receptorů bez navázaného ligandu. Přehledová publikace<sup>11</sup> a z tohoto přehledu citovaná tabulka I uvádí některé definice vazebných míst a ligandů, které je ovlivňují. Význam alosterických míst pro další výzkum terapeuticky využitelných ligandů je uveden v kapitole 5.3.

V minulosti byly popsány rozdíly v afinitě a potenci mezi stereoisomery, např. u adrenergických receptorů (AR), kde (–)-stereoisomery mají vyšší afinitu a aktivují receptory s vyšší potencí než (+)-stereoisomery. Současný výzkum však usiluje o objasnění mechanismu vazby různých typů ligandů na GPCR receptory a objasnění struktury těchto vazebných míst. Určení struktury bylo dlouhou dobu obtížné, neboť nebyly k dispozici metody umožňující

Tabulka I

Receptorová místa obsazovaná agonisty<sup>11</sup>. Přehled vztahu ortosterického a alosterického místa vysvětluje účinek agonisty na receptor

---

<b>Ortosterické místo</b>	– Klasické receptorové místo obsazované endogenním agonistou ( <b>ortosterický agonista</b> ), který stimuluje příslušnou signální cestu a může být inhibován kompetitivně působícími antagonisty obsazujícími stejný receptor jako endogenní ligand.
<b>Alosterické místo</b>	– Vazebné místo, které je odlišné od ortosterického vazebného místa na receptoru. Právě alosterické vazebné místo se nepřekrývá s ortosterickým vazebným místem.
<b>Alosterický agonista</b>	– Agonista stimulující receptor obsazením alosterického místa.
<b>Alosterický modulátor</b>	– Ligand, který vazbou na alosterické místo zvyšuje nebo snižuje účinek ortosterického ligandu (agonisty nebo antagonisty). Látka tohoto typu nemá sama o sobě žádný účinek, ale zvyšuje nebo snižuje afinitu nebo účinnost ortosterického ligandu.
<b>Ago-alosterický modulátor</b>	– Je to alosterický modulátor, který většinou při vyšších koncentracích má sám o sobě také agonistické účinky.

---

získat větší množství stabilního proteinu nutného k jejímu určení. První krystalická struktura nativního GPCR byla určena u rhodopsinu v r. 2000 (cit.<sup>40</sup>).

## 5. Receptorové adaptační mechanismy

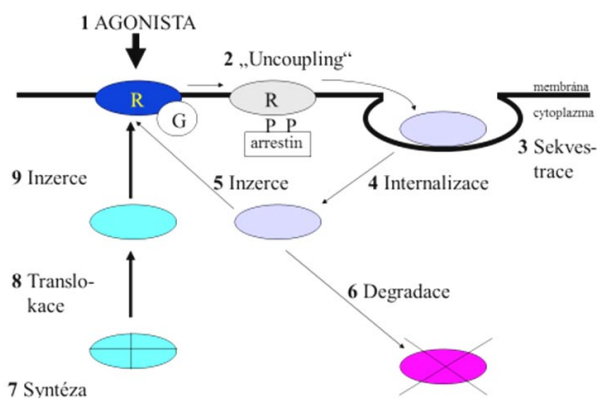
V posledních letech bylo odhaleno mnoho dalších regulačních pochodů týkajících se GPCR, které se souhrnně označují jako receptorové adaptační mechanismy či procesy<sup>41</sup>. Vzhledem k tomu, že jde o změnu citlivosti receptorů k ligandům nebo změnu jejich počtu v membráně, označují se tyto změny jako „trafficking“, tj. přesun, užívá se i výraz doprava receptorů<sup>9</sup> (obr. 3). Uvádíme vysvětlení některých prvotních údajů, především pochodů spojených s desensitizací nebo naopak hypersenzitivitou receptorů. Kobilka s Lefkowitzem věnovali tomuto výzkumu velkou pozornost a jako základ zvolili studium adrenergických receptorů (citace lze najít v Nobelových přednáškách obou autorů).

### 5.1. Desensitizace

Opakované vystavení receptorů agonistům má za následek desensitizaci snížením citlivosti receptoru k následnému působení agonistů, snížením aktivity studovaných receptor-efektorových komplexů a nižší afinitou látek k receptorům<sup>42</sup>. Dochází tak k přerušení spojení aktivovaného receptoru s příslušným G proteinem při kovalentní modifikaci receptoru způsobené fosforylací. Tato tzv. homologní desensitizace receptoru s navázaným specifickým ligandem je spojena s fosforylací proteinkinasami pro GPCR (G protein coupled-receptor kinase, GRK) a vytvořením vazebného místa pro  $\beta$ -arrestin. Proteinkinasy A i C fosforylují také receptory, které nejsou aktivované agonistou, a tato fosforylace nezávislá na agonistovi vede k tzv. heterologní desensitizaci.

### 5.2. Arrestin

Při studiu mechanismu účinku desensitizace u  $\beta$  adrenergního receptoru a jeho fosforylace  $\beta$  adrenergní receptor kinasou byl objeven protein, který zeslabí až zabráni navázání G proteinu na aktivovaný receptor, odtud jeho název  $\beta$ -arrestin<sup>43</sup>; fosforylace působí kovalentní modifikaci receptoru a vede k přerušení aktivovaného receptoru s G proteinem. Beta-arrestin se vyskytuje přirozeně ve fosforylovaném stavu a po aktivaci receptoru agonistou je defosforylován a váže se k receptoru. Beta-arrestin hraje vedle prvotní úlohy výše popsané desensitizace také významnou úlohu při internalizaci receptorů, kdy mohou být receptory spolu s navázanými agonisty přeneseny do nitra buňky. Zde mohou být obě komponenty rozloženy nebo po jejich rozpojení může být receptorová molekula opět umístěna v membráně. Přehled těchto pochodů je uveden na obr. 4. Význačnou funkci má  $\beta$ -arrestin v přenosu signálu v různých typech buněčné signalizace včetně funkce



Obr. 4. Pohyb receptorů po působení agonisty na GPCR receptor<sup>9</sup>. GPCR jsou dynamické systémy a počet a dostupnost receptorů na plasmatické membráně je regulován nejen vlastnostmi receptorů, ale i změnou počtu receptorů, regulací jejich syntézy a degradace (viz přehled<sup>43</sup>)

$\beta$ -arrestinu v jádře, kde dokáže přímo regulovat transkripci genů. Spouštění signálních cest závislých na G proteinu nebo na  $\beta$ -arrestinu se využívá ve výzkumu nových látek s terapeutickými účinky (viz dále).

O úloze fosforylace receptorů  $\beta$ -adrenergí kinasou nebo proteinkinasou A a C při receptorové desensitizaci (homologní nebo heterologní) a účasti  $\beta$ -arrestinu při internalizaci receptorů pojednávají stovky prací a desítky přehledů, v této publikaci jsme se zaměřili především na uvedení dat Lefkowitz a Kobilky.

### 5.3. Vazebná místa na receptoru a funkce ligandů

Strukturální charakteristika receptoru je zásadní pro další výzkum terapeuticky využitelných ligandů. Jak bylo uvedeno výše, klasické endogenní ligandy se váží na receptoru na ortosterické vazební místo, avšak výzkum v poslední době prokázal existenci i dalších vazebných míst označovaných jako alosterická. Navázání ligandů na alosterické vazební místo může mít samostatný efekt nebo může modulovat aktivitu ortosterického receptoru ovlivněného příslušným ligandem (viz přehled<sup>44</sup>). Je možné rozlišovat alosterické agonisty, které ovlivňují aktivitu receptoru bez přítomnosti ortosterického ligandu, a alosterické modulátory, které mění aktivitu receptoru jen v přítomnosti ortosterického ligandu. Objev alosterické modulace GPCR má velký význam jak pro základní výzkum, tak pro syntézu nových terapeuticky použitelných látek, tzv. usměrňovacích, syn. upřednostňujících, „biased“ ligandů, které po navázání na GPCR dokáží spouštět pouze jednu určitou aktivitu receptoru a příslušnou buněčnou signalizaci. Stejná látka může fungovat jako antagonist pro jednu signální cestu zatímco pro druhou signální cestu jako agonista. Biased ligandy selektivně spustí určité signály, přičemž zabrání, nebo dokonce inaktivují další signály

zprostředkované stejným receptorem. To zvyšuje funkční specifitu, což je základem pro terapeutické využití těchto usměrňovacích ligandů<sup>45</sup>. Pro vývoj nových léčiv je využíván především  $\beta$ -arrestin a jeho schopnost regulovat signální dráhy s jeho prvotní funkcí, která spočívá v zeslabení buněčného signálu přenášeného prostřednictvím GPCR<sup>46</sup>. Biofarmaceutická firma Trevena se zabývá objevy a vývojem biased ligandů a ve svých materiálech na webových stránkách <http://www.trevena.com> je uvedena řada informací o klasických účinných agonistů a antagonistů na G protein a beta arrestin, s uvedením signálních specifických účinků biased ligandů, s využitím terapeutického potenciálu a potlačením nežádoucích účinků. Znalost přesné podoby vazby ligandu snižuje nežádoucí účinky léku. Právě díky nežádoucím účinkům je z vývoje vyřazována většina látek se slibnými léčebnými účinky.

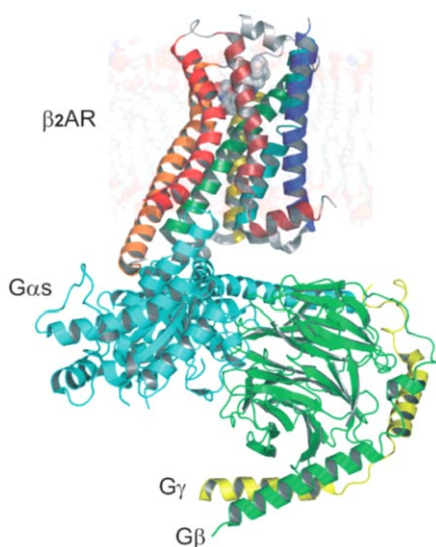
## 6. Nové technologie studia receptorů

S vývojem nových technologií došlo k nárůstu informací o receptorech. Byl to právě Lefkowitz, který zavedl již v 80. letech řadu nových metod, např. vazebné studie s radioligandy, kde studoval  $\beta$ -adrenergí receptor<sup>47</sup> a následně i  $\alpha$ -adrenergí receptor<sup>48</sup>. Popsal receptorové subtypy a zahájil tak novou etapu výzkumu, vedoucí až k následnému objevu regulačních G proteinů. Základním měřítkem účinnosti agonisty stimulovat adenyllycyklastu je jeho schopnost řídit interakci GPCR k vytvoření tříčlenného komplexu. Tyto nálezy byly prvním přímým důkazem alosterických interakcí receptoru s agonisty a efektor G proteiny. Přispěli tak k objasnění konformačních změn vyvolaných agonisty. Beta adrenergí receptory ( $\beta$  AR) byly ideálním modelem díky rozsáhlým informacím o struktuře získaným pokusy s jejich mutací a díky bohaté dostupnosti komerčních ligandů pro tento receptor.

### 6.1. Izolace a purifikace GPCR

Velmi důležitou aplikací vazebných technik s různými typy ligandů byla izolace a purifikace  $\beta$  AR a potvrzení funkčnosti jednotlivých komponent po jejich fúzi, se zachovalou schopností stimulovat adenyllycyklastu a syntézu cAMP. Klíčem tohoto úspěchu byl vývoj nových nosičů u afinitní chromatografie využívajících specifické interakce pro izolaci vysoce purifikovaných jednotlivých AR<sup>49</sup>. Lefkowitz se spolupracovníky identifikoval a izoloval 9 AR a prokázal sedmi-transmembránové uspořádání receptorové molekuly. Spolu s Kobilkou určili vzájemnou souvislost mezi dvěma základními funkcemi vazby ligandu a aktivací G proteinu a sedmi-transmembránovým uspořádáním receptorové molekuly. Na obr. 5 je příklad struktury nejlépe prostudovaného G protein spáženého receptoru,  $\beta_2$ AR.

Následovalo období klonování GPCR v řadě mnoha laboratoří, B. Kobilka však byl první, kdo klonoval v GPCR sekvence vazebný ligand, místa pro fosforylaci lokalizovaná na cytoplazmatických doménách a sekvence



Obr. 5. **Struktura  $\beta_2$  adrenergního receptoru ( $\beta_2$ AR)** navázaného na alfa podjednotku G proteinu ( $G\alpha_s$ ), určená metodou krystalografie. Převzato z databáze Protein Data Bank PDB3SN6 (informace o databázi jsou uvedeny níže<sup>58</sup>)

pro glykosylaci na amino konci. Pomocí dalších technik, řízené mutagenézy a syntézy chimér potvrdil, že extracelulární smyčky receptoru jsou zodpovědné za specifitu vazby ligandu, zatímco část receptoru v cytoplazmě je zodpovědná za určení specifity spřažení G proteinu. Protokol exprese a purifikace dostatečného množství  $\beta$  AR pro biofyzikální studie publikoval Kobilka již v r. 1995 (cit.<sup>50</sup>).

## 6.2. Konformační změny GPCR

Z dalších metod k určení charakterizace  $\beta$  AR byla spektroskopie v kombinaci s biochemickými metodami, pomocí kterých monitorovali změny po vazbě a aktivaci agonistů v různých stádiích konformačních změn. Demonstrovali, že GPCR funguje jako „rheostat“, sloužící ke kontinuitě konformací s relativně úzce rozloženou energií. Tyto biofyzikální metody prokázaly, že chemická interakce mezi ligandem a receptorem stabilizuje ligand specifickou konformaci nebo vede k souboru konformací, které působí na specifickou signalizaci a regulační proteiny<sup>51</sup>. Díky práci obou vědců mohou autoři léků vytvářet sloučeniny, které se dokáží na tyto receptory přesně navázat a ovlivnit činnost buněk.

V roce 2005 rozpracoval Kobilka se spolupracovníky z různých pracovišť (University of Stanford, Michigan, Wisconsin, Free University of Brussels, Trinity College Dublin a další) výzkum strukturních změn vyvolaných interakcí mezi  $\beta_2$  AR a jeho G proteinem (Gs podjednotkou). V roce 2011 uveřejnil B. Kobilka se spolupracovníky v časopise Nature snímky, které ukazují, jak receptor přijímá signál od molekuly adrenalinu zvenčí buňky

a předává ho bílkovině uvnitř buňky<sup>52–54</sup>. Podle Nobelovy komise byla tato studie vyvrcholením dlouholeté práce, která zcela změnila náš pohled na komunikaci mezi buňkami, kde právě správná podoba molekuly je zásadní. V těchto publikacích jsou uvedeny studie struktur GPCR určených převážně metodami rentgenové strukturní analýzy a paralelní studie biologické a biochemické charakterizace.

## 6.3. Krystalografie a další fyzikální metody

Po určení struktury  $\beta_2$  AR následovaly rozsáhlé studie dalších receptorů spřažených s G proteinem a studie určující, jak jsou receptorové signalizační komplexy v buňce kompartmentalizovány, a jak vyvolávají lokální účinky. Samostatnou kapitolou pro určení struktury je krystalizace sledovaného proteinu. Hlavním problémem při krystalizaci GPCR je strukturální flexibilita a nestabilita receptorů po zpracování preparátů, působením detergentu a extrakci z lipidových membrán. Klíčová pro úspěšnou krystalizaci je purifikace a homogenita vzorku proteinu. Současné studie v této oblasti jsou tak rozsáhlé, že nelze zařadit dostupné údaje do jednoho všeobjímajícího přehledu a podrobnější údaje nejsou součástí této publikace, v které uvádíme pouze přehled metod zabývajících se studiem struktur.

V současnosti se struktura receptoru nejčastěji stanovuje rentgenovou strukturní analýzou, syn. rentgenovou krystalografií (X-ray crystallography), dále nukleární magnetickou rezonancí (NMR) a kryoelektronovou mikroskopií (cryo-EM). Při krystalografii jsou rentgenové paprsky rozptylovány na elektronech atomů a tvoří difrakční obrazec a mapu elektronové hustoty, především u krystalů rigidních proteinů. Umožňuje určit strukturu molekul resp. atomů v krystalové mřížce (bližší přehled<sup>55</sup>). Nukleární magnetickou rezonancí lze určit atomová jádra, jejich konformaci u menších molekul a vzdálenosti mezi blízkými atomy. Měří strukturu i v roztoku, a proto je vhodná i pro analýzu flexibilních proteinů. Cryo-EM studuje vzorky při kryogenních teplotách ve zmrazeném a hydratovaném stavu ve formě tenkého filmu na mřížce a poskytuje obraz celkového vzhledu molekuly. Přehledový článek<sup>56</sup> popisuje řadu struktur GPCR získaných krystalografií a dalšími metodami, včetně řady obrázků. Výsledky strukturních analýz se v současnosti standardně ukládají do souboru „Crystallographic Information File“, bližší údaje jsou uvedeny na internetu<sup>57</sup>. Proteinová krystalografie se uplatňuje při hledání nových léčiv a určení racionálního designu léčiv. Pokud nebyla výše popsanými postupy určena prostorová struktura dané látky a nelze ji dohledat na internetu ve volně dostupných databázích (viz níže), je možné ji vypočítat postupem zvaným modelování.

## 6.4. Modelování prostorové struktury GPCR

Modelování spočívá v odhadu neznámé cílové struktury na základě vzorové struktury. Porovnává se sekvencí homologie aminokyselin; a čím je vyšší sekvencí identita,

tím přesnější je model. Vzorové struktury lze najít v databázi struktur velkého množství látek, nejčastěji je používána volně dostupná databáze s pravidelnou aktualizací Protein Data Bank (PDB)<sup>58</sup>. Do PDB vkládají data pracovníci nejen z oblasti krystalové rentgenové analýzy, ale i kryoelektronové mikroskopie, nukleární magnetické rezonance, teoretického modelování aj.

Do současnosti bylo vytvořeno také velké množství strukturních databází derivátů ligandů ve 3D reprezentaci připravených pro další virtuální zpracování metodou doking<sup>59</sup>. Ta spočívá v hledání takového uspořádání analogu ligandu se vzorovou strukturou, které vykazuje nejvhodnější orientaci obou molekul pro jejich vzájemnou interakci. Cílem je nalezení správné polohy ligandu uvnitř receptoru, vybrání vhodných a nevhodných ligandů z databáze, tj. optimalizace molekul ligandu pro větší selektivitu a afinitu k receptoru.

#### 6.5. Hledání optimálních kandidátů na léčiva

K hledání optimálních kandidátů na nová léčiva slouží finančně nenáročná počítačová modelová studie 3D struktur. Využívají metody molekulárního dokingu a virtuálního screeningu, které vytvářejí rozsáhlé objemy dat. Hlavním cílem dokování je určit v databázi látek ty molekuly, které spolu mohou interagovat, a umožňují tak přípravu dat pro výpočet a interpretaci vypočtených dat. Virtuální screening využívá počítačové programy k předpovědi vazebných afinit ligandů k cílovému receptoru<sup>60</sup> a je alternativou tzv. vysoko-průtočného screeningu (high throughput screening)<sup>61</sup> využívajícího experimentální chemické a biologické metody. Na internetu je možné dohledat velké množství databází nízko-molekulárních látek navržených na potenciální léčiva. Základem je především vyloučení struktur, u nichž existuje pouze mizivá pravděpodobnost interakce s příslušným receptorem, tj. filtrování těchto dat pomocí virtuálního screeningu. Popsaným způsobem lze významně snížit počet syntetizovaných látek navrhovaných jako nová potenciální léčiva.

Velmi perspektivními metodami při výzkumu nových léčiv jsou metody molekulového modelování tzv. Computer Aided Drug Design (CADD) nebo častěji používaný výraz 3D-QSAR (quantitative structure-activity relationship)<sup>62</sup>, tj. vytvoření prostorového (3D) modelu cílového receptoru na úrovni atomů a funkčních skupin. Používají se rutinně ve vývoji nových analogů ligandů a hledání optimálních kandidátů na léčiva, kde virtuální screening umožňuje výběr nejvhodnějších kandidátů pro další screening s menším množstvím ligandů a další screening pro ještě nižší počet atd. až k jednomu ligandu. Nová léčiva vznikají pomocí tzv. „in silico drug designu“, což znamená návrh léčiv pomocí počítačových programů metodami popsanými výše. Pro modelování je k dispozici řada počítačových programů, což je však mimo dosah tohoto přehledu.

## 7. Závěr

Závěrem lze shrnout, že nové poznatky o regulaci signalizace G proteiny a s nimi spřaženými receptory, tzv. „G protein coupled receptors“, umožnily syntézu nových agonistů a antagonistů GPCR, z nichž řada má terapeutické využití. G receptory tak představují největší skupinu cílových míst v současné době terapeuticky používaných látek. Podrobná analýza struktury GPCR umožnila autorům léčiv<sup>59</sup> vytvářet látky s vyšší specificitou účinku a se sníženými nežádoucími účinky.

*Práce byla realizována za podpory Grantové agentury Univerzity Karlovy PRVOUK/25/LF1/2 a SVV 260257.*

## LITERATURA

- Hynie S.: *Membrane Receptors and Transmembrane Signalling. Academia - Rozpravy ČSAV, řada MPV, roč. 100, seš. 6/1990.* AV ČR, Praha 1990.
- Kittnar O. a kolektiv (ed.): *Lékařská fyziologie.* Grada Publishing, Praha 2011.
- Murray R. K., Bender D. A., Botham K. M., Kennelly P. J. a spol. (ed.): *Harperova ilustrovaná biochemie 5.* Čes. Vyd. Galén, Praha 2013.
- Lodish H., Berk A., Zipursky S. L., a spol. (ed.): *Molecular Cell Biology.* 4. vyd. W. H. Freeman and Company, New York 2000.
- Kandel E. R., Schwartz J. H., Jessell T. M. (ed.): *Principles of neural science.* 4. vyd. McGraw-Hill, New York 2000.
- Brunton L. L., Chabner B., Knollmann B. C. (ed.): *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics,* 12. vyd. McGraw-Hill, New York 2011.
- Hynie S.: *Farmakologie v kostce.* TRITON, Praha 2010.
- Hynie S.: *Čas. Lék. Česk.* 128, 225 (1989).
- Hynie S., Klenerová V.: *Psychiatrie* 3, 15 (2002).
- Klenerová V., Hynie S.: *Čs. Fyziol.* 50, 93 (2001).
- Klenerová V., Hynie S.: *Čs. Fyziol.* 57, 76 (2008).
- Hynie S., Klenerová V., Štípek S.: *Čs. Fyziol* 54, 11 (2005).
- McNeely P. M., Naranjo A. N., Robinson A. S.: *Biotechnology J.* 7, 1451 (2012).
- Sutherland E. W.: *J. Am. Med. Assoc.* 14, 1281 (1970).
- Robison G. A., Butcher R. W., Sutherland E. W.: *Cyclic AMP.* Academic Press, New York 1971.
- Greengard P.: *Mol. Neurobiol.* Spring-Summer 1, 81 (1987).
- Gilman A. G., Nirenberg M.: *Nature* 234, 356 (1971).
- Rodbell M., Birnbaumer L., Pohl S. L., Krans H. M. J.: *J. Biol. Chem.* 246, 1877 (1971).
- Gilman A. G.: *Cell* 36, 577 (1984).
- Rodbell, M.: *Nature* 284, 17 (1980).
- Sharp G. W., Hynie S.: *Nature* 229, 266 (1971).
- Sharp G. W., Hynie S., Ebel H., Parkinson D. K.,



- Witkum P.: *Biochim. Biophys. Acta* 309, 339 (1973).
24. Rall T. W.: Formation and Degradation of Cyclic Nucleotides: An Overview v knize: *10. Cyclic Nucleotides, Part I: Biochemistry* (Nathanson J. A. and Keabian J.W. ed.), str. 3–16. Springer-Verlag, Berlin 1982.
  25. Rojas A. M., Fuentes G., Rausell A., Valencia A.: *J. Cell Biol.* 196, 189 (2012).
  26. Fredriksson R., Lagerström M. C., Lundin L. G., Schiöth H. B.: *Mol. Pharmacol.* 63, 1256 (2003).
  27. Neubig R. R., Siderovski D. P.: *Nat. Rev. Drug Discov.* 1, 187 (2002).
  28. Vilardaga J. P.: *Methods Mol. Biol.* 756, 133 (2011).
  29. Etienne-Manneville S., Hall A.: *Nature* 420, 629 (2002).
  30. Bos J. L., Rehmann H., Wittinghofer A.: *Cell* 129, 865 (2007).
  31. Pierce K. L., Premont R. T., Lefkowitz, R. J.: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 639 (2002).
  32. Moreira I. S.: *Biochim. Biophys. Acta* 1840, 16 (2014).
  33. Tang X. L., Wang Y., Li D. L., Luo J., Ming-yao Liu M. Y.: *Acta Pharmacol. Sinica* 33, 363 (2012).
  34. Marinissen M. J., Gutkind J. S.: *TIPS* 22, 368 (2001).
  35. Bockaert J.: *G Protein-coupled Receptors. Encyclopedia of Life Sciences 2001*. Nature Publishing Group, Montpellier 2001.
  36. Insel P. A., Tang C. M., Hahntow I., Michel M. C.: *Biochim. Biophys. Acta* 1768, 994 (2007).
  37. Lefkowitz R. J.: *Angew. Chem.* 52, 6366 (2013).
  38. Kobilka B.: *Angew. Chem.* 52, 6380 (2013).
  39. Urban J. D., Clarke W. P., von Zastrow M., Nichols D. E., Kobilka B., Weinstein H., Javitch J. A., Roth B. L., Christopoulos A., Sexton P. M., Miller K. J., Spedding M., Mailman R. B.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 320, 1 (2007).
  40. Gether U., Kobilka B. K.: *J. Biol. Chem.* 273, 17979 (1998).
  41. Palczewski K., Kumasaka T., Hori T., Behnke C. A., Motoshima H., Fox B. A., Le Trong I., Teller D. C., Okada T., Stenkamp R. E., Yamamoto M., Miyano M.: *Science* 289, 739 (2000).
  42. Bahiraei F., Shieh B. H.: *Receptor Adaptation Mechanisms. Encyclopedia of Life Sciences 2001*. Nature Publishing Group, Montpellier 2001.
  43. Simmons M. A.: *Mol. Interv.* 5, 154 (2005).
  44. Lefkowitz R. J., Shenoy S. K.: *Science* 308, 512 (2005).
  45. Christopoulos A.: *Nat. Rev. Drug Discov.* 1, 198 (2002).
  46. Shukla A. K., Singh G., Ghosh E.: *Trends Biochem. Sci.* 39, 594 (2014).
  47. Violin J. D., Lefkowitz R. J.: *Trends Pharmacol. Sci.* 28, 416 (2007).
  48. Mukherjee C., Caron M. G., Coverstone M., Lefkowitz R. J.: *J. Biol. Chem.* 250, (1975).
  49. Williams L. T., Lefkowitz R. J.: *Science* 192, 791 (1976).
  50. Lefkowitz R. J.: *Biochem. Biophys. Acta* 1768, 748 (2007).
  51. Kobilka B. K.: *Anal. Biochem.* 231, 269 (1995).
  52. Kobilka B. K., Deupi X.: *Trends Pharmacol. Sci.* 28, 397 (2007).
  53. Gellman H., Pautsch A., Steyaert J., Weis W. I., Kobilka B. K.: *Nature* 469, 175 (2011).
  53. Rasmussen S. G., DeVree B. T., Zou Y., Kruse A. C., Chung K. Y., Kobilka T. S., Thian F. S., Chae P. S., Pardon E., Calinski D., Mathiesen J. M., Shah S. T., Lyons J. A., Caffrey M., Gellman S. H., Steyaert J., Skiniotis G., Weis W. I., Sunahara R. K., Kobilka B. K.: *Nature* 477, 549 (2011).
  54. Rosenbaum, D. M., Zhang C., Lyons J. A., Holl R., Aragao D., Arlow D. H., Rasmussen S. G., Choi H. J., Devree B. T., Sunahara R. K., Chae P. S., Gellman S. H., Dror R. O., Shaw D. E., Weis W. I., Caffrey M., Gmeiner P., Kobilka B. K.: *Nature* 469, 236 (2011).
  55. Kratochvíl B., Hušák M., Brynda J., Sedláček J.: *Chem. Listy* 102, 889 (2008).
  56. Van der Kant R., Vriend G.: *Int. J. Mol. Sci.* 15, 7841 (2014).
  57. <http://bioportal.weizmann.ac.il/>, staženo 16. 9. 2016.
  58. Protein Data Bank (PDB), [http:// www. rcsb.org/pdb](http://www.rcsb.org/pdb), staženo 16. 9. 2016.
  59. Tickle I., Sharff A., Vinković M., Yon J., Jhoti H.: *Chem. Soc. Rev.* 33, 558 (2004).

**V. Klenerová and S. Hynie** (*Department of Chemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague*): **New Views on Effects of G Protein-Coupled Receptor, Importance in the Search for New Drugs**

This review focuses on the research and new discoveries of signaling processes and on the importance of a remarkable system of G protein-coupled receptors (GPCR). GPCRs are the largest and the most diverse family of receptors involved in many physiological processes and represent attractive targets for pharmacological intervention to modify these processes in normal and pathological states. The new knowledge of the regulation of GPCR signaling enabled the synthesis of novel ligands with therapeutic use. Recipients of the 2012 Nobel Prize in chemistry, R. Lefkowitz and B. Kobilka, played a key role in the study of GPCR, arrestins, G-protein-coupled receptor kinases, and ligands functions, as a universal mechanism of receptor action and a molecular understanding of overall GPCR signaling. Their crystallographic studies of ligand-activated GPCRs allowed them to acquire the three-dimensional structures for a number of pharmacologically important receptors. Detailed analysis of the structure of GPCRs allowed the authors to create drug compounds with greater specificity of action and with reduced side effects, the drugs with therapeutic effects.