Receptory Klasy F GPCR – aktywacja i farmakologia

Paweł Kozielowicz^{1, 2}, Konrad Owczarek^{2, 3}, Joanna J. Sajkowska-Kozielowicz^{2, 4}

¹ Wydział Fizjologii i Farmakologii, Karolinska Institutet, Sztokholm, Szwecja

² Interdyscyplinarne Koło Naukowe Pharm-Med, Naukowcy dla Studentów

³ Wydział Lekarski, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

⁴ Katedra Farmacji Fizycznej i Bioanalizy, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Adres do korespondencji: Paweł Kozielowicz, Wydział Fizjologii i Farmakologii, Karolinska Institutet, 171 65 Solna, Sztokholm, Szwecja, e-mail: pawel.kozielowicz@ki.se

Wprowadzenie

Receptory sprzężone z białkami G (ang. *G protein-coupled receptor*, GPCRs) stanowią najliczniejszą grupę białek będących celami dla leków. Blisko 700 różnych leków oddziałuje na 134 receptory sprzężone z białkami G, co stanowi około 35% wszystkich zarejestrowanych przez FDA (ang. *Food and Drug Administration*) [1, 2]. Niektóre GPCRs nie zostały w pełni scharakteryzowane, a inne wciąż pozostają sieroce (ang. *orphan*) bez dotychczas odkrytych ligandów endogennych [3]. W związku z tym rozwój badań nad GPCR jest kluczowy zarówno dla pacjentów, jak i firm farmaceutycznych. Wiązanie się leku – agonisty – z receptorem powoduje określone zmiany konformacyjne i zapoczątkowanie ścieżki sygnałowej. Natomiast leki antagonistyczne to leki blokujące działanie agonisty, jednak same nie mają one wpływu na aktywność receptora. Aktywacja GPCRs jest opisana przez tzw. model trzeciorzędowy (ang. *ternary complex model*), gdzie przyłączenie substancji aktywującej receptor, tj. agonisty w obecności podjednostki α białka G, powoduje zmianę konformacji receptora, która najczęściej manifestuje się przez otwarcie szóstej domeny transbłonowej (ang. *TM6*). Ten mechanizm leży u podstaw inicjacji ścieżki sygnałowej [4]. Niedawny postęp w krystalografii rentgenowskiej (ang. *X-ray crystallography*) oraz mikroskopii krioelektronowej (ang. *Cryo-EM*) umożliwił poznanie elementów strukturalnych aktywowanych receptorów z klasy A, B oraz częściowo C [5, 6, 7]. Osobną

Class F GPCR – activation mechanism and pharmacology • In the review, we characterize G protein-coupled receptors (GPCRs). These proteins are targeted by approximately 35% of currently marketed drugs. Here, we focus on Class F receptors (Frizzleds, FZDs). First, we describe the ternary complex model that defines activation mechanism shared among different receptor classes. Next, we summarize the recent progress that has been made in the Class F research using resonance energy transfer-based tools. We demonstrate that these efforts corroborate the idea that Class F receptors are indeed GPCRs. Given the clinical significance of GPCRs, medicinal chemistry strategies are now required to unravel the full therapeutic potential of targeting FZDs pharmacologically.

Keywords: GPCR, Frizzled, BRET, FRET, G protein, ternary complex model, SMO.

© Farm Pol, 2019, 75(8): 451–456

klasę receptorów, klasę F, stanowią Frizzleds [8]. Receptory te są głównie kojarzone ze ścieżką sygnałową WNT/ β -katenina i często klasyfikowane wręcz jako tylko „podobne do GPCR” (ang. *GPCR-like*) [9]. Jednak w ostatnim czasie opublikowanych zostało kilka ważnych badań pokazujących, że receptory te, poza cechami strukturalnymi, zachowują się podobnie do klasycznych receptorów Klasy A GPCR [10, 11].

Klasa F GPCR

Do klasy F – Frizzleds – należy 10 paralogów FZDs (FZD₁₋₁₀) i Smoothened (SMO). FZDs regulują wiele procesów podczas rozwoju embrionalnego,

regulacji komórek macierzystych i homeostazy tkanek dorosłych [12]. FZDs są aktywowane przez lipoglikoproteiny z rodziny WNT – wyróżnia się ich 19 typów. WNTs oddziałują z FZDs prawdopodobnie poprzez interakcje z ich zewnątrzkomórkową domeną bogatą w cysteiny (CRD).

Wewnątrzkomórkowo FZDs oddziałują z fosfoproteiną Disheveled (DVL), która poza białkiem LRP5/6 stanowi ważne ogniwo ścieżki WNT/ β -katenina, czyli tzw. ścieżki kanonicznej. Poza ścieżką kanoniczną wyróżnia się ponadto ścieżki niekanoniczne: ścieżkę planarnej polaryzacji komórek (ang. *planar cell polarity*, PCP) i ścieżkę mobilizacji jonów wapnia. Nie jest do końca jasne, czy i jak heterotrymeryczne białka G uczestniczą w ścieżce kanonicznej [13, 14].

Z kolei SMO jest receptorem stanowiącym ważny element szlaku Sonic Hedgehog. W przypadku SMO również rozróżnia się sygnalizację kanoniczną i niekanoniczną. Wiadomo, że SMO wiąże się i aktywuje białko G_i [15]. Pomimo dostępności leków – vismodegib, sonidegib, glasdegib, których celem komórkowym jest ten receptor, nie wiadomo, jakie endogenne ligandy aktywują bądź hamują działanie SMO, ale jest możliwe, że białko to jest receptorem dla cholesterolu i jego pochodnych [11, 16].

Frizzled to nie GPCR?

Jako najczęstsze argumenty przeciwko klasyfikacji FZD jako GPCR wymieniane są: brak klasycznych motywów strukturalnych, które posiadają receptory klasy A, jak motywy DR(E)Y lub NPXXY oraz sprzeczne dane na temat roli, jaką białka G pełnią w ścieżce WNT/ β -katenina [14, 17, 18]. Należy przy tym zauważyć, że prowadzenie badań nad FZD w sposób podobny do klasycznych GPCRs było do tej pory utrudnione przez brak odpowiednich metod. Najczęściej używaną metodą badania aktywacji FZD jest TopFlash – system genów reporterowych TCF-LEF, gdzie analizowana jest aktywacja ścieżki kanonicznej WNT/ β -katenina, po przynajmniej kilkugodzinnej stymulacji receptorów. Ta metoda prowadzi jednak do jednowymiarowej analizy FZD, nie biorąc pod uwagę np. elementów ścieżki, które są aktywowane na jej wcześniejszych etapach. Należy też mieć na uwadze fakt, że FZD₃ i FZD₆ nie aktywują ścieżki kanonicznej [17, 18, 19], wobec czego klasyczne metody badań FZD nie znajdują zastosowania w przypadku tych 2 paralogów.

Frizzled jako GPCR

Pomimo istniejących trudności, w kilku ośrodkach badawczych na świecie od lat prowadzone

są analizy FZD jako GPCR. Wyniki wskazują m.in. na to, że:

- FZD funkcjonalnie oddziałują z heterotrymerycznymi białkami G [20, 21],
- stymulacja WNT aktywuje nieaktywne kompleksy FZD-białko G [22],
- aktywacja FZDs prowadzi do zainicjowania ścieżek sygnałowych zależnych od białka G [23],
- interakcja WNT z FZD prowadzi do przekształceń konformacyjnych, przypominających te obserwowane w klasycznych GPCRs stymulowanych agonistą [24, 25].

Najnowsze wyniki badań potwierdzające naturę FZD jako GPCR

W 2018 r. [25] po raz pierwszy pokazano charakterystykę FZD₅ jako receptora wiążącego się i aktywującego heterotrymeryczne białko G_q . Analizę przeprowadzono za pomocą metod biochemicznych i biofizycznych. Za pomocą dwukolorowej metody FRAP (ang. *double-color FRAP*) udowodniono, że podjednostka $G\alpha_q$ wiąże się z nieaktywnym receptorem FZD₅. W kolejnej analizie wykorzystano nowy biosensor FRET (ang. *Förster resonance energy transfer*), który składał się z akceptora (motywu FLAsH w wewnętrznej pętli 3 receptora, ang. *ICL3*) i donora YFP na końcu C receptora. Zgodnie z teorią modelu trzeciorzędowego, aktywacja GPCR prowadzi do zmiany położenia *ICL3* i *TM6*, co w omawianej pracy zostało wykazane również dla FZD₅. Po aktywacji ligandem WNT-5A zmierzono spadek sygnału świadczący o wzroście odległości między dwoma partnerami FRET. Ponadto, za pomocą 2 różnych biosensorów FRET i BRET (ang. *bioluminescence resonance energy transfer*) pokazano dysocjację białka G_q jako odpowiedź na stymulację receptora przez WNT-5A. Wyniki potwierdzono też badając klasyczną wapniową ścieżkę sygnałową, którą inicjuje dysocjacja podjednostki $G\alpha_q$. Holistyczny wpływ aktywacji FZD₅ na procesy komórkowe zmierzono metodą DMR (ang. *dynamic mass redistribution*). W celu wykazania specyficzności, że to białko G_q odpowiada za przekazanie sygnału z aktywowanego FZD₅ użyto inhibitora G_q , który hamował działanie WNT-5A na FZD₅. W kolejnym artykule (Wright and Koziellewicz et al., 2019) [24] scharakteryzowany został motyw strukturalny obecny we wszystkich receptorach Klasy F, który autorzy nazwali przełącznikiem molekularnym (ang. *molecular switch*). Okazuje się, że receptory Klasy F utrzymywane są w stanie nieaktywnym dzięki wiązaniu wodorowemu (ewentualnie dwóm) oraz interakcji π -kation pomiędzy arginina/lizyna (R/K^{6,32} w nomenklaturze

Ballesteros-Weinstein [26]) a tryptofanem ($W^{7.55}$). Mutacja argininy/lizyny lub tryptofanu do aminokwasów niemogących ze sobą oddziaływać (np. $R \rightarrow A/Q$ lub $W \rightarrow L$) powoduje wzrost aktywności konstytucyjnej receptora. Ponadto, mutacje tego motywu powodują, po aktywacji, wzrost rekrutacji biosensorów Venus-mini G – rekombinowanych fragmentów podjednostek α białek G z przyłączonym białkiem fluorescencyjnym Venus [27]. Z drugiej strony, receptory posiadające mutacje w motywie przełącznika molekularnego nie wiążą się z DVL i nie aktywują ścieżki kanonicznej WNT/ β -katenina. Powyższe badania zostały przeprowadzone metodami modelowania molekularnego, AlphaScreen oraz BRET. Interesujący jest również fakt, że analiza genomiczna wykazała, że mutacja $R \rightarrow Q$ jest najczęściej występującą w próbkach nowotworowych mutacją wśród receptorów Klasy F.

Kierunek przyszłych badań

W celu lepszego poznania mechanizmu aktywacji FZD niezbędne jest otrzymanie struktury aktywnego kompleksu ligand-FZD-allosteryczny modulator wewnątrzkomórkowy (np. białko G, β -arrestyna). Dotychczas udało się uzyskać kilka nieaktywnych struktur SMO (z agonistami lub antagonistami [28, 29]), 2 aktywne struktury SMO [30, 31] i strukturę FZD₄ – która jest pierwszym otrzymanym GPCR w stanie apo – czyli bez żadnego związanego ligandu [32]. Dwie najnowsze (czerwiec 2019) aktywne struktury SMO udało się otrzymać w kompleksach z: pochodną cholesterolu w CRD oraz białkiem G_i [30] (**rycina 1**) oraz trzema ligandami, tj. cholesterol w CRD, SAG21k oraz cholesterol w domenie transbłonowej oraz nano-ciałem Nb80 [31]. Te dwie publikacje, mimo kontrowersyjnych względem innych publikacji [29, 33] wyników badań, niewątpliwie sugerują dużą złożoność mechanizmu wiązania ligandu i aktywacji SMO. Bez wątpienia kolejne badania powinny iść w kierunku jak najszybszego poznania faktycznej struktury innych receptorów tej klasy, z uwzględnieniem kompleksu z białkiem G. Z uwagi na to, że białka WNT są niestabilne analiza strukturalna byłaby znacznie ułatwiona, gdyby udało się znaleźć ligand niskocząsteczkowy, który wiązałby się z FZD w przestrzeni transbłonowej, podobnie jak to ma miejsce w przypadku SMO.

Frizzled i inne GPCR jako cele dla leków

Jak wspomniano na wstępie, GPCR są najważniejszymi celami dla leków. Wśród nich znajdują się substancje stosowane w chorobach

Rycina 1.
SMO (kolor niebieski) w konformacji aktywnej ze związanym ligandem (24,25(S)-epoksycholesterol, kolor czarny) oraz heterotrymerycznym białkiem G_i (kolor zielony) [30].

Figure 1.
SMO (blue cartoon) in an active conformation with bound 24,25(S)-epoxycholesterol (black sticks) and heterotrimeric G_i (green cartoon).

alergicznym, nowotworowym, metabolicznym, psychicznym czy neurodegeneracyjnym [34]. Najwięcej leków oddziałuje na receptory klasy A (rodopsyno-podobne), chociaż znane są leki oddziałujące na wszystkie klasy GPCR. Jest bardzo możliwe, że bliższe poznanie zależności strukturalno-funkcyjnej FZDs spowoduje, że za jakiś czas dostępnych będzie więcej leków oddziałujących na tę grupę.

Ze względu na częstość występowania w populacji poszczególnych chorób, do najczęściej stosowanych substancji oddziałujących na GPCR należą leki przeciwalergiczne, antyastmatyczne, hipotensyjne, antydepresyjne, przeciwpsychotyczne oraz opioidowe środki przeciwbólowe [1, 2]. Wybrane leki wraz z receptorem, na który działają oraz ich zastosowanie przedstawia **tabela 1**.

Tabela 1. Leki oddziałujące na GPCRs oraz ich zastosowanie w leczeniu chorób.

Table 1. GPCRs-targeting drugs and their therapeutic use.

Nazwa leku	Typ liganda	Receptor	Gen kodujący GPCR	Klasa receptora	Działanie leku
Aklidynium	Antagonista	Muskarynowy	CHRM1–M5	Rodopsyno-podobny	Bronchodylatacyjne
Albuterol	Agonista	Adrenergiczny	ADRB2	Rodopsyno-podobny	Bronchodylatacyjne
Alfentanyl	Agonista	Opioidowy	OPRM1	Rodopsyno-podobny	Przeciwbólowe
Aryiprazol	Częściowy agonista	Serotoninowy/Dopaminowy	HTR1A/HTR2A/DRD2	Rodopsyno-podobny	Przeciwppsychotyczne
Azelastyna	Antagonista	Histaminowy	HRH1	Rodopsyno-podobny	Przeciw alergiczne
Baklofen	Agonista	Glutaminergiczny	GABBR1/GABBR2	Glutaminergiczny	Spazmolityczne
Betaksolol	Antagonista	Adrenergiczny	ADRB1	Rodopsyno-podobny	Hipotensyjne
Bilastyna	Antagonista	Histaminowy	HRH1	Rodopsyno-podobny	Przeciw alergiczne
Bisoprolol	Antagonista	Adrenergiczny	ADRB1	Rodopsyno-podobny	Hipotensyjne
Bozentan	Antagonista	Endoteliny	EDRNA/EDRNB	Rodopsyno-podobny	Hipotensyjne
Buprenorfina	Agonista	Opioidowy	OPRM1/OPRK1	Rodopsyno-podobny	Przeciwbólowe
Kandesartan	Antagonista	Angiotensyny II	AGTR1	Rodopsyno-podobny	Hipotensyjne
Kangrelor	Antagonista	Purynergiczny	P2RY12	Rodopsyno-podobny	Przeciw płytkowe
Karwedilol	Antagonista	Adrenergiczny	ADRA1/ADRB1	Rodopsyno-podobny	Hipotensyjne
Chlorpromazyna	Antagonista	Serotoninowy/Dopaminowy	HTR2A/DRD2	Rodopsyno-podobny	Przeciwppsychotyczne
Klemastyna	Antagonista	Histaminowy	HRH1	Rodopsyno-podobny	Przeciw alergiczne
Klopidogrel	Antagonista	Purynergiczny	P2RY12	Rodopsyno-podobny	Przeciw płytkowe
Kodeina	Agonista	Opioidowy	OPRM1/OPRD1/OPRK1	Rodopsyno-podobny	Przeciwbólowe
Dulaglutyd	Agonista	Glukagono-podobny	GLP1R	Sekretyno-podobny	Przeciw cukrzycowe
Eksenatyd	Agonista	Glukagono-podobny	GLP1R	Sekretyno-podobny	Przeciw cukrzycowe
Fentanyl	Agonista	Opioidowy	OPRM1/OPRD1	Rodopsyno-podobny	Przeciwbólowe
Hydrokodon	Agonista	Opioidowy	OPRM1/OPRD1	Rodopsyno-podobny	Przeciwbólowe
Indakaterol	Agonista	Adrenergiczny	ADRB2	Rodopsyno-podobny	Bronchodylatacyjne
Lewodopa	Agonista	Dopaminowy	DRD1–D5	Rodopsyno-podobny	Przeciw parkinsonowskie
Loperamid	Agonista	Opioidowy	OPRM1	Rodopsyno-podobny	Przeciw biegunkowe
Marawirok	Antagonista	Chemokinowy	CCR5	Rodopsyno-podobny	Przeciw wirusowe
Montelukast	Antagonista	Leukotrienowy	CYSLTR1	Rodopsyno-podobny	Przeciw astmatyczny
Morfina	Agonista	Opioidowy	OPRM1/OPRD1/OPRK1	Rodopsyno-podobny	Przeciwbólowe
Sonidegib	Antagonista	Frizzled	SMO	Frizzled	Przeciw nowotworowe
Teryparatyd	Agonista	Parathormonu	PTH1R	Sekretyno-podobny	Antyosteoporotyczne
Tymolol	Antagonista	Adrenergiczny	ADRB1/ADRB2	Rodopsyno-podobny	Przeciw jaskrowe
Vismodegib	Antagonista	Frizzled	SMO	Frizzled	Przeciw nowotworowe
Zolmitriptan	Agonista	Serotoninowy	HTR1A/HTR1B/HTR1D/HTR1F	Rodopsyno-podobny	Przeciw migrenowe

Niektóre GPCRs stanowią cel dla kilku różnych rodzajów leków, a jeden lek może jednocześnie oddziaływać na różne rodzaje receptorów. Poza GPR97 należącym do klasy receptorów adhezyjnych, sieroce GPCRs nie stanowią obecnie celu dla leków. Należy podkreślić, że SMO, do niedawna uważany za sierocy, jest prawdopodobnie receptorem dla cholesterolu i oksysteroli. W niektórych przypadkach pomimo oddziaływania leku na GPCR, efekt działania nie wynika z aktywacji receptora, lub jego wpływ na GPCR jest niejasny. Dotyczy to furosemidu i bumetanidu, które wykazują powinowactwo do receptora GPR35 [35], ale

swój efekt kliniczny wywołują poprzez oddziaływanie na kotransporter sodowo-potasowo-chlorowy SLC12 [36] lub kwasu retinowego, który nie wiąże się bezpośrednio z GPRC5A, ale reguluje jego ekspresję [37]. Lorazepam, lek z grupy benzodiazepin, którego działanie anksjolityczne wynika z reakcji z kompleksem receptorowym GABAA, wiąże się również z pH-wrażliwym receptorem GPR68 i powoduje przekazanie sygnału za pośrednictwem heterotrimeru G_q [38]. Poznanie fizjologicznych ligandów dotychczas sierocych receptorów sprzężonych z białkami G może przyczynić się do lepszego zrozumienia mechanizmu

występowania działań niepożądanych i zmniejszyć ich częstość.

Przeciwciała monoklonalne stanowią nową grupę leków oddziałujących na GPCRs. Mogamulizumab, antagonistą receptora chemokinowego CCR4, stosowany w leczeniu ziarniniaka grzybiastego i zespołu Sezary'ego, będących najczęstszymi podtypami chłoniaków T-komórkowych skóry, jest jedynym zarejestrowanym przeciwciałem działającym na GPCR, chociaż w fazie badań klinicznych znajduje się ponad 70 innych [6, 39]. Wśród nich duże nadzieje budzą inhibitory szlaku sygnałowego Wnt. Vantictumab – monoklonalne przeciwciało klasy IgG2 przeciwko FZD_{1,2,5,7,8} oraz ipafricept – fuzyjne białko zbudowane z zewnątrzkomórkowej domeny wiążącej ligand FZD₈ oraz fragmentu Fc ludzkiej immunoglobuliny G1, stosowane na modelach mysich w leczeniu guzów litych sutka, trzustki i jajnika w terapii sekwencyjnej z klasyczną chemioterapią potencjalizowały jej działanie i w większym stopniu hamowały wzrost guza w porównaniu do standardowej chemioterapii [40]. Immunoterapia, ze względu na swoje unikalne właściwości, może zrewolucjonizować leczenie wielu chorób nowotworowych i autoimmunologicznych.

Podziękowania

P.K. i J.J.S. – K. są wdzięczni Prof. Gunnarowi Schulte za udzielone wsparcie merytoryczne.

Otrzymano: 2019.08.09 · Zaakceptowano: 2019.08.29

Piśmiennictwo

- Hauser A.S., Attwood M.M., Rask-Andersen M., Schioth H.B., Gloriam D.E.: Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications. *Nat Rev Drug Discov* 2017.
- Hauser A.S., Chavali S., Masuho I., Jahn L.J., Martemyanov K.A., Gloriam D.E., Babu M.M.: Pharmacogenomics of GPCR. *Drug Targets Cell* 2018, 172: 41–54 e19.
- Alexander S.P., Christopoulos A., Davenport A.P., Kelly E., Marrion N.V., Peters J.A., Faccenda E., Harding S.D., Pawson A.J., Sharman J.L., Southan C., Davies J.A., Collaborators C.: THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2017/18: G protein-coupled receptors. *Br J Pharmacol* 2017, 174 Suppl: S17–S129.
- De Lean A., Stadel J.M., Lefkowitz R.J.: A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 1980, 255: 7108–7117.
- Krishna Kumar K., Shalev-Benami M., Robertson M.J., Hu H., Banister S.D., Hollingsworth S.A., Latorraca N.R., Kato H.E., Hilger D., Maeda S., Weis W.I., Farrens D.L., Dror R.O., Malhotra S.V., Kobilka B.K., Skiniotis G.: Structure of a Signaling Cannabinoid Receptor 1-G Protein Complex. *Cell* 2019, 176: 448–458 e412.
- Liang Y.L., Khoshouei M., Glukhova A., Furness S.G.B., Zhao P., Clydesdale L., Koole C., Truong T.T., Thal D.M., Lei S., Radjainia M., Danev R., Baumeister W., Wang M.W., Miller L.J., Christopoulos A., Sexton P.M., Wootten D.: Phase-plate cryo-EM structure of a biased agonist-bound human GLP-1 receptor-Gs complex. *Nature* 2018, 555: 121–125.
- Koehl A., Hu H., Feng D., Sun B., Zhang Y., Robertson M.J., Chu M., Kobilka T.S., Laeremans T., Steyaert J., Tarrasch J., Dutta S., Fonseca R., Weis W.I., Mathiesen J.M., Skiniotis G., Kobilka B.K.: Structural insights into the activation of metabotropic glutamate receptors. *Nature* 2019, 566: 79–84.
- Schulte G.: International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXX. The class Frizzled receptors. *Pharmacol Rev* 2010, 62: 632–667.
- Erlanson S.C., McMahon C., Kruse A.C.: Structural Basis for G Protein-Coupled Receptor Signaling. *Annu Rev Biophys* 2018.
- Schulte G., Wright S.C.: Frizzleds as GPCRs—More Conventional Than We Thought!. *Trends Pharmacol Sci* 2018, 39: 828–842.
- Schulte G., Koziolowicz P.: Structural insight into Class F receptors – What have we learnt regarding agonist-induced activation? *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2019.
- Schulte G., Bryja V.: The Frizzled family of unconventional G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* 2007, 28: 518–525.
- Dijksterhuis J.P., Petersen J., Schulte G.: WNT/Frizzled signaling: receptor-ligand selectivity with focus on FZD-G protein signaling and its physiological relevance. *Br J Pharmacol* 2013.
- Bowin C.F., Inoue A., Schulte G.: WNT-3A-induced beta-catenin signaling does not require signaling through heterotrimeric G proteins. *J Biol Chem* 2019.
- Shen F., Cheng L., Douglas A.E., Riobo N.A., Manning D.R.: Smoothened is a fully competent activator of the heterotrimeric G protein G(i). *Mol Pharmacol* 2013, 83: 691–697.
- Kong J.H., Siebold C., Rohatgi R.: Biochemical mechanisms of vertebrate hedgehog signaling. *Development* 2019, 146.
- Wess J.: Molecular basis of receptor/G-protein-coupling selectivity. *Pharmacol Ther* 1998, 80: 231–264.
- Angers S., Moon R.T.: Proximal events in Wnt signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009, 10: 468–477.
- Golan T., Yaniv A., Bafico A., Liu G., Gazit A.: The human Frizzled 6 (HFZ6) acts as a negative regulator of the canonical Wnt. beta-catenin signaling cascade. *J Biol Chem* 2004, 279: 14879–14888.
- Kilander M.B., Dahlstrom J., Schulte G.: Assessment of Frizzled 6 membrane mobility by FRAP supports G protein coupling and reveals WNT-Frizzled selectivity. *Cell Signal* 2014, 26: 1943–1949.
- Kilander M.B., Petersen J., Andressen K.W., Ganji R.S., Levy F.O., Schuster J., Dahl N., Bryja V., Schulte G.: Dishevelled regulates pre-coupling of heterotrimeric G proteins to Frizzled 6. *FASEB J* 2014, 28: 2293–2305.
- Halleskog C., Dijksterhuis J.P., Kilander M.B., Becerril-Ortega J., Villacusa J.C., Lindgren E., Arenas E., Schulte G.: Heterotrimeric G protein-dependent WNT-5A signaling to ERK1/2 mediates distinct aspects of microglia proinflammatory transformation. *J Neuroinflammation* 2012, 9: 111.
- Petersen J., Wright S.C., Rodriguez D., Matricon P., Lahav N., Vromen A., Friedler A., Stromqvist J., Wennmalm S., Carlsson J., Schulte G.: Agonist-induced dimer dissociation as a macromolecular step in G protein-coupled receptor signaling. *Nat Commun* 2017, 8: 226.
- Wright S.C., Koziolowicz P., Kowalski-Jahn M., Petersen J., Bowin C.F., Slodkowitz G., Marti-Solano M., Rodriguez D., Hot B., Okashah N., Strakova K., Valnohova J., Babu M.M., Lambert N.A., Carlsson J., Schulte G.: A conserved molecular switch in Class F receptors regulates receptor activation and pathway selection. *Nat Commun* 2019, 10: 667.
- Wright S.C., Canizal M.C.A., Benkel T., Simon K., Le Gouill C., Matricon P., Namkung Y., Lukasheva V., Konig G.M., Laporte S.A., Carlsson J., Kostenis E., Bouvier M., Schulte G., Hoffmann C.: FZD5 is a Galphq-coupled receptor that exhibits the functional hallmarks of prototypical GPCRs. *Sci Signal* 2018, 11.
- Ballesteros J.A., Weinstein H.: Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors. *Methods in Neurosciences* 1995, 25: 366–428.
- Wan Q., Okashah N., Inoue A., Nehme R., Carpenter B., Tate C.G., Lambert N.A.: Mini G protein probes for active G protein-coupled receptors (GPCRs) in live cells. *J Biol Chem* 2018.
- Wang C., Wu H., Katritch V., Han G.W., Huang X.P., Liu W., Siu F.Y., Roth B.L., Cherezov V., Stevens R.C.: Structure of the human smoothened receptor bound to an antitumour agent. *Nature* 2013, 497: 338–343.
- Byrne E.F., Sircar R., Miller P.S., Hedger G., Luchetti G., Nachtergaele S., Tully M.D., Mydock-McGrane L., Covey D.F., Rambo R.P., Sansom M.S., Newstead S., Rohatgi R.: Structural basis of Smoothened regulation by its extracellular domains. *Nature* 2016, 535: 517–522.
- Qi X., Liu H., Thompson B., McDonald J., Zhang C., Li X.: Cryo-EM structure of oxysterol-bound human Smoothened coupled to a heterotrimeric Gi. *Nature* 2019, 571: 279–283.
- Deshpande I., Liang J., Hedeon D., Roberts K.J., Zhang Y., Ha B., Latorraca N.R., Faust B., Dror R.O., Beachy P.A., Myers B.R., Manglik A.: Smoothened stimulation by membrane sterols drives Hedgehog pathway activity. *Nature* 2019, 571: 284–288.

32. Yang S., Wu Y., Xu T.H., de Waal P.W., He Y., Pu M., Chen Y., DeBruine Z.J., Zhang B., Zaidi S.A., Popov P., Guo Y., Han G.W., Lu Y., Suino-Powell K., Dong S., Harikumar K.G., Miller L.J., Katritch V., Xu H.E., Shui W., Stevens R.C., Melcher K., Zhao S., Xu F.: Crystal structure of the Frizzled 4 receptor in a ligand-free state. *Nature* 2018, 560: 666–670.
33. Huang P., Zheng S., Wierbowski B.M., Kim Y., Nedelcu D., Aravena L., Liu J., Kruse A.C., Salic A.: Structural Basis of Smoothened Activation in Hedgehog Signaling. *Cell* 2018, 174: 312–324. e316.
34. Basith S., Cui M., Macalino S.J.Y., Park J., Clavio N.A.B., Kang S., Choi S.: Exploring G Protein-Coupled Receptors (GPCRs) Ligand Space via Cheminformatics Approaches: Impact on Rational Drug Design. *Front Pharmacol* 2018, 9: 128.
35. Y. Yang, A. Fu, X. Wu, J.D. Reagan, GPR35 is a target of the loop diuretic drugs bumetanide and furosemide, *Pharmacology* 89 (2012) 13–17.
36. Hebert S.C., Mount D.B., Gamba G.: Molecular physiology of cation-coupled Cl⁻ cotransport: the SLC12 family. *Pflügers Arch* 2004, 447: 580–593.
37. Ye X., Tao Q., Wang Y., Cheng Y., Lotan R.: Mechanisms underlying the induction of the putative human tumor suppressor GPRC5A by retinoic acid. *Cancer Biol Ther* 2009, 8: 951–962.
38. Sriram K., Insel P.A.: G Protein-Coupled Receptors as Targets for Approved Drugs: How Many Targets and How Many Drugs?. *Mol Pharmacol* 2018, 93: 251–258.
39. Hutchings C.J., Koglin M., Olson W.C., Marshall F.H.: Opportunities for therapeutic antibodies directed at G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Drug Discov* 2017, 16: 661.
40. Fischer M.M., Cancilla B., Yeung V.P., Cattaruzza F., Chartier C., Murriel C.L., Cain J., Tam R., Cheng C.Y., Evans J.W., O'Young G., Song X., Lewicki J., Kapoun A.M., Gurney A., Yen W.C., Hoey T.: WNT antagonists exhibit unique combinatorial antitumor activity with taxanes by potentiating mitotic cell death. *Sci Adv* 2017, 3: e1700090.