

## PROTEASAMI AKTIVOVANÉ RECEPTORY: AKTIVACE, INHIBICE A FARMACEUTICKÝ VÝZNAM

ZUZANA JINDROVÁ<sup>a,b</sup>, ZDEŇKA HANUSOVÁ<sup>a</sup>  
a KAREL HOLADA<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Ústav imunologie a mikrobiologie, 1. lékařská fakulta,  
Univerzita Karlova v Praze, Studničkova 7, 128 00 Pra-  
ha 2, <sup>b</sup> 3. lékařská fakulta, Univerzita Karlova v Praze,  
Ruská 87, 100 00 Praha 10  
karel.holada@lf1.cuni.cz

Došlo 18.9.11, přijato 7.11.14.

Klíčová slova: proteasami aktivované receptory, PAR,  
signalizace, peptidy, inhibitory, trombin, trypsin, terapie

### Obsah

1. Úvod
2. Aktivace receptorů
3. Ukončení signalizace
4. Aktivace netypickými proteasami
5. Aktivace syntetickými peptidy
6. Inhibitory
7. Terapeutické využití inhibitorů
8. Závěr

### 1. Úvod

Proteasami aktivované receptory (PAR receptory) jsou transmembránové proteiny, které se funkčně řadí mezi tzv. GPCR proteiny („G protein-coupled receptors“, receptory spřažené s trimetrickými G-proteiny). Stejně jako ostatní GPCR proteiny procházejí 7× cytoplasmatickou membránou. Rodina PAR receptorů v současnosti zahrnuje čtyři zástupce, PAR1, PAR2, PAR3 a PAR4. Jako první byl v roce 1991 objeven receptor aktivovaný trombinem, tzv. trombinový receptor, PAR1 (cit.<sup>1</sup>). Nedlouho poté byl objeven podobný receptor, který získal označení PAR2. Ten je však aktivován trypsinem nebo tryptasou, nikoliv trombinem<sup>2</sup>. Následoval objev receptoru PAR3, který je stejně jako PAR1 aktivován trombinem<sup>3</sup>. Zatím posledním popsáním členem rodiny PAR receptorů je PAR4. Jedná se opět o receptor pro trombin, avšak k jeho aktivaci je nutná výrazně vyšší koncentrace trombinu než u receptorů PAR1 a PAR3 (cit.<sup>4</sup>). Gen pro PAR4 je lokalizován na chromosomu 19 (19p12)<sup>5</sup>. Geny pro receptory PAR1-3 jsou umístěny na chromosomu 5 (5q13) asi 100 kb od sebe, což spolu s podobnou strukturou těchto proteinů naznačuje, že jednotlivé geny pravděpodobně

vznikly genovou duplikací<sup>6,7</sup>. Aminokyselinová sekvence receptoru PAR4 je z 33 % homologní se sekvencí PAR1, 2 a 3 receptorů, N- i C-konec sekvence PAR4 receptoru je však zcela odlišný<sup>5</sup>. Pro studium fyziologické úlohy PAR receptorů jsou široce využívány myší modely s vyřazenými geny pro jednotlivé receptory (tzv. knockout myši). Zatímco kmen myši postrádající ve svých tkáních receptor PAR1 vykazuje zhruba 50% embryonální letalitu, myši deficientní pro proteiny PAR2, 3, nebo 4 se vyvíjejí bez závažných problémů. To ukazuje na možnou zástupnost jednotlivých typů receptorů a jejich funkcí<sup>8,9</sup>. Vyřazení genů pro PAR1 a 2 dohromady vedlo u myši k významnému snížení viability embryí, jichž přežilo pouze asi 5 %. Další experimenty ukázaly, že tento kombinovaný PAR1/2 deficit způsobuje defekty neurální trubice při jejím uzavírání<sup>10</sup>.

Naše práce stručně shrnuje současné poznatky o receptorech aktivovaných proteasami, jejich účasti v patogenezi různých onemocnění a možném terapeutickém využití jejich specifických inhibitorů.

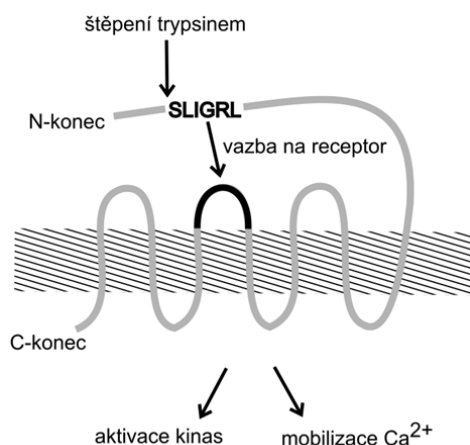
### 2. Aktivace receptorů

Klasické GPCR receptory jsou aktivovány navázáním ligandu na vazebné místo receptoru. Vazba ligandu vede k přenosu signálu do nitra buňky a aktivaci signální kaskády s širokým spektrem důsledků<sup>11</sup>.

Proteasami aktivované receptory jsou aktivovány unikátním způsobem, a to štěpením jejich extracelulární N-terminální části řetězce různými peptidasami (viz obr. 1). Trombin štěpí receptor PAR1 mezi aminokyselinami Arg 41 a Ser 42 v sekvenci LDPR / SFLLRNPND-KYEPF. Štěpením vzniká nový N-terminální konec receptoru, který je jinak nedostupný a slouží jako ligand<sup>1</sup>. Veškerá informace nutná pro aktivaci receptoru je tedy poskytnuta jeho štěpením<sup>12</sup>; samotný proces proteolytického štěpení však není pro aktivaci nezbytný. Důležitá je přítomnost ligandu, který štěpením vzniká. Proto také syntetické peptidy, jejichž sekvence odpovídá sekvenci ligandu vzniklého štěpením trombinem, aktivují tento receptor<sup>1</sup>.

Extracelulární N-terminální doména PAR1 a 3 receptoru obsahuje kromě aminokyselinové sekvence určující místo štěpení i sekvenci, která se nápadně podobá C-konci antikoagulantu hirudin. Tato C-koncová doména hirudin se váže na „exosite“ trombinu (mimo aktivní centrum zodpovědné za štěpení). „Exosite“ trombinu dokáže interagovat i s hirudinovou doménou PAR1 receptoru, čímž se zřejmě zvyšuje pravděpodobnost setkání trombinu s receptorem<sup>13</sup>. Receptor PAR4 je aktivován trombinem pouze při jeho vysokých koncentracích, což je zřejmě dáno tím, že PAR4 nemá hirudinovou doménu, která by akumulovala peptidasu<sup>5</sup>.

Po aktivaci PAR receptorů dochází k aktivaci různých



Obr. 1. Aktivace myšího PAR2 receptoru

$\alpha$ -podjednotek trimerických G-proteinů (např.  $G_i$ ,  $G_q$  a  $G_{12/13}$ ), následkem čehož dochází např. k inhibici adenylylcyklasy nebo mobilizaci  $Ca^{2+}$  iontů. Vápenaté ionty dále aktivují některé proteinkinasy, např. MAP kinasy (mitogenem aktivované proteinkinasy). Signalizace prostřednictvím PAR receptorů může také indukovat zvýšení aktivity fosfolipasy A2, která je zodpovědná za uvolnění kyseliny arachidonové a následnou tvorbu prostaglandinů<sup>8</sup>.

Aktivace PAR receptorů má vliv na celou řadu buněčných typů. Nejprozkoumanější je vliv PAR receptorů na krevní destičky, endotelové buňky a buňky hladkého svalstva. PAR receptory však hrají důležitou roli i v imunitních a nervových buňkách. Celkově tak přispíva-

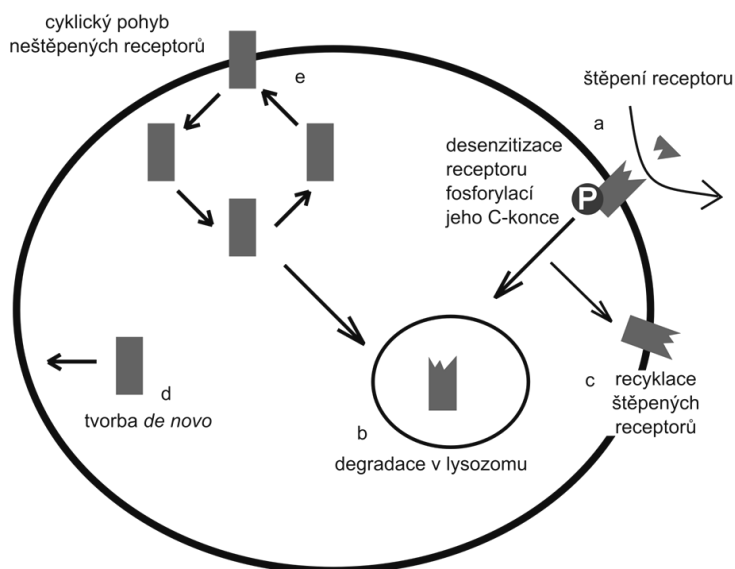
jí ke koordinované odpovědi např. na poškození cévy, kdy dochází k agregaci destiček, chemoatrakci leukocytů, případně regeneraci nervů nebo imunitní odpovědi<sup>14</sup>.

Trombin dokáže aktivaci PAR1 spustit také signální kaskádu vedoucí k programované buněčné smrti, apoptóze. U motorických neuronů byla aktivaci PAR1 aktivována kaspasa 3, proteasa zodpovědná za štěpení proteinů v exekuční fázi apoptózy<sup>15</sup>. K apoptóze dochází zřejmě v případě, kdy je dráha spuštěná PAR1 receptorem nadměrně a dlouhodobě stimulována<sup>16</sup>.

### 3. Ukončení signalizace

Signalizace aktivovanými GPCR receptory je typicky ukončena fosforylací jejich C-terminální domény a následnou endocytózou receptoru. Po určité době může dojít k návratu receptorů zpět na membránu a buňka tak opět získává citlivost vůči ligandu (resenzitizace)<sup>11</sup>. Tento scénář však platí pouze pro reverzibilně aktivované receptory. Vzhledem k tomu, že PAR receptory jsou nevratně aktivovány štěpením, musí existovat jiný mechanismus ukončení jejich signalizace a následné resenzitizace.

Stejně jako u ostatních GPCR receptorů, je i pro ukončení signalizace PAR receptoru důležitá fosforylace jeho C-terminální konce, která zřejmě slouží jako značka toho, že receptor už byl aktivován<sup>17</sup> (obr. 2a). Za fosforylaci C-terminální domény jsou zodpovědné především GPCR-kinasy. Různé GPCR-kinasy fosforylují PAR receptory různě efektivně, což může hrát úlohu např. v regulaci citlivosti PAR receptorů vůči agonistům<sup>18</sup>. Mutace v C-terminální doméně navíc mohou změnit nasměrování receptoru místo do lysozomu zpátky na membránu buňky nebo naopak<sup>19</sup>.



Obr. 2. Osud PAR receptorů v buňce

Krátce po aktivaci (během 30 min) jsou aktivované PAR1 receptory přemístěny z membrány do nitra buňky. Většina receptorů míří do lysozomů, kde jsou degradovány (obr. 2b). Část receptorů (asi 25 %) se však vrací na povrch buňky, a dochází tak k recyklaci části dříve aktivovaných receptorů (obr. 2c)<sup>20,21</sup>. Recyklované receptory s odštěpeným N-terminálním koncem nedokážou znovu reagovat na přítomnost trombinu. Mohou ale reagovat na přítomnost syntetického ligandu odpovídající aminokyselinové sekvence. Pohlčené PAR receptory tedy nejsou vždy desenzitizované<sup>22</sup>. Znovuosídlení membrány neštěpeným PAR receptorem závisí na aktivitě proteosyntézy. Buňky jsou schopné reagovat na přítomnost syntetického peptidu již 30 min po aktivaci trombinem, zatímco schopnost opět plně reagovat na přítomnost trombinu získávají až po 24 h (cit.<sup>23</sup>). Byla-li proteosyntéza zastavena, byl zastaven i návrat receptorů na membránu. To naznačuje, že nové neštěpené receptory jsou tvořeny převážně syntézou *de novo* (obr. 2d)<sup>21</sup>.

Zajímavé je, že k recyklaci receptorů dochází i bez jejich stimulace trombinem (obr. 2e). Neaktivované receptory jsou neustále pohlcovány a opět vystavovány na povrchu membrány. Tímto cyklickým přemísťováním receptorů je zajištěno, že se v cytoplasmě vyskytuje určitá zásoba neštěpených receptorů. Receptory byly pozorovány uvnitř vezikulárního systému (pravděpodobně Golgiho komplexu) poblíž jádra. Tyto cytoplasmatické zásoby receptorů mohou v případě potřeby zajistit okamžitý přesun neštěpených receptorů na membránu<sup>21</sup>. Konstitutivní pohlcování neaktivních receptorů a pohlcování aktivovaných receptorů je zřejmě řízeno odlišnými molekulárními mechanismy, protože byly vytvořeny mutantní formy PAR1, u nichž bylo vyraženo pouze pohlcování neaktivních receptorů<sup>24</sup>.

Regulace exprese trombinového receptoru se u různých typů buněk liší. Endotelové buňky musí být schopné reagovat na přítomnost trombinu opakovaně, a proto dochází k jejich resenzitizaci<sup>25</sup>. Krevní destičky, které mají jen omezenou schopnost proteosyntézy, jsou naopak aktivovány trombinem pouze jednou (následně pomáhají tvořit krevní sraženinu), a tak štěpený receptor není nahrazován<sup>26</sup>.

#### 4. Aktivace netypickými proteasami

Receptory PAR mohou být štěpeny nejen trombinem a trypsinem, ale i dalšími serinovými i nesterinovými proteasami. Některé proteasy štěpí receptor ve stejném místě sekvence jako trombin a trypsin, lze je proto označit za specifické proteasy. Nеспецифické proteasy naopak štěpí receptor v jiném místě; vzniká tak ligand s odlišnou sekvencí, což má za následek změnu buněčné signalizace. Některé proteasy navíc štěpí receptor tak, že již není schopen aktivace ani přenosu signálu<sup>9</sup>.

Receptor PAR1 je kromě trombinu specificky aktivován např. granzymem A (cit.<sup>27</sup>) nebo faktorem Xa v komplexu s tkáňovým faktorem a faktorem VIIa

(proteiny koagulační kaskády)<sup>28</sup>. Receptor PAR2 je specificky aktivován nejen trypsinem, ale i tryptasou<sup>29,30</sup>.

Příkladem nespecifické aktivace PAR receptorů je štěpení neutrofilovou elastasou a proteinasou 3, které štěpí PAR1 na netypickém místě (jiném než trombin). Takové štěpení receptoru vedlo k aktivaci ERK kinasy (extracelulárně regulovaná kinasa), oproti specifické aktivaci však nedošlo ke zvýšení intracelulární koncentrace Ca<sup>2+</sup> (cit.<sup>31</sup>). Zatímco při aktivaci trypsinem fosforyluje ERK kinasa aktivovaná PAR2 receptorem substráty mimo jádro, neutrofilová elastasa aktivuje skrze PAR2 receptory také ERK kinasu, která ale dále způsobuje změnu transkripce v jádře<sup>32</sup>. Matrixová metaloproteasa 1 dokáže štěpit PAR1 receptor nejen ve stejném místě jako trombin<sup>33</sup>, ale i na netypickém místě za vzniku delšího ligandu s jinými aktivačními schopnostmi<sup>34</sup>. Další proteasa, aktivovaný protein C (APC), štěpí N-konec PAR1 receptoru na dvou místech, Arg41 a Arg46. Signalizace štěpením APC na Arg46 měla pro endotelové buňky cytoprotektivní účinek, zatímco štěpení trypsinem na místě Arg41 mělo na endotel prozánětlivé a disruptivní účinky<sup>35</sup>. Katepsin G je příkladem proteasy, která inaktivuje PAR1 receptor odštěpením ligandové sekvence, a znemožňuje tak jeho následnou aktivaci trombinem<sup>36</sup>.

#### 5. Aktivace syntetickými peptidy

Vzhledem k tomu, že PAR receptory jsou aktivované odhalenou částí svého N-konce, je možné syntetizovat peptid se sekvencí, která odpovídá N-koncové doméně po štěpení peptidasou. Takový peptid dokáže aktivovat receptor bez nutnosti vlastního štěpení receptoru. Aktivační peptidy slouží jako důležitý nástroj pro zkoumání funkce a vlastností PAR receptorů.

První funkční aktivační peptid byl syntetizován krátce po objevu samotného trombinového receptoru. Tento peptid byl 14 aminokyselin dlouhý (SFLLRNPNDKYEPEF)<sup>1</sup> a způsoboval agregaci krevních destiček (EC<sub>50</sub> = 7 μM)<sup>37</sup>. Pro nalezení co nejučinnějšího peptidu byly testovány peptidy s kratší nebo obměněnou aminokyselinovou sekvencí.

Až 5× účinnější peptid vznikl zkrácením původní sekvence na šest aminokyselin (SFLLRN). Peptid SFLLRNP pak např. posloužil při vývoji metody pro studium aktivace krevních destiček novorozenců v krvi<sup>38</sup>. Záměna fenylyalaninu za alanin způsobila, že peptid SALLRN nedokázal receptor aktivovat. Velmi důležitá je i aminoskupina koncového serinu, bez které je peptid také nefunkční<sup>39</sup>. Cílenou mutagenézou peptidu bylo zjištěno, že zásadní aminokyseliny pro aktivitu peptidu jsou na pozicích 2, 4 a 5 (fenylalanin, leucin, arginin). Stejně aminokyseliny jsou ve stejných pozicích přítomny i u myších a křeččích aktivačních peptidů. Peptid odvozený od myšího nebo křeččího trombinového receptoru měl proto také podobnou účinnost jako lidský peptid<sup>37</sup>. Vliv má i isomerie aminokyselin, funkční jsou pouze peptidy tvořené L-aminokyselinami<sup>40</sup>.

Aktivační peptid pro PAR2 receptor má jinou aminokyselinovou sekvenci (SLIGRL) než ten pro trombinový receptor. Peptid má o několik řádů nižší účinnost v aktivaci receptoru než trypsin ( $EC_{50} = 5 \mu\text{M}$ , resp. 1 nM), a to zřejmě proto, že jedna molekula peptidasy dokáže aktivovat více molekul PAR receptorů<sup>2</sup>. V aminokyselinové sekvenci aktivačního peptidu PAR2 je zásadní 1. a 5. pozice. Druhá pozice v sekvenci aktivačního peptidu PAR2 není na rozdíl od PAR1 tak důležitá. Přestože má aktivační peptid PAR1 na 2. pozici fenylalanin, zatímco aktivační peptid PAR2 leucin, je aktivační peptid PAR1 schopný aktivovat také PAR2 receptor<sup>41</sup>. Modifikací N-konce aktivačního peptidu vznikl peptid 2-furoyl-LIGRLO-NH<sub>2</sub>, který je o řád účinnější než SLIGRL-NH<sub>2</sub> (cit.<sup>42</sup>).

Prvních šest aminokyselinových zbytků nového N-konce lidského PAR3 receptoru (TFRGAP) aktivovalo ERK signalizaci u lidských buněk. Později bylo ale zjištěno, že se na membráně vyskytoval nejen PAR3, ale i PAR1 receptor, a za pozorovanou aktivaci ERK kinasy tak stál pravděpodobně právě receptor PAR1 (cit.<sup>43</sup>). Aktivační peptidy odvozené od PAR3 aktivují nejen PAR1, ale i PAR2 receptor, neaktivují však PAR3 receptor. To je zřejmě způsobeno tím, že PAR3 receptor není schopen sám aktivovat signalizační kaskády, ale má funkci kofaktoru pro aktivaci receptoru PAR4 (cit.<sup>44</sup>). Oba receptory PAR1 i PAR2 jsou aktivovány jak aktivačními peptidy odvozenými od myšičích (SFNGGP-NH<sub>2</sub>), tak i od lidských (TFRGAP-NH<sub>2</sub>) PAR3 receptorů, byť s nižší účinností<sup>45</sup>.

Nový N-konec lidského PAR4 receptoru po jeho štěpení odpovídá sekvenci GYPGQV, účinnější syntetický peptid má sekvenci AYPGKF<sup>46</sup>. Aminokyselinovou sekvenci aktivačních ligandů receptorů PAR vznikajících po odštěpení N-konce receptoru shrnuje tab. I.

## 6. Inhibitory

Trombin hraje roli v řadě důležitých fyziologických dějů, mimo jiné má nezastupitelnou funkci během aktivace krevních destiček a koagulace krevní plazmy. Látky se schopností ovlivnit srážlivost krve, antitrombotika, se podávají lidem s mrtvicí nebo akutním infarktem myokardu. Příkladem jsou warfarin, heparin a syntetické inhibitory trombinu, které se používají při prevenci a léčbě trombózy<sup>47</sup>. Zastavení kaskády srážení krve s sebou však nese

riziko vzniku krvácení. Specifické inhibitory PAR receptorů by mohly posloužit jako bezpečnější lék, protože působí přímo na buňky a neovlivňují plazmatickou koagulační kaskádu. Receptory PAR hrají roli v patologických stavech, jako je trombóza, restenóza (zúžení cévního průsvitu), ateroskleróza, zánět nebo neurodegenerace<sup>48,49</sup>, a modulace jejich funkce tak může mít široký terapeutický potenciál.

Vývoj antagonistů PAR receptorů se ubírá mnoha směry. Část prací se věnuje vývoji inhibitorů odvozených od aminokyselinové sekvence ligandu. Vznikají však i zcela nové látky peptidové i nepeptidové povahy.

### Peptidové inhibitory

Při hledání optimální aminokyselinové sekvence aktivačního peptidu byla zjišťována významnost pozic jednotlivých aminokyselin. Na základě těchto znalostí byly specifickou změnou sekvence vytvořeny první peptidy schopné kompetitivně inhibovat aktivitu PAR receptorů. Antagonisté složení jen z přirozeně se vyskytujících aminokyselin měli však jen poměrně nízkou účinnost<sup>50</sup>. Jejich efektivita vzrostla zavedením tzv. neproteogenních, přirozeně se nevyskytujících aminokyselin<sup>51</sup>.

Zcela odlišnou skupinou peptidových inhibitorů jsou pepduciny. Pepduciny prochází přes buněčnou membránu a uvnitř buňky působí jako specifické inhibitory/aktivátory GPCR. Interagují se třetí intracelulární smyčkou GPCR, která je pro přenos signálu nejdůležitější<sup>52</sup>. Pepducin odvozený od 3. intracelulární smyčky PAR1 receptoru (P1pal-12) účinně inhiboval agregaci destiček po stimulaci SFLLRN, ale neměl efekt na agregaci destiček spuštěnou aktivovaným PAR4 receptorem. Pepducin odvozený od PAR4 receptoru (P4pal-10) částečně inhiboval nejen agregaci destiček stimulovanou aktivačním peptidem pro PAR4, ale i aktivačním peptidem pro PAR1 (cit.<sup>53</sup>).

Protilátky proti PAR receptorům jsou další možností, jak tyto receptory inhibovat. Během akutního otoku v oblasti kloubu byla zaznamenána zvýšená exprese PAR2 v okolních tkáních. Polyklonální antisérum proti PAR2 receptoru selektivně inhibovalo jeho aktivaci a vedlo ke zmenšení otoku<sup>54</sup>.

### Nepeptidové inhibitory

Při vývoji nepeptidových antagonistů se vycházelo z mnoha různých látek. Chemickou podstatu významných nepeptidových inhibitorů, jejich specifitu a účinnost shrnuje tab. II a obr. 3.

Potenciál k léčbě trombózy a restenózy má např. od indolu odvozený RWJ-56110, který blokuje agregaci destiček. Jedná se o kompetitivního antagonistu, který napodobuje peptid a váže se specificky na PAR1 receptor<sup>55</sup>. Jiný inhibitor odvozený od spiroperidinu (GB88) je aktivní při orálním podání, specificky inhibuje PAR2 receptor a jeví protizánětlivé účinky u kryš<sup>56</sup>. Teoreticky by mohl v budoucnu posloužit jako lék na systémový zánět.

Farmakologicky nadějným specifickým inhibitorem

Tabulka I

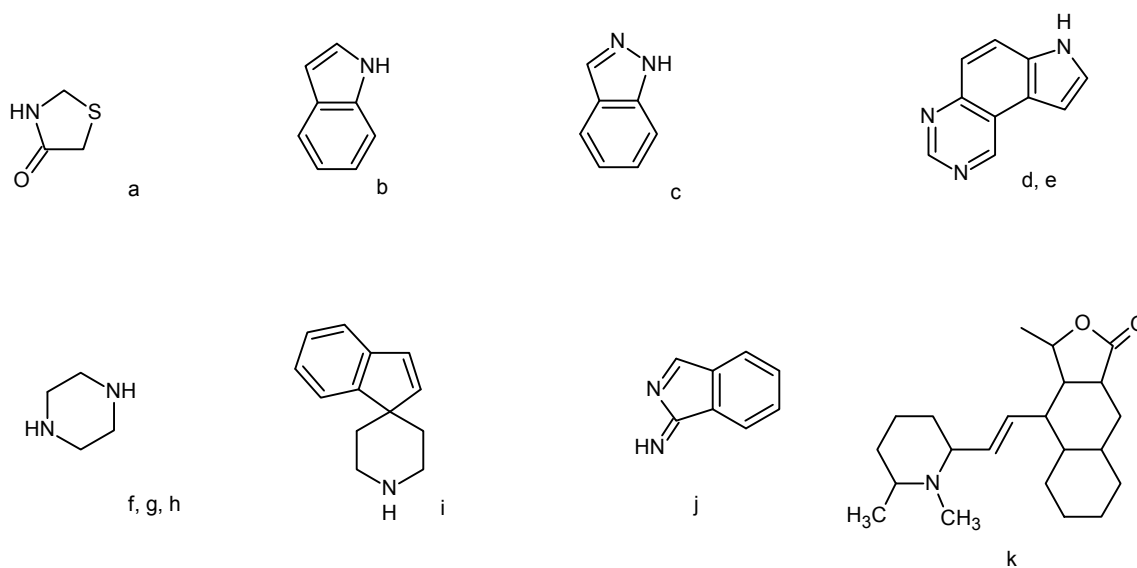
Aminokyselinová sekvence aktivačních ligandů receptorů PAR 1-4 vznikajících po odštěpení N-konce receptoru

Receptor/Sekvence	Člověk	Myš
PAR1	SFLLRN	SFLLRN
PAR2	SLIGKV	SLIGRL
PAR3	TFRGAP	SFNGGP
PAR4	GYPGQV	GYPGKF

Tabulka II  
Nepeptidové inhibitory PAR1 a PAR2 receptorů

Označení v obr. 3	Nepeptidový antagonist	Chemický základ	Specifita	IC <sub>50</sub> po stimulaci trombinem/trypsinem	Lit.
a	FR 171113	thiazolidinon	PAR1	0,29 μM	65
b	RWJ-56110	indol	PAR1	0,34 μM	55
c	YD3	indazol	PAR1	28,3 μM	66
d	SCH 79797	pyrroloquinazolin	PAR1	3 μM	67,68
e	SCH 203099	pyrroloquinazolin	PAR1	0,7 μM	67,68
f	F 16618	piperazin	PAR1	NA <sup>b</sup>	69,70
g	F 16357	piperazin	PAR1	NA <sup>b</sup>	69,70
h	ENMD-1068	piperazin	PAR2	1,2 mM	54
i	GB88	spiropiperidin	PAR2	8 μM	56
j	atopaxar, E5555	isoindolimin	PAR1	64 nM	57
k	vorapaxar, SCH 530348 <sup>a</sup>	himbacin	PAR1	47 nM	58

<sup>a</sup> Schváleno pro klinické použití, <sup>b</sup> NA – nedostupný údaj



Obr. 3. Chemické základy nepeptidových inhibitorů PAR1 a PAR2 receptorů (viz tab. II)

PAR1 receptoru je atopaxar (E5555), protože je aktivní při orálním podání a zároveň neprodlužuje dobu krvácení, což je hlavní negativní vedlejší efekt inhibitorů aktivit krevních destiček<sup>57</sup>.

Dosud nejlepším inhibitorem PAR1 receptoru je však vorapaxar (SCH 530348; látky s označením SCH nemusejí mít společný chemický základ, zkratka označuje výrobu ve

Spencer Chemical Company). Chemicky se jedná o analog himbacinu, alkaloidu z australských magnolií. Váže se reverzibilně na PAR1 receptor (IC<sub>50</sub> = 47 nM), od kterého disociuje velmi pomalu, a tak je látka i pomalu vylučována z těla. Vorapaxar je navíc rychle vstřebán po orálním podání. Tyto vlastnosti z něj dělají vhodného kandidáta pro lék využitelný v klinické praxi<sup>58</sup>.

## 7. Terapeutické využití inhibitorů

Přestože je výzkumu souvislosti PAR receptorů s různými onemocněními věnováno hodně pozornosti, vorapaxar je zatím jediný klinicky schválený inhibitor PAR receptorů.

U řady anagonistů PAR receptorů byl pozorován pozitivní efekt na průběh onemocnění u zvířecích modelů. Pepducin P1pal-12 inhiboval u myšičího modelu signalizaci spouštěnou aktivovaným PAR1 receptorem, čímž zpomaloval průběh idiopatické plicní fibrózy, pro kterou v tuto chvíli neznáme účinnou léčbu<sup>59</sup>.

Protilátky proti PAR2 mírnily otok kloubu při akutním zánětu, kdy byla v tkáni zvýšená exprese receptoru PAR2. Protilátky však musely být podány injekčně přímo do místa určení<sup>54</sup>. Pozitivní vliv na mírnění otoků kloubů měl i inhibitor ENMD-1068 (cit.<sup>54</sup>). Obě látky by mohly být v budoucnu využity při léčbě artritidy.

Dva inhibitory odvozené od piperazinu (F 16618 a F 16357) potlačovaly kontrakci mezenterálních a koronárních arterií, mohly by tedy být potenciálně využity jako vazodilatátory při léčbě křečovitého zúžení cévního průsvitu (vazospasmu). Obě látky jsou navíc účinné nejen při podávání nitrožilně, ale i perorálně<sup>60</sup>.

Přes prokázanou účinnost řady PAR inhibitorů ve studiích na laboratorních zvířatech je k jejich schválení pro klinickou praxi ještě daleko. Pouze dvě látky se dostaly do klinických studií. Atopaxar (E5555) prošel do druhé fáze klinických testů, během nichž však způsoboval významný nárůst abnormalit ve funkci jater a změny v srdečním cyklu. Klinické testování atopaxaru bylo proto zastaveno a 3. fáze klinických studií zatím není plánována<sup>61</sup>.

Jediná látka, která prošla všemi klinickými studiemi, je vorapaxar (SCH 530348). Vorapaxar snižuje inhibiční agregace krevních destiček pravděpodobnost vzniku spontánního infarktu myokardu<sup>61</sup>.

## 8. Závěr

Proteasami aktivované receptory hrají roli v řadě onemocnění; nejprozkoumanější jsou z tohoto hlediska onemocnění spojená s kardiovaskulárním systémem. V současné době používané léky na léčbu infarktu myokardu a ischemie mozku jsou založeny na inhibici enzymů způsobujících současně aktivaci krevních destiček a koagulaci krevní plazmy. Vedlejším účinkem takové léčby však mohou být velká krvácení. Cílení PAR receptorů je z farmaceutického hlediska zajímavé tím, že neovlivňuje koagulační kaskádu. Předpokládá se tedy, že léky ovlivňující PAR receptory by měly být z pohledu krvácivých komplikací bezpečnější.

Receptory PAR však hrají úlohu i v řadě neurodegenerativních onemocnění, jako je Alzheimerova nebo Parkinsonova choroba<sup>62</sup>. Studie v naší laboratoři navíc prokázala, že absence PAR2 receptoru prokazatelně prodlužuje život myším infikovaným priony<sup>63</sup>. Inhibitory PAR receptorů jsou tedy potenciálně využitelné i pro one-

mocnění mimo kardiovaskulární systém.

Nejnovější zprávou je, že americký úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) schválil v květnu 2014 použití antitrombotika vorapaxaru pro snížení rizika kardiovaskulárních příhod pacientů, kteří již prodělali infarkt myokardu<sup>64</sup>. Na trhu je tedy možné poprvé sehnat lék, který cílí na PAR receptor.

*Práce byla vypracována za přispění grantů Grantové agentury Univerzity Karlovy v Praze (projekt č. 1322713) a Grantové agentury České republiky (GAP303/12/1791).*

## LITERATURA

1. Vu T. K., Hung D. T., Wheaton V. I., Coughlin S. R.: *Cell* 64, 1057 (1991).
2. Nystedt S., Emilsson K., Wahlestedt C., Sundelin J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 9208 (1994).
3. Ishihara H., Connolly A. J., Zeng D., Kahn M. L., Zheng Y. W., Timmons C., Tram T., Coughlin S. R.: *Nature* 386, 502 (1997).
4. Kahn M. L., Zheng Y. W., Huang W., Bigornia V., Zeng D., Moff S., Farese R. V., Jr., Tam C., Coughlin S. R.: *Nature* 394, 690 (1998).
5. Xu W. F., Andersen H., Whitmore T. E., Presnell S. R., Yee D. P., Ching A., Gilbert T., Davie E. W., Foster D. C.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 6642 (1998).
6. Kahn M., Ishii K., Kuo W. L., Piper M., Connolly A., Shi Y. P., Wu R., Lin C. C., Coughlin S. R.: *Mol. Med.* 2, 349 (1996).
7. Guyonnet Duperat V., Jacquelin B., Boisseau P., Arveiler B., Nurden A. T.: *Blood* 92, 25 (1998).
8. Ossovskaya V. S., Bunnnett N. W.: *Physiol. Rev.* 84, 579 (2004).
9. Adams M. N., Ramachandran R., Yau M. K., Suen J. Y., Fairlie D. P., Hollenberg M. D., Hooper J. D.: *Pharmacol. Ther.* 130, 248 (2011).
10. Camerer E., Barker A., Duong D. N., Ganesan R., Kataoka H., Cornelissen I., Darragh M. R., Hussain A., Zheng Y. W., Srinivasan Y., Brown C., Xu S. M., Regard J. B., Lin C. Y., Craik C. S., Kirchhofer D., Coughlin S. R.: *Dev. Cell* 18, 25 (2010).
11. Kobilka B.: *Annu. Rev. Neurosci.* 15, 87 (1992).
12. Vu T. K., Wheaton V. I., Hung D. T., Charo I., Coughlin S. R.: *Nature* 353, 674 (1991).
13. Liu L. W., Vu T. K., Esmon C. T., Coughlin S. R.: *J. Biol. Chem.* 266, 16977 (1991).
14. Macfarlane S. R., Seatter M. J., Kanke T., Hunter G. D., Plevin R.: *Pharmacol. Rev.* 53, 245 (2001).
15. Smirnova I. V., Zhang S. X., Citron B. A., Arnold P. M., Festoff B. W.: *J. Neurobiol.* 36, 64 (1998).
16. Donovan F. M., Cunningham D. D.: *J. Biol. Chem.* 273, 12746 (1998).
17. Shapiro M. J., Trejo J., Zeng D., Coughlin S. R.: *J. Biol. Chem.* 271, 32874 (1996).
18. Ishii K., Chen J., Ishii M., Koch W. J., Freedman N. J., Lefkowitz R. J., Coughlin S. R.: *J. Biol. Chem.*

- 269, 1125 (1994).
19. Trejo J., Coughlin S. R.: *J. Biol. Chem.* 274, 2216 (1999).
  20. Hoxie J. A., Ahuja M., Belmonte E., Pizarro S., Parton R., Brass L. F.: *J. Biol. Chem.* 268, 13756 (1993).
  21. Hein L., Ishii K., Coughlin S. R., Kobilka B. K.: *J. Biol. Chem.* 269, 27719 (1994).
  22. Brass L. F., Pizarro S., Ahuja M., Belmonte E., Blanchard N., Stadel J. M., Hoxie J. A.: *J. Biol. Chem.* 269, 2943 (1994).
  23. Brass L. F.: *J. Biol. Chem.* 267, 6044 (1992).
  24. Shapiro M. J., Coughlin S. R.: *J. Biol. Chem.* 273, 29009 (1998).
  25. Woolkalis M. J., DeMelfi T. M., Jr., Blanchard N., Hoxie J. A., Brass L. F.: *J. Biol. Chem.* 270, 9868 (1995).
  26. Molino M., Bainton D. F., Hoxie J. A., Coughlin S. R., Brass L. F.: *J. Biol. Chem.* 272, 6011 (1997).
  27. Suidan H. S., Bouvier J., Schaerer E., Stone S. R., Monard D., Tschopp J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 8112 (1994).
  28. Riewald M., Ruf W.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 7742 (2001).
  29. Molino M., Barnathan E. S., Numerof R., Clark J., Dreyer M., Cumashi A., Hoxie J. A., Schechter N., Woolkalis M., Brass L. F.: *J. Biol. Chem.* 272, 4043 (1997).
  30. Camerer E., Huang W., Coughlin S. R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 5255 (2000).
  31. Mihara K., Ramachandran R., Renaux B., Saifeddine M., Hollenberg M. D.: *J. Biol. Chem.* 288, 32979 (2013).
  32. Ramachandran R., Mihara K., Chung H., Renaux B., Lau C. S., Muruve D. A., DeFea K. A., Bouvier M., Hollenberg M. D.: *J. Biol. Chem.* 286, 24638 (2011).
  33. Boire A., Covic L., Agarwal A., Jacques S., Sherifi S., Kuliopulos A.: *Cell* 120, 303 (2005).
  34. Trivedi V., Boire A., Tchernychev B., Kaneider N. C., Leger A. J., O'Callaghan K., Covic L., Kuliopulos A.: *Cell* 137, 332 (2009).
  35. Mosnier L. O., Sinha R. K., Burnier L., Bouwens E. A., Griffin J. H.: *Blood* 120, 5237 (2012).
  36. Molino M., Blanchard N., Belmonte E., Tarver A. P., Abrams C., Hoxie J. A., Cerletti C., Brass L. F.: *J. Biol. Chem.* 270, 11168 (1995).
  37. Chao B. H., Kalkunte S., Maraganore J. M., Stone S. R.: *Biochemistry* 31, 6175 (1992).
  38. Simak J., Holada K., Janota J., Stranak Z.: *Pediatr. Res.* 46, 445 (1999).
  39. Scarborough R. M., Naughton M. A., Teng W., Hung D. T., Rose J., Vu T. K., Wheaton V. I., Turck C. W., Coughlin S. R.: *J. Biol. Chem.* 267, 13146 (1992).
  40. Feng D. M., Veber D. F., Connolly T. M., Condra C., Tang M. J., Nutt R. F.: *J. Med. Chem.* 38, 4125 (1995).
  41. Blackhart B. D., Emilsson K., Nguyen D., Teng W., Martelli A. J., Nystedt S., Sundelin J., Scarborough R. M.: *J. Biol. Chem.* 271, 16466 (1996).
  42. McGuire J. J., Saifeddine M., Triggle C. R., Sun K., Hollenberg M. D.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 309, 1124 (2004).
  43. Kaufmann R., Schulze B., Krause G., Mayr L. M., Settmacher U., Henklein P.: *Regul. Pept.* 125, 61 (2005).
  44. Nakanishi-Matsui M., Zheng Y. W., Sulciner D. J., Weiss E. J., Ludeman M. J., Coughlin S. R.: *Nature* 404, 609 (2000).
  45. Hansen K. K., Saifeddine M., Hollenberg M. D.: *Immunology* 112, 183 (2004).
  46. Faruqi T. R., Weiss E. J., Shapiro M. J., Huang W., Coughlin S. R.: *J. Biol. Chem.* 275, 19728 (2000).
  47. Fareed J., Iqbal O., Cunanan J., Demir M., Wahi R., Clarke M., Adiguzel C., Bick R.: *Int. Angiol.* 27, 176 (2008).
  48. Seiler S. M., Bernatowicz M. S.: *Curr. Med. Chem. Cardiovasc. Hematol. Agents* 1, 1 (2003).
  49. Smith-Swintosky V. L., Cheo-Isaacs C. T., D'Andrea M. R., Santulli R. J., Darrow A. L., Andrade-Gordon P.: *J. Neurochem.* 69, 1890 (1997).
  50. Al-Ani B., Saifeddine M., Wijesuriya S. J., Hollenberg M. D.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 300, 702 (2002).
  51. Fujita T., Nose T., Nakajima M., Inoue Y., Costa T., Shimohigashi Y.: *J. Biochem.* 126, 174 (1999).
  52. O'Callaghan K., Kuliopulos A., Covic L.: *J. Biol. Chem.* 287, 12787 (2012).
  53. Kuliopulos A., Covic L.: *Life Sci.* 74, 255 (2003).
  54. Kelso E. B., Lockhart J. C., Hembrough T., Dunning L., Plevin R., Hollenberg M. D., Sommerhoff C. P., McLean J. S., Ferrell W. R.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 316, 1017 (2006).
  55. Andrade-Gordon P., Maryanoff B. E., Derian C. K., Zhang H. C., Addo M. F., Darrow A. L., Eckardt A. J., Hoekstra W. J., McComsey D. F., Oksenberg D., Reynolds E. E., Santulli R. J., Scarborough R. M., Smith C. E., White K. B.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 12257 (1999).
  56. Suen J. Y., Barry G. D., Lohman R. J., Halili M. A., Cotterell A. J., Le G. T., Fairlie D. P.: *Br. J. Pharmacol.* 165, 1413 (2012).
  57. Kogushi M., Matsuoka T., Kawata T., Kuramochi H., Kawaguchi S., Murakami K., Hiyoshi H., Suzuki S., Kawahara T., Kajiwara A., Hishinuma I.: *Eur. J. Pharmacol.* 657, 131 (2011).
  58. Kosoglou T., Reyderman L., Tiessen R. G., van Vliet A. A., Fales R. R., Keller R., Yang B., Cutler D. L.: *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 68, 249 (2012).
  59. Lin C., Duitman J., Daalhuisen J., Ten Brink M., von der Thusen J., van der Poll T., Borensztajn K., Spek C. A.: *Thorax* 69, 152 (2013).
  60. Bocquet A., Letienne R., Sablayrolles S., De Vries L., Perez M., Le Grand B.: *Eur. J. Pharmacol.* 611, 60 (2009).
  61. de Souza Brito F., Tricoci P.: *J. Cardiovasc. Transl. Res.* 6, 415 (2013).
  62. Luo W., Wang Y., Reiser G.: *Brain. Res. Rev.* 56, 331 (2007).

63. Matej R., Olejar T., Janouskova O., Holada K.: *J. Gen. Virol.* 93, 2057 (2012).
64. Food and Drug Administration, 2014.
65. Kato Y., Kita Y., Nishio M., Hirasawa Y., Ito K., Yamanaka T., Motoyama Y., Seki J.: *Eur. J. Pharmacol.* 384, 197 (1999).
66. Wu C. C., Huang S. W., Hwang T. L., Kuo S. C., Lee F. Y., Teng C. M.: *Br. J. Pharmacol.* 130, 1289 (2000).
67. Ahn H. S., Foster C., Boykow G., Stamford A., Manna M., Graziano M.: *Biochem. Pharmacol.* 60, 1425 (2000).
68. Ahn H. S., Arik L., Boykow G., Burnett D. A., Caplen M. A., Czarniecki M., Domalski M. S., Foster C., Manna M., Stamford A. W., Wu Y.: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9, 2073 (1999).
69. Alexopoulos K., Matsoukas J., Tselios T., Roumelioti P., Mavromoustakos T., Holada K.: *Amino Acids* 15, 211 (1998).
70. Perez M., Lamothe M., Maraval C., Mirabel E., Loubat C., Planty B., Horn C., Michaux J., Marrot S., Letienne R., Pignier C., Bocquet A., Nadal-Wollbold F., Cussac D., de Vries L., Le Grand B.: *J. Med. Chem.* 52, 5826 (2009).

**Z. Jindrová<sup>a,b</sup>, Z. Hanusová<sup>a</sup>, and Karel Holada<sup>a</sup>**  
(<sup>a</sup> *Institute of Immunology and Microbiology, First Faculty of Medicine,* <sup>b</sup> *Third Faculty of Medicine, Charles University, Prague*): **Protease-Activated Receptors: Activation, Inhibition and Pharmaceutical Relevance**

Protease-activated receptors (PARs) are transmembrane proteins which rank among G-protein-coupled receptors. So far, four PARs (PAR1-4) have been described. They are activated by a protease cleavage at the N-terminal part of the receptor. Through the cleavage a new N-terminus appears which acts as a ligand activating the receptor. A peptide of the same amino acid sequence as the new N-terminus can activate the receptor without its cleavage. Some non-specific proteases can cleave PAR receptors at different sites, which results in changes in cell signaling. Higher activities of PARs have been observed under various pathological conditions, such as thrombosis, atherosclerosis, inflammations or neurodegeneration. Specific modulators of PAR signaling are a promising class of compounds with a wide therapeutic potential. First PAR inhibitors were based mainly on the amino acid sequence in the activating peptides. Recently, new, low-molecular-weight, very specific and effective inhibitors have been developed. One of them, vorapaxar, passed the clinical tests and was introduced to the market.