СТРАТЕГИИ БЕЛКОВОГО ДИЗАЙНА ДЛЯ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ РЕЦЕПТОРОВ, СОПРЯЖЁННЫХ С G-БЕЛКОМ

©2023 г.

Д. А. ДМИТРИЕВА, Т. В. КОТОВА, Н. А. САФРОНОВА, А. А. САДОВА, Д. Е. ДАШЕВСКИЙ, А. В. МИШИН

Центр исследований молекулярных механизмов старения и возрастных заболеваний, Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), г. Долгопрудный, Московская область.

I. Введение. II. Создание генетических конструкций. III. Экспрессионные системы, используемые для получения GPCR. IV. Очистка и стабилизация рецепторов. V. Характеризация и контроль качества полученных белковых препаратов. VI. Формирование комплексов рецепторов с основными партнёрами взаимодействия. VII. Заключение.

І. ВВЕДЕНИЕ

Амфифильная природа и низкая стабильность являются неотъемлемыми характеристиками одного из важнейших для фармакологии класса мембранных белков — рецепторов, сопряженных с G-белками (GPCR). GPCR — это рецепторы, состоящие из семи трансмембранных спиралей и экспрессирующиеся на плазматической мембране клеток. GPCR — это наиболее распространенное семейство белков в протеоме

Принятые сокращения: GPCR — рецепторы, сопряжённые с G-белком; LCP — липидная кубическая фаза; ПТМ — посттрансляционные модификации (ПТМ); BRIL — термостабилизированный апоцитохром b562; GPCRdb — база данных содержащая информацию о современных исследованиях GPCR (https://gpcrdb. org/); GRK — киназы рецепторов, связанных с G-белками; MBP — мальтоза-связывающий белок; Nb — нанотело; ГТФ — гуанидинтрифосфат, ГДФ — гуанидиндифосфат.

Адрес для корреспонденции: mishinalexey@phystech.edu, Мишин Алексей Викторович.

Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда № 22-74-10036, https://rscf.ru/project/22-74-10036.

человека, которые распознают большой спектр внеклеточных сигнальных молекул и передают сигналы внутрь клеток, вызывая различные типы клеточных ответов. GPCR играют первостепенную роль во многих важных физиологических функциях в организме человека, таких как зрение, восприятие вкуса, запаха, регуляция деятельности нервной, иммунной и сердечно-сосудистой систем, поддержание гомеостаза и необходимой плотности клеток в ткани. Дисфункции этих процессов приводят к серьёзным заболеваниям, которые могут быть скорректированы путём воздействия на соответствующие рецепторы блокирующим или активирующим образом. До 40% современных лекарственных средств действуют именно на GPCR [1, 2]. Для определения молекулярного механизма функционирования данных рецепторов, а также для разработки высокоэффективных препаратов с минимальными побочными воздействиями, необходимо знать структуру рецепторов с высоким разрешением в различных функциональных состояниях. Разработка лекарств на основе структуры может радикально сократить время и финансовые затраты на разработку новых медицинских продуктов [3]. Изучение рецепторов GPCR имеет важнейшее значение как для фундаментальной науки, так и для медицины и фармакологии.

Основными современными методами для определения структур белков с высоким разрешением являются рентгеноструктурный анализ [4], криоэлектронная микроскопия [5], микроэлектронная дифракция [6] и биомолекулярная спектроскопия ядерного магнитного резонанса [7].

Структурно-функциональные исследования GPCR требуют получения гомогенных стабилизированных препаратов белков. Экспрессия, выделение и очистка стабильного и мономерного рецептора — это самостоятельная многоуровневая научная задача по созданию стратегии белковой инженерии.

В настоящем обзоре мы систематизируем подходы, которые оказались наиболее успешными для получения структур GPCR и их комплексов, включающие рациональный дизайн генетических модификаций (рациональное предсказание необходимых точечных мутаций, делеций, тагов, фьюжн-белков), подбор оптимальных систем экспрессии, стратегий очистки и стабилизации белка, включая использование различных мембрано-моделирующих сред, антител и их фрагментов, лигандов, а также основные подходы к характеризации и контролю качества получаемого белка.

II. СОЗДАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ

ВВЕДЕНИЕ ТОЧЕЧНЫХ МУТАЦИЙ

В большинстве случаев в конструкцию рецептора вводятся точечные мутации, способствующие повышению уровня экспрессии, гомогенности и термостабильности рецептора, и, в некоторых случаях, направленные на удаление нежелательных посттрансляционных модификаций. Так, для ряда рецепторов показано, что разумно спланированные аминокислотные замены в аллостерическом сайте связывания натрия для GPCR класса А могут приводить к повышению экспрессии [8], снижению конформационной гетерогенности путем стабилизации рецептора в состояниях, предпочтительных для связывания с антагонистом [9], агонистом или в промежуточных [10]. Кроме того, такие модификации применили и в рецепторах класса В [11].

Посттрансляционные модификации (ПТМ) могут негативно влиять на однородность препарата белка при кристаллизации. Для устранения негативного влияния ПТМ для некоторых рецепторов проводились аминокислотные замены с целью изменения функциональной боковой группы. Так, N-гликозилирование является наиболее распространенной ПТМ среди GPCR, и сайт данной модификации неоднократно удалялся [12–15]. Однако, в большинстве случаев, ПТМ являются функционально значимыми, влияющими на экспрессию и фолдинг белка, а также, в некоторых случаях, и на способность рецептора связывать лиганды, поэтому применение такого подхода привело к снижению поверхностной экспрессии белка у многих GPCR [16].

Другим рациональным подходом к введению точечных мутаций является введение в конструкцию цистеиновых мостиков. Как известно, дисульфидные связи в белках непосредственно влияют на их фолдинг и стабильность [17–19]. Для некоторых GPCR введение точечных мутаций, приводящих к образованию дисульфидных связей между двумя близкорасположенными остатками цистеина, оказалось вполне успешным. Например, в молекулу родопсина вводилась дисульфидная связь между N-концом рецептора и третьей внеклеточной петлей (ECL3). Данная модификация привела к повышению термостабильности рецептора на 10 °C [20] в форме как апопротеина опсина [21], так и в комплексе с ретиналем [20] в растворе детергента. Этот прием не оказал значительного влияния на функционирование рецептора [20–22]. В другом примере местоположение вводимых дисульфидных связей определяли с помощью предсказательного алгоритма [23] для рецептора LPA1. Формирование дисульфидной связи между внешними сторонами трансмембранных доменов 5 и 6,

привело к повышению термостабильности рецептора LPA1 на 5 °C в присутствии лиганда [24]. Образование дисульфидной связи между трансмембранными спиралями 5 и 6 у GLP-1 рецептора привело к стабилизации его неактивной конформации [25].

Несмотря на имеющиеся представления о механизме стабилизации рецепторов, точное предсказание точечных мутаций, которые приведут к желаемым эффектам, остается сложной задачей. Некоторые подходы, облегчающие ее решение, представлены ниже.

АЛАНИНОВОЕ СКАНИРОВАНИЕ И STAR(™) ТЕХНОЛОГИЯ

Аланиновое сканирование представляет собой метод последовательного сайт-направленного мутагенеза, который используется для определения отдельных аминокислотных остатков, влияющих на стабильность или функцию исследуемого белка. В аланине присутствует лишь бета-углеродный атом боковой цепи [26], благодаря чему эта аминокислота компактна, а значит, может послужить заменой практически любому другому остатку без стерических затруднений. В то же время, в отличие от компактных глицина и пролина, аланин способствует сохранению конформации основной цепи [27]. Кроме того, показано, что остатки аланина склонны к образованию альфаспиралей, которыми богаты мембранные белки [28]. Благодаря этим свойствам именно аланин является предпочтительным замещающим остатком при поиске функциональных аминокислотных остатков в рецепторе.

При проведении аланинового сканирования все аминокислотные остатки поочередно заменяются на аланин, а исходный аланин чаще всего на лейцин [29, 30], реже на другие аминокислоты [31]. В результате проводится экспериментальная оценка стабильности полученных мутантов и отбираются наилучшие мутации. Аланиновое сканирование было применено не только для создания более стабильных рецепторов, но и для выявления аминокислот, участвующих в передаче сигнала [32].

Как правило, аланиновое сканирование не проводится на диком типе рецептора. Отправной точкой служит модифицированная конструкция, например, с удалёнными гибкими N- и C- концевыми доменами. Такие делеции могут приводить к повышению экспрессии, снижению протеолитического расщепления концевых участков рецептора [29, 30, 33].

Хотя аланин и лейцин являются хорошим подспорьем в поиске стабилизирующих позиций в качестве начальных мутаций, введение других аминокислотных замен привело к более оптимальным стабилизированным вариантам рецепторов [29, 30].

Stabilized ReceptorTM (StaRTM) технология заключается в создании термостабильных рецепторов путём введения точечных мутаций в его структуру. Повышение термостабильности происходит за счет стабилизации белка в любой из конформаций, существующих в природе: от основного состояния до полностью активного состояния, связывающегося с G-белком. Выбор состояния определяется типом лиганда (агонист, антагонист, обратный агонист), который используется в экспериментах. Таким образом, при выборе конформации, связывающей агонист, данный рецептор будет иметь высокое сродство к другим агонистам и наоборот. Например, для рецептора аденозина A2a созданы конструкции с повышенным сродством как к агонисту, так и к антагонисту [30].

Технология создания генетической конструкции основана по сути своей на аланиновом сканировании. Все мутанты с одиночными точечными заменами экспрессируются, и сравнивается способность мутантов и белка дикого типа связывать радиоактивно-меченый лиганд при повышении температуры [34]. На следующих этапах удачные точечные мутации, повышающие термостабильность комплекса лиганд-рецептор, последовательно комбинируются друг с другом до достижения максимально возможной температуры плавления [35].

Первой кристаллизационной структурой, полученной с помощью $StaR^{TM}$ - технологии была структура $\beta1$ -адренергического рецептора индейки [29]. В данной работе проводилось не только аланиновое сканирование, но и замены, сделанные на основе выравнивания с аминокислотной последовательностью бычьего родопсина, на тот момент единственного GPCR с известной структурой.

Из-за огромного количества мутантов (более 300), каждый из которых необходимо проверять на термостабильность, на создание StaRTM-конструкции требуются месяцы кропотливой работы. Однако это не мешает этому методу оставаться актуальным по сей день для получения кристаллизационных конструкций [20, 36–48].

НАПРАВЛЕННАЯ ЭВОЛЮЦИЯ

Направленная эволюция может помочь в поиске и отборе функционально экспрессирующихся рецепторов, для получения которых не удалось подобрать оптимальных условий в стандартно использующихся экспрессионных системах в клетках насекомых и млекопитающих.

Для направленной эволюции GPCR применяются общие подходы: наработка библиотеки мутантных вариантов гена, кодирующего рецептор; выявление вариантов рецептора, подвергнутых давлению отбора, с повышенной функциональной экспрессией, подтверждаемой связыванием со специфическим лигандом; последующие раунды

эволюции и селекции для выявления наиболее предпочтительного варианта [49]. Стоит учитывать, что для всех описываемых в данном разделе методов необходимо наличие специфических лигандов к исследуемым рецепторам.

Первоначально библиотеки мутантных генов GPCR анализировали в клетках Escherichia coli – наиболее удобном и простом для генетических манипуляций объекте. Пермеабилизация внешней мембраны клеток $E.\ coli\$ сделала рецепторы, экспрессируемые на внутренней мембране, доступными для меченых флуоресцентной меткой лигандов. После этого проводилась сортировка клеток, активируемая флуоресценцией (FACS). Это позволило единовременно проводить скрининг большого количества мутантов рецептора, без необходимости экспрессировать каждый рецептор по отдельности. В результате нескольких раундов отбора были выявлены рецепторы с повышенной функциональной экспрессией не только в прокариотических, но и в эукариотических системах экспрессии [50]. Возникший позднее подход CHESS (клеточная высокопроизводительная инкапсуляция, солюбилизация и скрининг; cellular high-throughput encapsulation, solubilization and screening) позволил выявлять рецепторы с повышенной устойчивостью к детергентам. Это стало возможным благодаря инкапсуляции клеток E. coli полисахаридным матриксом, с последующем разрушением клеточных мембран и солюбилизации рецепторов детергентом. При этом крупные клеточные компоненты, включая исследуемый рецептор и плазмидную ДНК, оставались внутри капсулы. Дальнейшая инкубация полупроницаемых капсул с лигандом, меченым флуоресцентным красителем, и клеточный сортинг (FACS) позволили отбирать клоны с функциональными рецепторами в заданных условиях. Отсортированные гены подвергались дальнейшим раундам мутагенеза и селекции [51]. Методы направленной эволюции в клетках E. coli [51, 52] в комплексе с дополнительным модификациями позволили получить нейротензиновый рецептор NTR1, пригодный для структурных исследований [47].

Недостатками вышеописанных подходов является необходимость осуществления экспрессии функциональных рецепторов в клетках *E. coli*, что не всегда возможно для стартовых экспрессионных вариантов эукариотических мембранных белков.

Позднее появился метод SaBRE (Saccharomyces cerevisiae-based receptor evolution) [53], основанный на направленной эволюции в клетках дрожжей, который позволил проводить экспрессию большего набора GPCR в силу более обширных возможностей посттрансляционных механизмов. В результате применения подхода

потребовалось всего два раунда направленной эволюции в клетках *S. cerevisiae*, чтобы получить рецепторы с повышенной экспрессией, способные связывать лиганд. Мутации, отобранные методом SaBRE, привели к повышению экспрессии в клетках насекомых, а анализ термостабильности рецептора также выявил ее значительное повышение. Подход был применен при создании кристаллизационных конструкций окситоцинового рецептора [54], рецептора паратиреоидного гормона PTH1R [55], а также рецептора δ OP, в генетическую конструкцию которого были внесены 8 ключевых точечных мутаций, выявленных для родственного рецептора ν OP при применении данного подхода [56].

В недавнем времени лаборатория Андреаса Плюктуна скомбинировала несколько подходов направленной эволюции с целью проведения высокопроизводительного скрининга CHESS для окситоцинового рецептора, изначально токсичного для клеток $E.\ coli.$ В данном случае мутанты, отобранные методом SaBRE, послужили отправной точкой для следующих раундов эволюции в $E.\ coli.$ что позволило осуществить скрининг CHESS и выявить мутанты с повышенной функциональной экспрессией в $E.\ coli.$ Такой подход может оказаться полезным в исследованиях, где клетки $E.\ coli.$ являются наиболее предпочтительными [49].

Кроме того, недавно сообщалось о методе отбора рецепторов YDDS (Yeast Direct Detergent Screening), позволяющем выявить GPCR, устойчивые к короткоцепочечным детергентам при экспрессии в дрожжевых клетках [57].

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОДХОДОВ МАШИННОГО ОБУЧЕНИЯ ДЛЯ ПРЕДСКАЗАНИЯ ТОЧЕЧНЫХ МУТАЦИЙ: АЛГОРИТМ COMPOMUG

В настоящее время подходы с использованием систем искусственного интеллекта приводят к прорывам во многих областях науки и позволяют решать задачи, которые классические подходы решают с недостаточной эффективностью. Алгоритм CompoMug состоит из четырех модулей (модуль на основе анализа имеющихся данных, модуль на основе анализа последовательностей, модуль на основе структуры и модуль на основе машинного обучения), объединяющих несколько подходов для составления списка точечных мутаций-кандидатов, которые могут улучшить стабильность GPCR. Модули, основанные на данных и последовательностях, работают только с информацией о последовательности целевого рецептора, в то время как модули, основанные на структуре и машинном обучении, работают со структурной информацией. Результатом применения алгоритма является приоритетный список точечных мутаций (с указанием чисел,

полученных в рамках используемых в каждом модуле метрик оценки эффективности по внутренним критериям алгоритма), которые используются для проведения экспериментального тестирования и создания конструкции рецептора, позволяющей получить гомогенный стабильный белок для структурных исследований. Алгоритм CompoMug использует различные типы информации, чтобы учесть несколько аспектов, связанных со стабильностью GPCR, например, знание переносимых стабилизирующих мутаций между GPCR, эволюционную информацию на основе последовательностей (например, сохранение абсолютных и относительных положений аминокислот) и информацию о структуре (например, расстояния между контактами и энергии остатков). Вся информация кодируется численно, чтобы составить дескрипторы устойчивости GPCR. Алгоритмы машинного обучения применялись к дескрипторам, вычисленным для известных точечных мутаций, стабилизирующих GPCR, чтобы получить модель всестороннего предсказания. Метод был итеративно улучшен с накоплением данных о стабилизирующем эффекте точечных мутаций для новых GPCR, с учётом данных, обеспеченных экспериментальной обратной связью. Этот метод реализован с использованием современных алгоритмов машинного обучения и вычислительной биологии. Дистрибутив программы и описание доступны по адресу: CompoMug 2.0 https://gitlab.com/pp_lab/CompoMug. CompoMug предоставляет собой вычислительную платформу для термостабилизации GPCR и может быть дополнительно усовершенствован с накоплением экспериментальных данных о мутациях [58].

ДЕЛЕЦИИ НЕУПОРЯДОЧЕННЫХ УЧАСТКОВ АМИНОКИСЛОТНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

Подвижные участки белков очень часто мешают кристаллизации и снижают качество получаемых данных. Наиболее подвижными у GPCR являются N- и C-концевые участки, поэтому их нередко подвергают частичному удалению, оставляя 10-20 аминокислотных остатков. Длинная N-концевая часть рецептора может содержать сайты гликозилирования, которые влияют на процессинг белка в цитоплазматической мембране, что влияет на его выход [59]. С-концевая часть белка также может влиять на экспрессию и последующую монодисперсность белка [60]. К сожалению, предсказать влияние удаления N- и C-концевого участка на уровень экспрессии рецептора невозможно, при этом стоит принять во внимание функционально значимые участки, такие как сайты гликозилирования и места взаимодействия с белками-партнёрами [61,62]. На практике имеет смысл проводить скрининг конструкций, последовательно удаляя по 1–5

аминокислот, экспериментально тестируя эффект.

У GPCR класса А третья внутриклеточная петля также является очень подвижной [63], и для улучшения кристаллизуемости её заменяют на фьюжн-белок, например термостабилизированный участок апоцитохрома (BRIL), флаводоксин, Т4-лизоцим, рубередоксин, гликогенсинтаза и др. [64] (см. раздел «Использование фьюжн партнёров»).

ВСТАВКИ ДОПОЛНИТЕЛЬНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ АМИНОКИСЛОТНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

Вставки в аминокислотную последовательность рецепторов вводятся для разных целей. Для увеличения экспрессии и выхода GPCR на поверхность клетки часто используют введение НА-тага (HA-tag) — остатков МКТПАLSYIFCLVFA [65, 66] основного поверхностного белка вируса гриппа, гемагглютинина. Будучи расположенным на N-конце белка, НА-tag, по-видимому, позволяет рецептору более эффективно встраиваться в эндоплазматический ретикулум и транслоцироваться на поверхность клеточной мембраны [65]. НА-таг подходит как для клеточной линии насекомых Sf9 [67], так и для клеточной линии человека HEK293 [66,68]. Кроме того, другой фрагмент последовательности гемагглютинина (YPYDVPDYA) используется в качестве эпитопной метки для иммуногистохимических исследований GPCR [69–71].

Для последующей очистки рецептора методом аффинной хроматографии в аминокислотную последовательность рецептора вводят специальные таги. На N-концевую часть рецептора помещают FLAG-таг (DYKDDDDK/A) и/или His-таг (5–10 остатков гистидина) [72]. His-таг также возможно помещать на C-концевую часть рецептора. Помещение FLAG-тага на C-концевую часть рецептора возможно, однако следует учитывать используемую впоследствии смолу для очистки рецептора. FLAG-таг и His-таг также используются для анализа измерения уровня экспрессии белка методами иммуноблоттинга и проточной цитофлуориметрии. При этом стоит учитывать, что топологически N- конец GPCR всегда находится вне клетки, и для мечения интактных клеток необходимо помещать FLAG-таг именно на него [73, 74].

Изредка используется введение белка, связывающего мальтозу (МВР, maltose-binding protein) [75]. Этот достаточно большой белок (42,5 кДа) может использоваться не только в качестве тага для аффинной хроматографии, но и в качестве хорошего фьюжн-партнера для повышения экспрессии GPCR в бактериальных клетках [29, 47, 76, 77].

Совместное использование МВР и тиоредоксина А (TrxA) в конструкции для рецептора нейротензина 1 (NTR1) позволило увеличить количество экспрессируемого в мембране *E. coli* белка и получить белковые кристаллы рецептора [47]. Глутатион S-трансфераза (glutathione *S*-transferase, GST) на N-конце рецептора хемокина СХСL8 (СХСR1) также позволила экпрессировать белок в достаточном для кристаллизации количестве, хоть и в тельцах включения [78]. Подробнее о фьюжн-партнерах и экспрессионных системах рассказывается в разделах «Использование фьюжн-партнеров» и «Экспрессионные системы, используемые для получения GPCR».

Для выделения GPCR можно вводить Strep-таг (Strep-tag) – небольшой пептид из 8 аминокислотных остатков (WSHPQFEK), который был случайно найден как пептид, специфически связывающийся со стрептаведином [79,80].

Методы аффинной хроматографии обсуждаются в разделе «Очистка и стабилизация рецепторов».

Поскольку полипептидные таги представляют собой неупорядоченные участки, их наличие в конструкции рецептора может затруднить получение пространственной структуры. Получить белок без тагов для очистки или повышения экспрессии позволяет использование высокоспецифичных протеаз. В структурных исследованиях GPCR используются TEV-протеаза и PreScission протеаза, которая является вариантом HRV 3C протеазы. Сайтом узнавания TEV (Tobacco Etch Virus) протеазы является последовательность ENLYFQ/S, где расщепление последовательности происходит между остатком глутамина и серина, однако на месте серина может находиться глицин, аланин, метионин, цистеин и гистидин. Сайтом узнавания для PreScission протеазы является LEVLFQ/GP, и гидролиз проходит строго между остатками глутамина и глицина, что делает эту протеазу более специфичной, чем TEV-протеаза.

В аминокислотную последовательность рекомбинантных GPCR между фьюжн-белками, тагами, сайтами узнавания протеаз и последовательностью рецептора иногда включают специальные линкеры — несколько аминокислотных остатков. Они влияют на доступ к эпитопам антител, к сайтам узнавания протеаз, подвижность получившейся конструкции [81].

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФЬЮЖН-ПАРТНЕРОВ

По своей природе GPCR являются динамическими белками, меняющими ряд конформаций в зависимости от сигнального состояния [82]. Также, будучи, интегральными мембранными белками, GPCR

обладают пониженным содержанием гидрофильных областей, необходимых для формирования кристаллизационных контактов. Эти особенности являются основными проблемами для получения кристаллов белка дифракционного качества [64].

Для повышения стабильности рецептора и вероятности образования кристаллизационных контактов рецепторов создаются химерные белки, состоящие из рецептора и белка-партнера. Белок-партнер должен отвечать ряду критериев: наличие структуры высокого разрешения, малый размер ($\sim 5-20~\rm kДa$), простота фолдинга, отсутствие посттрансляционных модификаций, гидрофильность молекулы [83], расстояние между N- и C-концами партнёра до 15 Å в случае вставки между трансмембранными доменами 5 и 6 [64].

Как правило, белок-партнер встраивают в третью внутриклеточную петлю (ICL3) [13, 84], поскольку она конформационно гетерогенна и соединяет наиболее подвижные трансмембранные домены 5 и 6, реже на N-конец рецептора [85]. Также возможна вставка партнерного белка и в другие части рецептора, например, в ICL2 [86] и на С-конец [87]. Кроме того, были успешные случаи использования нескольких партнерных белков одновременно [87, 88].

Ни один из известных белков-партнеров не обеспечивает универсального решения для кристаллизации GPCR. В связи с этим проводится тестирование нескольких партнерных белков для одного рецептора, с перебором позиций встраивания в целевую область. В большинстве случаев добавление белка-партнера используется в комбинации со стабилизирующими точечными мутациями рецептора. Наиболее частые белки, используемые в качестве партнеров кристаллизации (Рис.1), имеют различные элементы вторичной структуры: от практически полностью состоящей из петель (рубредоксин (Rub)), β-листов (ксиланаза), α-спиралей (С-концевой фрагмент Т4 лизоцима (СtermT4L) и его модификации (mT4L), термостабилизированный апоцитохром b562 (BRIL)), до комбинации всех этих элементов (флаводоксин (Fla), каталитический домен гликоген-синтазы из *Pyrococcus abyssi* (PGS)) [64, 89].

Первые структуры GPCR были получены с T4L, хорошо сворачиваемым и легко кристаллизующимся белком, в варьируемых условиях. В настоящее время чаще используется BRIL. В отличие от T4L, BRIL обеспечивает более жесткую фиксацию трансмембранных спиралей 5 и 6, за счет их плавного перехода в α -спирали BRIL. На сегодняшний день рекорд разрешения для структуры GPCR, полученной путем рентгеновской кристаллографии – 1,7 Å (структура 5NM4 в PDB), был сделан с партнером BRIL и с использованием введения термостабилизирующих точечных мутаций.

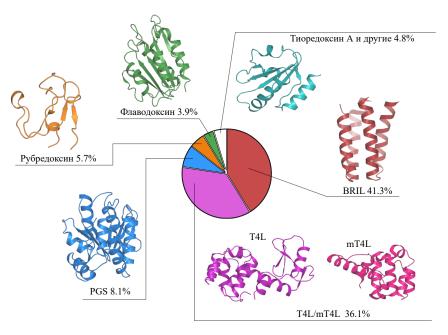


Рис. 1. Наиболее распространенные партнёрные фьюжн-белки.

Изображения взяты из базы PDB из структур GPCR с каждым из этих белков-партнеров: рубредоксин – 4MBS; тиоредоксин А – 6IBL; mT4L – 4U16; T4L-2RH1; BRIL – 5NM4; флаводоксин – 5TGZ; PGS – 5U09.

Круговая диаграмма отражает частоту использования партнёрных фьюжн белков.

Партнерные белки TrxA и MBP используются, в основном, для увеличения экспрессии при наработке GPCR в клетках *E. coli*. Также TrxA использовался для повышения уровня экспрессии в бесклеточной системе трансляции [90]. В большинстве случаев, оба партнёрных белка отрезаются при очистке [47, 87, 91]. Однако возможно слияние с белками-партнёрами для повышения успешности криоэлектронной микроскопии. Например, TrxA добавлялся на N-конец рецептора для увеличения молекулярной массы комплекса и не вносил значительного вклада в фармакологию рецептора A2AR [92, 93].

Использование альтернативных белков-партнеров привело к увеличению числа успешных кристаллизаций и опубликованных структур. Например, в недавнем времени была показана эффективность использования белка DARPin D12 [94], слитого с седьмой трансмембранной спиралью рецептора. Этот партнёрный белок

использовался при кристаллизации нейротензинового (NTSR1) и альфа-адренергического $\alpha_{1B}AR$ рецепторов [95, 96], полученных при экспрессии в $E.\ coli.$ DARPin D12 представляет собой компактный белок, содержащий мотив анкириновых повторов, формирующих конформацию «спираль—поворот—спираль», которые опосредуют межбелковые взаимодействия [97]. Показано, что сила белок—белковых взаимодействий DARPin достаточна для образования кристаллических контактов в разных условиях [98].

III. ЭКСПРЕССИОННЫЕ СИСТЕМЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ GPCR

В естественных условиях только фоточувствительный рецептор родопсин экспрессируется с высокой плотностью в клеточных мембранах [99]. Поэтому его удалось выделить из нативных дисков наружного сегмента клеток-палочек сетчатки глаза быка (*Bos taurus*) [100]. Родопсин был выделен в количествах, достаточных для получения кристаллов, что привело к появлению первой решенной путем рентгеноструктурного анализа трехмерной структуры GPCR в 2000 году [101]. Позднее была решена и структура родопсина из нативной сетчатки кальмара (Todarodes pacificus) [102]. Однако в подавляющем большинстве представители суперсемейства GPCR экспрессируются в мембранах клеток в чрезвычайно малых количествах, поэтому их прямое выделение из естественных тканей нецелесообразно и технически затруднено. Кроме того, для получения кристаллов высокого качества для большей части рецепторов требуется внесение модификаций в их аминокислотные последовательности, которые невозможно получить при выделении рецепторов из природных источников. Таким образом, одной из ключевых проблем в структурной биологии GPCR является получение достаточных количеств белка для его характеризации и дальнейших структурных исследований.

Экспрессионные стратегии направлены на увеличение выхода рецептора в количествах, близких к миллиграммовым, и предпочтительным методом получения GPCR является гетерологичная экспрессия. Как и для большинства белков, для структурных исследований GPCR проводились попытки экспрессии в различных системах, таких как бактериальные, дрожжевые, клеточные культуры насекомых, млекопитающих. Также тестировались бесклеточные системы экспрессии.

БАКТЕРИАЛЬНЫЕ СИСТЕМЫ ЭКСПРЕССИИ

Кишечная палочка (E. coli) как бактериальная система экспрессии является глубоко изученной, экономически выгодной, а также хорошо себя зарекомендовала в качестве продуцентов множества рекомбинантных белков, в том числе и для структурных исследований. Однако большого распространения данная экспрессионная система для продукции GPCR не получила. Одними из причин могут являться: значительные различия в липидном составе прокариотических и эукариотических мембран, являющихся важными регуляторами функции рецепторов; отсутствие развитой машинерии фолдинга и процессинга белка (включающей работу различных белковых комплексов); невозможность обеспечения большинством посттрансляционных модификаций, присущим мембранным белкам млекопитающих, что приводит к нарушениям фолдинга и функционирования экспрессируемых мембранных белков [103]. Модификации GPCR включают в себя гликозилирование, пальмитоилирование, фосфорилирование и др., и играют роль в правильном фолдинге рецепторов и их внутриклеточной транспортировке [16]. Кроме того, гиперэкспрессия белков в бактериальных клетках часто приводит к формированию нерастворимых агрегатов – телец включения [104]. Что само по себе не обязательно является недостатком, поскольку белок в тельцах включения является достаточно чистым, а также защищен от действия клеточных протеаз. Тем не менее, получение белка из телец включения требует больших усилий по подбору условий для in vitro рефолдинга белка и не всегда оборачивается успехом. Также восстановительный характер цитоплазмы клеток кишечной палочки не является оптимальным для образования дисульфидных связей. Несмотря на ограниченность экспрессии эукариотических мембранных белков в клетках E. coli, применялось множество попыток обойти эти препятствия, например при помощи использования белков-партнеров, направляющих экспрессию в цитоплазматическую мембрану.

Несмотря на недостатки бактериальной системы экспрессии, попытки экспрессии в ней GPCR неоднократно проводились, и даже была получена кристаллическая структура нейротензинового рецептора в 2014 году [47]. N-конец рецептора был слит с МВР для обеспечения высокого уровня экспрессии, а также с тиоредоксином TrxA на C-конце белка. Кроме того, чтобы получить такую структуру, потребовалось введения множественных мутаций в молекулу белка, что повлияло на его функционирование, не подтверждаемое в статье, где рецептор получали из клеток насекомых [44].

ЭКСПРЕССИЯ В КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЕ ДРОЖЖЕЙ

Экспрессии в клетках дрожжей объединяет достоинства, присущие бактериальной экспрессии (низкая цена реактивов, простота генетических манипуляций, быстрый прирост биомассы) с возможностью сохранения части посттрансляционных модификаций [105]. Штаммы *Pichia pastoris* (*Pichia*) и *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) являются хорошо охарактеризованными с генетической точки зрения. Экспрессия в *Pichia* является более подходящей [106], поскольку показала многократно превышающие выходы биомассы, при тех же объемах культуры, чем в *S. cerevisiae* (10–100 раз) [107]. Штаммы клеток *Pichia* зарекомендовали себя в качестве продуцентов рекомбинантных мембранных белков, включая GPCR [108–111].

Недостатками системы являются сложности при разрушении клеток из-за высокой прочности дрожжевых клеточных стенок, а также отличный от клеток млекопитающих процесс гликозилирования [107].

ЭКСПРЕССИЯ В КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУРАХ НАСЕКОМЫХ

Экспрессия в клетках насекомых является наиболее востребованной при исследовании структур GPCR, поскольку экспрессируемые белки подвергаются большинству необходимых пострансляционных модификаций присущих клеткам млекопитающих. Несмотря на это, есть и особенности, например, продуктом N-гликозилирования в клетках насекомых является образование простых неразветвленных гликопротеинов, в отличие от клеток млекопитающих, где образуются сложные гликопротеины с разветвленными сахарными группами (Рис.2.) [112–114].

Кроме того, температурные условия культивирования клеток насекомых и клеток млекопитающих отличаются, что может сказываться на составе мембран клеток. Мембраны клеток насекомых обладают сниженным содержанием холестерина, повышенным содержанием фосфатидилинозитола, отсутствием фосфатидилсерина [115]. Такие отличия могут приводить к более низким выходам целевого рецептора. Тем не менее, существует возможность обогащения питательной среды необходимыми липидами, что приводит к повышению экспрессии ряда рецепторов, например, β_1 -адренергического рецептора индейки [116] и человеческого дофаминового D3 рецептора [117].

Несмотря на вышеописанные особенности, экспрессия в клетках насекомых даёт функциональные белки, пригодные для структурных исследований.

Наибольшее количество белков с решенными структурами было получено в клетках насекомых *Spodoptera frugiperda* (клеточные линии

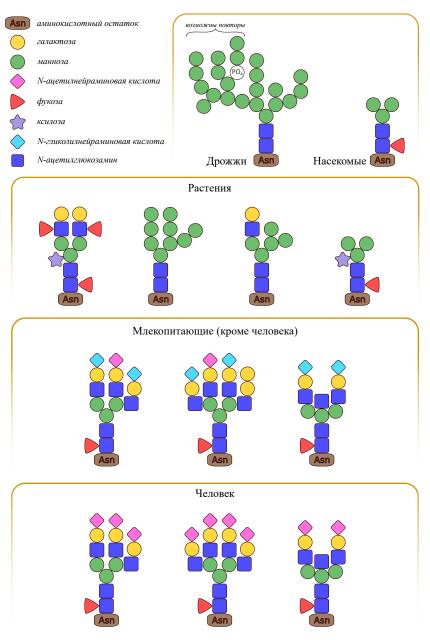


Рис. 2. Характерное строение олигосахаридов при N-гликозилировании белков в различных клетках, использующихся в экспрессионных системах. Изображение адаптировано [114].

Sf9 и Sf21). Меньшее количество в клетках *Trichoplusia ni* (клеточная линия Hi5). Предпочтительно тестировать уровни экспрессии белков на маленьких объемах культуры, потому что они могут значительно отличаться в разных клеточных линиях. В клеточной линии Hi5 в некоторых случаях повышалась экспрессия относительно других клеточных линий, например для β_1 -адренергического рецептора индейки [116].

Для экспрессии в клетках насекомых чаще всего используют бакуловирусную систему. Суть метода заключается во встраивании экспрессионной кассеты с геном-мишенью путем сайт-специфической транспозиции в бакуловирусный челночный вектор (бакмиду) [118], нарабатываемый в клетках $E.\ coli.$ При последующей трансфекции рекомбинантной бакмиды в клетки насекомых, происходит наработка бакуловирусного потомства, которое далее используется для инфекции клеток с целью экспрессии интересующего белка.

К недостаткам метода относится относительная дороговизна среды для культивирования клеток; лизис клеток, возникающий в результате инфицирования клеток рекомбинантным бакуловирусом, что может приводить к протеолитической деградации целевого белка; отличный от млекопитающих профиль гликозилирования нарабатываемых белков. Достоинствами метода является его простота, высокие выходы продукта при ведении культуры в суспензии, бессывороточная среда для культивирования, возможность наработки мембранных белков с корректным фолдингом после оптимизации [119]. Весь процесс от наработки бакмиды до экспрессии белка в среднем занимает около 3 недель.

ЭКСПРЕССИЯ В КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУРАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Экспрессия в клетках млекопитающих обеспечивает наиболее нативное окружение в случае наработки человеческих рецепторов. Благодаря правильной сборке и механизмам обеспечения посттрансляционных модификаций человеческих белков экспрессия в клетках млекопитающих широко используется в молекулярной биологии. Клетки НЕК293 (клетки почки человеческого эмбриона) и СНО (клетки яичников китайских хомячков) наиболее изучены и популярны при исследованиях GPCR. Ограничениями для наработки белков в клетках млекопитающих являются дорогостоящие питательные среды для культивирования и антибиотики, длительные этапы отбора наилучших клеточных линий в случае обеспечения стабильной экспрессии, направленной на повышении выхода целевого белка [120]. В связи с этим, данная система наиболее востребована при

проведении функциональных тестов рецепторов [121, 122], направленных на функциональный анализ передачи сигнала, когда не требуются высокие уровни экспрессии. А также если в других системах, например, в клетках насекомых не удалось наработать функциональный белок либо получить достаточный выход [123, 124].

БЕСКЛЕТОЧНЫЕ СИСТЕМЫ ЭКСПРЕССИИ

Бесклеточный белковый синтез (Cell-free protein synthesis, CFPS) основан на экспрессии белка *in vitro* при использовании клеточных экстрактов, обеспечивающих возможность осуществления транскрипции и трансляции [125] либо только трансляции [126, 127]. Такие системы включают в себя высокомолекулярные компоненты, такие как рибосомы, ДНК-матрицы или матричную РНК [126], ферменты, а также необходимые субстраты, такие как аминокислоты, нуклеозидтрифосфаты (NTPs) и источники энергии [128]. Для экспрессии мембранных белков в растворимой форме в систему добавляют мембрано-имитирующие компоненты, например, детергенты, формирующие мицеллы, липосомы, нанодиски [129, 130]. Кроме того, возможна экспрессия и без добавления мембрано-имитирующих компонентов [129]. Это приводит к нерастворимой экспрессии и часто к более высоким выходам рекомбинантного белка [131]. Однако требуется последующая солюбилизация, что может негативно повлиять на характеристики белка [130].

Бесклеточная система обладает преимуществами перед клеточными благодаря возможности синтеза токсичных для клеток белков [90, 132, 133]. Открытость системы позволяет жестко контролировать компоненты реакции [127] и адаптировать среду путём добавления различных добавок для наработки конкретного белка-мишени [130]. Кроме того, бесклеточные системы экспрессии позволяют включать нестандартные аминокислоты в нарабатываемый белок, чтобы придать ему новые свойства [132]. Возможности мечения включаемых в последовательность белка аминокислот является перспективой для использования такого синтеза для ЯМР характеризации белков [131, 132]. После экспрессии можно сразу приступать к аффинной очистке [133, 134], в отличие от клеточных систем, где требуются этапы разрушения клеток и солюбилизации мембран для выделения мембранных белков [135]. Благодаря возможности экспрессии в малых объемах можно отслеживать результат оптимизации условий с помощью высокопроизводительного скрининга на планшетном ридере [131, 136].

Состав клеточных экстрактов может варьироваться в зависимости от центробежной силы, используемой при фракционировании кле-

точных компонентов [134]. Наиболее часто используемым клеточным экстрактом для синтеза рекомбинантных белков является экстракт из $E.\ coli$, который является рентабельным, простым в обращении и обеспечивает высокие выходы белка в мг/мл [134, 135]. Однако при выборе источника клеточного экстракта стоит отталкиваться от требуемого выхода белка, а также способности системы обеспечить правильную укладку белка и предоставить базу для обеспечения необходимыми ПТМ [137]. Например, экстракты на основе эукариотических клеток, включающих в себя клетки насекомых [138, 139], ретикулоцитов кролика [140] и яичников китайского хомяка [141], способны к гликозилированию. Кроме того, для экстракта из E. coli были показаны возможности оптимизации, включающие добавление шаперонов, стабилизаторов и окислительно-восстановительных агентов, способствующих правильному фолдингу эукариотических белков [142–145]. Также были получены штаммы $E.\ coli$, контролирующие некоторые типы гликозилирования [146–148]. При выборе системы немаловажными факторами являются простота работы с системой и её стоимость.

Было проведено множество попыток экспрессии рецепторов GPCR в бесклеточных системах, и даже показана сходная аффинность связывания лигандов по сравнению с рецепторами, экспрессированными в клеточных системах [149–154]. Кроме того, была показана возможность получения антител, чувствительных к конформации белка для GPCR из классов A и C, экспрессированных в экстракте зародышей пшеницы [155]. Тем не менее нефункциональные рецепторы остаются значительной частью синтезируемой популяции [154], ведь даже условия, близкие к оптимальным, могут повлиять на формирование функционального белка [129].

Видимо поэтому существует только несколько рентгеновских структур мембранных белков, полученных в бесклеточных системах экспрессии [135, 156, 157].

Несмотря на преимущества бесклеточных систем синтеза белков, основанных на клеточных экстрактах, данная система не получила широкой популярности для исследований GPCR. Требуется еще много усилий для оптимизации экспрессии функциональных GPCR.

IV. ОЧИСТКА И СТАБИЛИЗАЦИЯ РЕЦЕПТОРОВ

GPCR остаются сложными мишенями для структурных исследований в силу их низкой стабильности, амфифильной природы, а также конформационной подвижности, за счет которой обеспечивается передача

сигналов внутрь клетки. Для стабилизации рецепторов и снижения конформационной изменчивости добавляют высокоаффинные лиганды или фрагменты антител.

МЕТОДЫ ОЧИСТКИ БЕЛКОВЫХ ПРЕПАРАТОВ GPCR

Выделение и очистка GPCR является сложным и многоступенчатым процессом, в котором очень часто сочетаются несколько методов очистки. Среди них гель-фильтрация, ионообменная хроматография, аффинная хроматография, иммуноаффинная хроматография.

В очистке рекомбинантных белков большую роль играет аффинная хроматография. Этот метод основан на специфическом взаимодействии белка-мишени с лигандом, связанным на неподвижной фазе. Здесь мы рассмотрим разнообразие лигандов, используемых при очистке GPCR.

Металл-хелатная аффинная хроматография

Суть данного метода заключается во взаимодействии иммобилизованного иона металла со свободными электронодонорными группами боковых цепей аминокислот. В качестве неподвижной фазы чаще всего выступают смолы с иммобилизованными ионами Ni^{2+} , Co^{2+} , а в N- или C-концевую аминокислотную последовательность рецептора вводят His-таг, состоящий из 5-10 остатков гистидина. Имидазольные кольца His-тага связываются с хелатированными ионами двухвалентных металлов. Это позволяет отделить целевой белок от остальных компонентов клеточного лизата, даже с учетом использования детергентов для растворения GPCR. Считается, что смолы, содержащие иммобилизованные ионы кобальта, обладают меньшей способностью связывать белок, чем смолы с ионами никеля, но большей специфичностью [158]. Чистота образца определяет предпочтительность Co^{2+} содержащих смол для очистки GPCR.

В качестве первой ступени очистки GPCR изредка применяются методы, отличные от металл-аффинной хроматографии. Иногда можно использовать белок-белковое взаимодействие, например, иммобилизованный Strep-Tacin избирательно связывает Strep-таг в аминокислотной последовательности рецептора [80, 159, 160]. Также можно воспользоваться смолами на основе амилозы для очистки белков, меченных MBP-тагом [75, 161, 162].

На основе белок-белкового взаимодействия разработана <u>иммуноаффинная хроматография</u>. Очень часто вторым [163, 164], или даже первым [165,166] шагом выделения GPCR используется хроматография с анти-FLAG антителами [72]. Сейчас коммерчески доступны

кальций-зависимые антитела М1 [73], кальций-независимые антитела М2 [167], М5 [168] и L5 [169] и другие антитела, однако агарозные аффинные смолы производятся только с использованием М1 и М2 анти-FLAG антител. Использование иммобилизованных М1 антител требует N-концевого расположения FLAG-тага, а М2 антитела связываются как с N- концевым, так и с С-концевым FLAG-тагом, однако М1 FLAG аффинная хроматография более предпочтительна [170].

В работах по изучению родопсина используется особая смола с 1D4 антителами, специфично связывающими С-концевой участок родопсина TETSQVAPA [171, 172]. Эту последовательность можно использовать для очистки рекомбинантных GPCR [173]. Ещё один таг, который возможно использовать для иммуноаффинной хроматографии GPCR это протеин C, связывающийся со специфичными анти-протеин C антителами, иммобилизованными на агарозе [12].

Лигандная хроматография

Строго говоря, предыдущие методы также являются лигандной хроматографией, так как используется биоспецифическое взаимодействие белка с иммобилизованными лигандами. В данном случае мы поговорим о том виде аффинной хроматографии, что не требует введения специальных тагов в аминокислотную последовательность рецепторов. Лиганд, специфичный к исследуемому рецептору, сшивается с инертным носителем, таким образом позволяет отделять функциональные рецепторы, связывающиеся с лигандом, от нефункциональных [72]. Наиболее известной является алпренолол-аффинная хроматография. Алпренолол – это неселективный бета-блокатор и антагонист 5-НТ1а и 5-НТ1в рецепторов [174]. Алпренолол-связанную смолу используют для очистки β1-адренергических рецепторов [12, 175–178], причем методы хроматографии комбинируются, если необходимо избавляться от алпренолола [179, 180]. Также лиганд-иммобилизованную смолу использовали для очистки М2 мускаринового рецептора, в котором не было тагов для аффинной хроматографии [181].

Финальным этапом очистки комплексов рекомбинантных белков с GPCR может стать аффинная хроматография на основе иммобилизованных лектинов [12]. Конканавалин А (ConA) это белок, высокоспецифично связывающий α-D-маннозный и α-D-глюкозный остатки сахаров. Таким образом, связываются только мембранные белки, которым свойственно гликозилирование [59].

Ионообменная хроматография

Ионообменная хроматография не используется для очистки GPCR так часто, как аффинная. Суть ионообменной хроматографии заключается в электростатическом взаимодействии заряженных боковых групп аминокислотных остатков с противоположно заряженными группами неподвижной фазы. Прочность связывания пропорциональна общему заряду белка. Иногда ионнообменная хроматография используется как для выделения самих GPCR [47, 182], так и для выделения G-белков, нанотел, антител [180, 183] и других белков, используемых в работе с GPCR [184].

Гель-фильтрация или эксклюзионная хроматография (size-exclusion chromatography, SEC)

Гель-фильтрация — это метод разделения белков по размеру и форме, однако для глобулярных белков от массы молекулы прямо зависит размер молекулы, поэтому в этом случае говорят о разделении белков по массе [185]. Кросс-сшитые молекулы декстрана упакованы в шарики и служат молекулярным ситом, в порах которого задерживаются более мелкие молекулы, а более крупные не заходят в поры и проходят гораздо быстрее [186]. Подробнее о методе в разделе «Характеризация и контроль качества полученных белковых препаратов».

Препаративная гель-фильтрация редко используется для финальной очистки рецепторов перед кристаллизацией [20], однако практически всегда используется для выделения больших комплексов GPCR с G-белками, антителами и др. [161, 184, 187–189].

МЕМБРАНО-МОДЕЛИРУЮЩИЕ СИСТЕМЫ (ПЛЮСЫ И МИНУСЫ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ДЛЯ GPCR)

Каждый GPCR в клеточных мембранах создает вокруг себя уникальное физико-химическое окружение, необходимое ему для функционирования. Корректный фолдинг, взаимодействие с лигандами и передача сигнала GPCR зависят от толщины и кривизны мембраны, ее липидного состава, электростатического напряжения, давления со стороны мембраны на рецептор. При подборе мембрано моделирующей системы (ММС) стоит принимать во внимание эти факторы [190]. В дальнейшем мы рассмотрим наиболее популярные виды ММС, используемые в структурно-функциональных исследованиях GPCR.

Мицеллы из детергентов

Молекулы детергентов — амфифильные молекулы, состоящие из гидрофильной «головы» и гидрофобного «хвоста». При добавлении детергента в раствор, содержащий мембраны с GPCR, молекулы детергента замещают липиды из мембраны и формируют мицеллу вокруг белка (Рис. 3A). Происходящая делипидизация является основной причиной дестабилизации и инактивации GPCR [191].

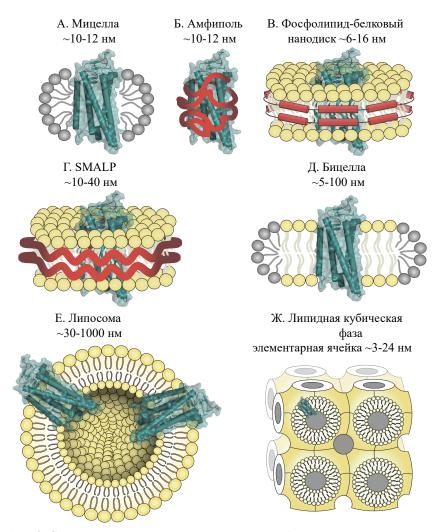


Рис. 3. Схематичное представление основных мембрано-моделирующих сред.

Молекулы детергентов являются более подвижными, чем липиды, что означает, что геометрия мицеллы нестабильна — белок может определять толщину и форму гидрофобной части мицеллы и занимать нефизиологические конформации [192]. Поэтому для изучения GPCR в мицеллах часто необходимы стабилизирующие мутации. Детергенты также могут связываться с лигандами, G-белками и другими молекулами, затрудняя изучение взаимодействия рецептора с ними.

По заряду детергенты делят на неионные, ионные и цвиттерионные. Неионные детергенты (например, DDM (n-Dodecyl-β-D-Maltoside), CHS (cholesteryl hemisuccinate) и LMNG (Lauryl Maltose Neopentyl Glycol)) очень эффективны при солюбилизации [193]. Ионные детергенты (например, SDS (Sodium dodecyl sulfate)) обладают более жестким воздействием — они могут использоваться как для солюбилизации [194], так и для денатурации [195]. Цвиттерионные детергенты не так распространены, однако они позволяют получить температуру плавления GPCR близкую к белку в смеси DDM + CHS [196].

Разветвленные детергенты из-за своей структуры и более эффективной упаковки лучше стабилизируют GPCR. Разветвленный LMNG между двумя своими «головами» формирует водородную связь, делая рецептор менее подвижным. В случае неразветвленного DDM две его молекулы не образуют стабильных водородных связей, поэтому в такой мицелле рецептор более подвижен и поэтому лучше связывается с лигандами [197].

Детергенты характеризуются критической концентрацией мицеллообразования (ККМ) – минимальной концентрацией, при которой начинают образовываться устойчивые мицеллы. ККМ детергента зависит от температуры и свойств растворителя [198]. ККМ для разных детергентов может принимать достаточно широкий спектр значений: в воде ККМ DDM составляет 0,17 мM, а LMNG – 0,01 мM, то есть более чем в 15 раз меньше DDM. ККМ стоит учитывать при выборе детергента, в том числе и для проведения структурных исследований. Обычно для успешной солюбилизации детергент добавляется к белку в избытке, что приводит к наличию в растворе свободных молекул детергента или даже пустых мицелл [199]. Пустые мицеллы достигают таких размеров, что могут быть приняты за белки, что сильно осложняет анализ GPCR методом криоэлектронной микроскопии [200]. Свободный детергент также понижает соотношение сигнал/шум. При кристаллизации в LCP (см. ниже) свободный детергент может мешать образованию фазы [201]. Поэтому от свободного детергента нужно избавляться, что сложно сделать для детергентов с низкой ККМ традиционными способами, например, диализом или эксклюзионной хроматографией, поэтому

сейчас разрабатываются новые методы очистки раствора GPCR от свободного детергента [200]. Также можно добавить в образец детергент с очень высокой ККМ — он сформирует слой у границы раздела вода-воздух и предотвратит адсорбцию белка на ней [202, 203]. С другой стороны, в мицеллы из детергентов с меньшей ККМ, являющейся следствием более длинных гидрофобных «хвостов», рецепторы встраиваются более эффективно [204], что делает использование таких мицелл более привлекательным. Например, в мицеллах из LMNG были получены структуры модифицированного β2AR в комплексе с G-белком и бета-аррестином [205], A2AR в комплексе с G-белком [93], родопсина в комплексе с G-белком [206]. С уверенностью можно сказать, что не существует универсального рещептора и каждого эксперимента отдельно.

Включение GPCR в мицеллы детергентов на сегодняшний день является самым популярным способом их солюбилизации из-за простоты формирования, разнообразия детергентов и их относительно невысокой стоимости. Другие MMC, если не указано обратного, требуют предварительной солюбилизации в детергентные мицеллы, поэтому некоторые минусы мицелл, например необходимость дополнительной стабилизации мутациями, применимы и к ним.

Амфифильные полимеры

Амфифильные полимеры (amphipols, Apols, Puc. 3Б) являются достаточно длинными молекулами с чередующимися гидрофильными и гидрофобными участками. Масса амфифильного полимера может достигать 34 кДа [207]. Амфифильные полимеры имеют высокую аффинность к гидрофобной части белка и оборачиваются вокругнее, при этом концентрация свободных амфифильных полимеров в растворе очень мала. Амфифильные полимеры обладают гораздо более мягким воздействием, чем детергенты, и неэффективны в солюбилизации мембранных белков [208]. Возможность стабилизации GPCR биотинилированным амфифильным полимером была показана для родопсиноподобного рецептора GHSR [209].

Полимеры SMALPs

SMA (styrene maleic acid) – полимер из стироловой (гидрофобной) и малеиновой (гидрофильной) кислот (Рис. 3Г). Такой полимер может солюбилизировать рецептор прямо из мембраны, минуя стадию детергента: стироловая кислота проникает внутрь мембраны и фрагментирует ее, малеиновая кислота оказывается снаружи

получившейся частицы SMALP (styrene maleic acid lipid particle) [210]. Особенностью такой системы является то, что GPCR выделяется вместе с участком мембраны. С одной стороны, это позволяет изучать GPCR в присутствии нативных липидов и исследовать их влияние на его функционирование, но, с другой стороны, при использовании данной ММС теряется контроль за липидным окружением рецептора. С помощью SMALP был выделен β2AR из клеток HEK293T[211], а также было исследовано взаимодействие A2AR с лигандами [212].

Липид-белковые нанодиски

Липид-белковый нанодиск (Рис. 3В) — структура, состоящая из 2 молекул модифицированного аполипопротеина Аро-А1, антипараллельно обернутых вокруг липидного бислоя. Варьируя длину Аро-А1, можно получать нанодиски разного размера: 8—16 нм в диаметре. Нанодиски обладают большей стабильностью, чем мицеллы, и их структура более приближена к структуре мембраны [213]. Благодаря этому нанодиски позволяют исследовать взаимодействие GPCR с G-белками [214]. Технология нанодисков продолжает развиваться и появляются новые методы их сборки, например, ковалентная циркуляризация с помощью обработки сортазой [215] или использование особых структур ДНК (origami barrels) для получения нанодисков до 90 нм в диаметре [216].

Нанодиски SapNPs

Сапозины A, B, C и D— небольшие белки, состоящие из 4 альфа-спиралей и выполняющие в организме функцию метаболизма сфинголипидов [217]. Они могут образовывать дискообразные частицы в присутствии липидов [218] и, также как и SMALP, могут солюбилизировать белок непосредственно из мембраны. Сапозины связываются с липидами с разной специфичностью, сапозин A связывается с наибольшим числом липидов, поэтому нанодиски SapNP (saposin nanoparticles) чаще собираются на его основе. Белки в дисках из SapA оказываются более термостабильными, чем в детергентных мицеллах [219].

Бицеллы

Бицелла состоит из плоского бислоя из фосфолипидов и обрамляющего его детергента (Рис. 3Д). Наиболее популярные компоненты бицеллы — фосфолипид DMPC (1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) и детергент DHPC (1,2-dihexanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine), соотношение между этими компонентами определяет размер бицеллы [220]. Бицеллы могут быть использованы для изучения взаимодействия GPCR с G-белком и лигандом, как это было сделано для рецептора

Y2R [221]. Также бицеллы применяются в белковой кристаллизации [222, 223].

Липосомы

При высушивании липидов и их последующей регидратации они самоорганизуются в липосомы – малые бислойные везикулы (Рис. 3Е). Сформированные липосомы получаются мультиламеллярными и могут достигать 50 мкм в диаметре. Такие структуры обычно нежелательны, поэтому они дополнительно обрабатываются для получения униламеллярных липосом. Методы обработки липосом включают в себя экструзию, обработку ультразвуком и гомогенизирование [224, 225]. Липосомы позволяют исследовать мультикомпонентные системы и реконструировать целые сигнальные пути GPCR. Из всех перечисленных ММС липосомы наиболее приближены к клеточной мембране по физическим свойствам [226, 227].

Липидная кубическая фаза (LCP)

Липидная кубическая фаза (lipid cubic phase, LCP) представляет собой липидный бислой, самоорганизующийся при определенных условиях в бесконечную периодическую поверхность и разделяющий пространство на 2 непересекающиеся области (Рис. 3Ж). Данная фаза служит матрицей, состоящей из липидного бислоя, которая обеспечивает диффузию белковых молекул внутри себя и способствует кристаллизации. Наибольшую популярность данный метод приобрел благодаря тому, что при помощи него оказалось возможным произвести кристаллизацию ряда GPCR и мембранных ретинальных белков. Успех кристаллизации в кубической фазе связывают с несколькими факторами. Во-первых, липидный бислой упорядочивает взаимное расположение гидрофильных и гидрофобных частей соседних белковых молекул, позволяя им формировать кристалл, состоящий из мембранных мультислоев белков и обычно хорошо дифрагирующий, поскольку при этом связи между белками формируются как в гидрофильной, так и в гидрофобной части. Во-вторых, липидный бислой имитирует естественное окружение мембранного белка, что увеличивает его стабильность. Таким образом, кристаллизация в LCP или её менее упорядоченных аналогах (таких, как губчатая фаза) позволяет устранять основные трудности, связанные с мембранными белками. Кроме этого, кубическая фаза служит фильтром, отсекающим большие агрегаты молекул, что способствует кристаллизации белка [228]. В зависимости от условий (преимущественно концентрации компонент раствора и температуры) определённые липиды собираются в структуры с разными пространственными группами симметрии

(наиболее распространенными являются кубические фазы Im3m и Pn3m, а также ламеллярная фаза) [229]. Наиболее популярным липидом для формирования LCP является моноолеин, использованием других липидов можно добиваться изменения свойств, перечисленных в начале раздела, и варьировать размеры элементарной ячейки фазы от 30 до 240 ангстрем [230], что позволяет подбирать параметры фазы под конкретный белок, облегчая его корректное встраивание в липидный бислой [231]. Однако кристаллы GPCR, вырастающие в LCP, могут являться слишком маленькими для получения структуры высокого разрешения с помощью даже микрофокусных станций на источниках синхротронного излучения, поэтому для их исследования может применяться серийная фемтосекундная кристаллография на XFEL (X-гау free electron laser, рентгеновский лазер на свободных электронах) или микроэлектронная дифракция [232, 233].

ЛИГАНДЫ КАК СТАБИЛИЗАТОРЫ РЕЦЕПТОРОВ

В отсутствие лиганда GPCR может существовать во множестве конформационных состояний [82]. Добавление лиганда приводит к конформационным изменениям, стабилизируя рецептор в предпочтительном состоянии. Состояние определяется типом используемого лиганда: антагонист, обратный агонист либо агонист. Обычно перед кристаллизацией тестируется набор лигандов с целью наилучшей стабилизации рецепторов, например, анализируя температурный сдвиг с использованием флуоресцентного красителя, взаимодействующего с цистеинами [234]. Из 450 структур, решенных рентгеноструктурной кристаллографией, 429 были закристаллизованы с экзогенными лигандами, 301 из 337 крио-ЭМ структур также были решены в присутствии лигандов (по данным GPCRdb [235], август 2022).

В настоящее время без лиганда и стабилизации фрагментами антител удалось закристаллизовать только несколько уникальных рецепторов. По всей видимости, первой безлигандной структурой является структура бычьего опсина, решенная в 2008 году [236]. Последующие структуры появились значительно позже, например, структура с липидным рецептором LPA₆ из рыбы *Danio rerio* в 2017 году. В структуре этого рецептора была обнаружена боковая вертикальная щель между ТМ4 и ТМ5, внутри которой находилось гидрофобная молекула, вероятно, моноолеин, который присутствует в избытке при кристаллизации, либо детергент или эндогенный липид. Предположительно, данная щель является частью лиганд-связывающего кармана и предназначена для ацильной цепи лизофосфатидной кислоты — естественного лиганда для рецептора [237]. Далее

в 2018 году появилась структура стабилизированного 4 мутациями человеческого рецептора класса F FZD₄ с делецией внеклеточного цистеин-богатого домена (CRD) [238]. Человеческий орфанный рецептор GPR52, стабилизированный точечными мутациями, был закристаллизован в отсутствие лигандов и выявил уникально свернутый мотив ECL2, который может играть роль «встроенного агониста» [239]. Тем не менее, для большинства GPCR лиганды оказались необходимыми для их стабилизации и возможности дальнейшей кристаллизации, что подчеркивает важность лигандов и необходимость их дальнейшего поиска для труднокристаллизуемых рецепторов.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФРАГМЕНТОВ АНТИТЕЛ ДЛЯ СТАБИЛИЗАЦИИ КОНФОРМАЦИОННЫХ СОСТОЯНИЙ

Для некоторых рецепторов оказались успешны стратегии с использованием фрагментов антител вместо белков-партнеров, либо в дополнение к ним. Фрагменты антител могут образовывать кристаллические контакты, стабилизировать белок в определенном состоянии, что делает образец гомогенным, служить аллостерическим модулятором, повышать термостабильность рецептора [240]. Фрагменты антител создаются для конкретных рецепторов в комплексе с лигандами, чтобы зафиксировать определенное конформационное состояние путем иммунизации лабораторных животных, дальнейшего получения гибридом, вырабатывающих антитела, отбора и очистки моноклональных антител [11, 240]. Выделенные антитела фрагментируют на антиген-связывающий домен Fab и кристаллизующийся фрагмент иммуноглобулина Fc с помощью папаина [241].

Впервые был использован фрагмент моноклонального антитела Fab для кристаллизации β2AR (PDB ID: 2R4R) в комплексе с частичным агонистом, с целями снижения конформационной подвижности мобильных доменов и увеличения полярной поверхности для образования кристаллических контактов, что привело к появлению структуры с разрешением 3.4 A [183]. Также в активной конформации были получены структуры рецепторов 5-HT2B, S1PR3 и AT2R в комплексе с Fab фрагментом, узнающим внеклеточные домены [240, 242–244]. Кроме того с Fab кристаллизовали рецепторы и в неактивном состоянии, например рецептор глюкагона (класс В) с партнерным белком Т4L, встроенным в ICL2 [86], аденозиновый A2a рецептор [109] и другие [11, 38, 240, 245, 246].

Помимо использования Fab фрагментов, нацеленных на эпитопы рецептора, были подобраны фрагменты антител к партнёрному белку BRIL, для улучшения кристаллизации лиганд-связанных GPCR. В

данном случае Fab фрагменты могут использоваться для разных GPCR, слитых с BRIL и не оказывать непосредственного влияния на рецептор, поэтому его можно использовать для изучения как активного, так и неактивного состояний рецептора [11].

Позднее стал применяться подход с использованием нанотел (nanobodies, Nb). Нанотела представляют собой рекомбинантные антигенсвязывающие домены уникальных антител верблюдовых (Tylopoda), лишенных легких цепей [247]. Из-за своего малого размера и получили свое название: они составляют 25 % обычного фрагмента Fab [248]. Изначально нанотела использовались для стабилизации активной конформации рецепторов в комплексе с агонистом, поскольку кристаллизация GPCR в активном состоянии была сложной задачей из-за конформационной гибкости и нестабильности рецепторов. Например, нанотело использовалось в качестве альтернативы Gs белку для решения первой структуры β2-адренергического рецептора в активном состоянии с Nb80 [248]. Позднее Nb80 подверглось молекулярной эволюции (Nb6B9), что позволило получить еще несколько структур рецептора, в том числе и с агонистами с низкой аффинностью [179, 249]. Также были подобраны нанотела, стабилизирующие GPCR рецепторы в неактивной конформации [250, 251].

Наработка антител к фиксированным состояниям индивидуальных рецепторов является трудо- и времязатратной задачей, при этом дорогостоящей [252]. Однако уже появились успешные результаты переноса эпитопа нанотела Nb6 с каппа-опиоидного рецептора кОR на другие рецепторы семейства GPCR [253]. Изначально Nb6 был подобран к ICL3 рецептора кОR [254]. Заменив ICL3 целевого рецептора на ICL3 кОR, можно добиться связывания Nb6 с целевым GPCR, что позволяет существенно упростить задачу по наработке антител для исследуемого рецептора.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СОЛЕЙ И ХИМИЧЕСКИХ ДОБАВОК ДЛЯ ОЧИСТКИ И СТАБИЛИЗАЦИИ РЕЦЕПТОРОВ

Буферы для работы с GPCR рецепторами содержат добавки, которые помогают сохранить белок стабильным и мономерным. Глицерин и хлорид натрия — самые распространенные: они присутствуют почти на всех стадиях очистки белка. Кроме того, в зависимости от метода исследования структуры (кристаллизация или криоэлектронная микроскопия) может потребоваться обработка рецептора другими солями и малыми молекулами: хлоридом магния, хлоридом калия, АТФ, йодацетамидом.

Хлорид натрия напрямую влияет на ионную силу раствора и может способствовать улучшению мономерности рецептора благодаря нейтрализации полярных взаимодействий между белковыми молекулами [255]. Концентрация хлорида натрия в буферах для различных рецепторов разная — от следовых количеств, менее 6 мМ [37], до 800 мМ [256, 257].

Многие рецепторы стабильны в широком диапазоне концентраций NaCl [242,257–259], что позволяет использовать эту соль как средство очистки GPCR. Так, клетки с оверэкспрессированным целевым рецептором промывают в буфере с нулевой концентрацией NaCl и низкими концентрациями КСl и MgCl2. КСl и MgCl2 обеспечивают ионную силу раствора для поддержания стабильности рецептора, а отсутствие NaCl вне клеток вызывает осмотический приток воды внутрь клеток, что в дальнейшем облегчает их разрушение. Мембраны уже разрушенных клеток промывают буфером с высокой концентрацией NaCl (1000 мМ) для очистки от растворимых внутриклеточных и периферических мембранных белков – высокая концентрация соли вызывает их агрегацию [260], в то время как GPCR в мембране остаётся в нативной конформации. Кроме NaCl, для удаления периферических мембранных белков может использоваться мочевина [44, 261].

Глицерин – ещё одна добавка, стабилизирующая GPCR рецепторы. Глицерин амфифилен, поэтому при наличии у белка выступающих гидрофобных участков он становится посредником между такими участками и водным раствором, и тем самым он поддерживает правильный фолдинг рецептора [262]. Это особенно важно в случае, когда GPCR в процессе солюбилизации извлекается из мембраны и помещается в мицеллы из детергента. Как уже было сказано выше, молекулы детергентов являются более подвижными, чем нативные липиды в мембране, и к тому же в мицеллах происходит постоянный обмен детергентом между мицеллой и окружающим буферным раствором. Поэтому рецептор в мицеллах как минимум кратковременно экспонирует в раствор те гидрофобные аминокислоты, которые в нативной мембране скрыты липидами. Чтобы поддержать стабильность рецептора в мицеллах, глицерин добавляют на стадии солюбилизации до концентрации 10%-30% [259, 263]. Во многих протоколах очистки GPCR концентрация глицерина в промывочных буферах составляет 10% [257–259]. Также глицерин является криопротектором [264], поэтому его добавляют в буферы для длительного хранения клеточных мембран или очищенных рецепторов в замороженном виде [259].

Йодацетамид используют при очистке GPCR с целью кристаллизации, которая требует крайне высокой степени мономерности препарата. Йодацетамид – алкилирующий агент, который необратимо модифицирует SH-группу цистеина, предотвращая в дальнейшем формирование дисульфидных связей. Если в аминокислотной последовательности рецептора есть цистеины, которые экспонированы в раствор, то после солюбилизации две молекулы рецептора могут связаться друг с другом посредством таких цистеинов, и, следовательно, степень мономерности очищенного белка снизится. Йодацетамид предотвращает формирование таких ковалентно связанных димеров [265]. Непосредственно перед солюбилизацией мембраны с рецептором инкубируют в буфере с йодацетамидом в концентрации примерно 2 мг/мл [258, 259].

АТФ также используется при очистке GPCR для повышения мономерности препарата. Все GPCR имеют достаточно сложную структуру, и для правильного фолдинга этим рецепторам часто требуются молекулярные шапероны [266]. Отдельные шапероны, например Hsp70, регулируют процесс GPCR-сигнализации, обеспечивая отделение G-белков от рецептора [267]. Даже после промывки мембран и солюбилизации некоторые рецепторы в растворе могут быть всё ещё связаны с шаперонами, многие из которых являются АТФ-зависимыми. При взаимодействии с АТФ они меняют свою конформацию и могут отсоединиться от GPCR. Поэтому в буферы для промывки солюбилизированного рецептора добавляют АТФ [258, 259].

V. ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ И КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ПОЛУЧЕННЫХ БЕЛКОВЫХ ПРЕПАРАТОВ

Полученные очищенные препараты белков для структурно-функциональных исследований предварительно характеризуют при помощи аналитической гель-фильтрации, анализа термического сдвига и наноразмерной дифференциальной сканирующей флуорометрии.

АНАЛИТИЧЕСКАЯ ГЕЛЬ-ФИЛЬТРАЦИЯ

Аналитическая эксклюзионная хроматография или гель-фильтрация (Size Exclusion Chromatography, SEC) — это хроматографический метод, при котором молекулы в растворе разделяются по отношению гидродинамического радиуса макромолекулы к среднему размеру пор наполнителя колонки [268]. Хроматографическая колонка заполнена мелкими пористыми частицами. Во время пропускания буфера, содержащего белок, через колонку, более мелкие молекулы попадают в поры, что приводит к увеличению их времени прохождения через колонку, в то время как более крупные молекулы белка этого не делают. В результате происходит разделение раствора на частицы

в зависимости от размера [269]. Для оценки количества белка в проходящем потоке, как правило, используется детектор поглощения ультрафиолетового излучения.

В случае флуоресцентно-детектирующей SEC (FSEC) целевые белки ковалентно соединены с зеленым флуоресцентным белком (GFP), и профиль SEC снимается по излучению флуорофора. Поскольку FSEC использует уникальный сигнал флуоресценции GFP, для проведения эксперимента не требуется ни очистка белка, ни крупномасштабное культивирование, поэтому измерения проводятся после солюбилизации целых клеток или неочищенных мембран. Такая схема выделения и анализа позволяет упростить прекристаллизационный скрининг, который производится в целях поиска оптимальных условий для наработки белка [270].

SEC является одним из наиболее полезных инструментов для мониторинга монодисперсности и стабильности целевого белка. Монодисперсный и правильно фолдированный белок обычно дает отклик в виде одного симметричного гауссова пика, в то время как полидисперсный, нестабильный или развернутый белок обычно дает отклик в виде нескольких асимметричных пиков (Рис. 4). Из профилей элюции SEC также может быть получена информация о примесях, присутствующих в образце, поэтому SEC широко используется для качественного анализа белков и комплексов для проверки их однородности, стабильности и чистоты препарата. Эти параметры являются одними из основных для использования образцов в структурных исследованиях [271].

Гомогенность и олигомерное состояние белков может быть определено путем сравнения времени удержания целевого белок-детергентного комплекса с временем удержания молекул, использующихся в качестве стандартов молекулярной массы. При выполнении этого сравнения, однако, необходимо, учитывать, что стандартами для колонок, являются растворимые белки или малые молекулы, тогда как мембранные белки находятся в комплексе с молекулами детергента, которые потенциально могут увеличивать гидродинамический радиус. Как следствие, мембранные белки могут иметь молекулярные массы больше, чем можно было бы предсказать [272]. Данную проблему можно решить при помощи методов анализа рассеяния света, например MALS.

МНОГОУГЛОВОЕ РАССЕЯНИЕ СВЕТА (MALS)

Многоугловое рассеяние света (Multi-Angle Light Scattering, MALS) — это хорошо зарекомендовавший себя метод изучения белковых взаимодействий, который может быть применен как для отдельных

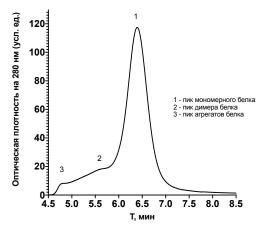


Рис. 4. Пример хроматограммы белкового образца.

Значения флуоресценции на длине волны 280 нм откладываются относительно времени выхода фракции из колонки. Мономерная фракция белка на хроматограмме отражена симметричным гауссовым пиком 1. Фракции, имеющие большую молекулярную массу, опережают мономерную фракцию и представляют собой фракцию димеров 2 и фракцию агрегатов 3.

белков, так и для белковых комплексов. В типичном эксперименте MALS рассеяние лазерного луча раствором белка измеряется под несколькими углами в плоскости, перпендикулярной падающему свету. Общая интенсивность рассеяния связана с молярной массой и концентрацией, в то время как угловая зависимость связана со среднеквадратичным радиусом молекулы. Путем анализа углового изменения интенсивности рассеяния можно определить среднеквадратичный радиус, молекулярную массу и концентрацию макромолекул в образце [273].

MALS особенно эффективен в сочетании с SEC. Поскольку белковые комплексы поочерёдно элюируются из колонки SEC, их можно непосредственно анализировать с помощью последовательно подключенного детектора MALS. Это позволяет разделить различные белки или белковые комплексы, которые могут присутствовать в образце, в сочетании с точным измерением их молекулярной массы [274].

АНАЛИЗ ТЕПЛОВОГО СДВИГА

Экспрессия и очистка рекомбинантных белков могут быть значительно улучшены путем добавления стабилизирующих буферов или лигандов, которые снижают склонность белков агрегировать во время очистки

и хранения *in vitro*. Более того, повышение стабильности коррелирует со способностью рекомбинантных белков к кристаллизации [275]. Идентификация стабилизирующих буферов и добавок обычно устанавливается путем мониторинга повышения отслеживания температуры плавления белка при термической денатурации.

Одним из методов оценки термостабильности белка является анализ теплового сдвига (Thermal Shift Assay, TSA), иногда также называемого дифференциальной сканирующей флуориметрией. При подготовке к проведению TSA белок инкубируется со специфическим флуоресцентным красителем. У используемых красителей, таких, как например SYPRO Orange, значительно увеличивается квантовый выход при связывании с гидрофобными участками белка, которые становятся доступными для взаимодействия во время денатурации белка. Благодаря постепенному повышению температуры и сопутствующему мониторингу излучения флуоресценции красителя можно наблюдать за термической денатурацией [276]. Стабильность белка количественно определяется по температуре плавления (T_m), которая может быть повышена за счёт изменения буферных условий или внесением в буферный раствор дополнительных добавок. Данное увеличение температуры плавления называется тепловым сдвигом, который показывает увеличение стабильности белка. Также наблюдение за тепловым сдвигом используется для идентификации лигандов, которые имеют тенденцию стабилизировать белки при связывании [277]. На примере рецептора апелина человека (АРЈ) было показано, что краситель н-[4-(7-диэтиламино-4-метил-3-кумаринил) фенил]малеимид (CPM) пригоден для проведения измерений TSA с GPCR [234]. Таким образом TSA используется для анализа стабильности вариантов GPCR, с различными партнёрными белками, точечными мутациями и длинами N- и С-концов, а также для поиска новых лигандов путем скрининга библиотек соединений.

НАНОРАЗМЕРНАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ СКАНИРУЮЩАЯ ФЛУОРОМЕТРИЯ (NANODSF)

В отличие от метода TSA, в методе наноразмерной дифференциальной сканирующей флуорометрии (Nanoscale Differential Scanning Fluorimetry, nanoDSF) не используется мечение белка флуоресцентным красителем. NanoDSF отслеживает изменения собственной флуоресценции остатков триптофанов в белке, возникающие в результате изменения 3D-структуры белков в зависимости от температуры [278]. Собственная флуоресценция триптофана реагирует на изменения в микроокружении белка на основе сольватохромных (изменяющих

параметры флуоресценции в зависимости от окружения) характеристик индольного кольца. При возбуждении на 280 нм максимум излучения флуоресценции триптофана составляет около 330 нм, когда аминокислота находится в неполярной среде. В полярной среде интенсивность излучения обычно уменьшается из-за статического и динамического гашения молекулами растворителя, а пик излучения смещен в красный цвет примерно до 350 нм [279]. Обычно это происходит, когда остатки триптофанов, скрытые в гидрофобном ядре белка, подвергаются воздействию воды при его денатурации. Температура, необходимая для разворачивания 50% белка, то есть Тт, может быть точно определена по степени красного сдвига или иногда синего сдвига (Рис.5).

Так как метод, так же, как и TSA, отслеживает термостабильность белка по изменению температуры плавления, он используется для поиска оптимальных условий для хранения и кристаллизации с точки зрения стабильности белка [280]. В дополнение к проверке стабильности nanoDSF способен детектировать связывание белоклиганд, а также может помочь получить ценную информацию о сайте связывания лиганда и механизме действия белка [281].

VI. ФОРМИРОВАНИЕ КОМПЛЕКСОВ РЕЦЕПТОРОВ С ОСНОВНЫМИ ПАРТНЁРАМИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

ФОРМИРОВАНИЕ КОМПЛЕКСОВ GPCR ДЛЯ КРИСТАЛЛОГРАФИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для полного понимания молекулярных механизмов работы рецепторов, сопряжённых с G-белком, необходимо знать структуру рецептора в комплексе не только с различными лигандами, но и с теми белковыми молекулами, с которыми рецептор взаимодействует в природе, и которые участвуют в осуществлении передачи сигнала внутрь клетки. Таковыми для GPCR являются GRK [265], G-белки, аррестины и другие.

По данным GPCRdb, на настоящий момент с помощью кристаллографии получено 450 структур GPCR. Из них 53 в комплексе с антителами, фрагментами антител, или нанотелами, 18 в комплексе с G-белками, 4 со зрительными аррестинами.

Антитела и фрагменты антител часто используются в структурной биологии GPCR. Об их функциях подробно рассказывается в разделе «Использование фрагментов антител для стабилизации конформационных состояний». Так, нанотела используют в качестве шаперонов кристаллизации. При этом существует протокол создания

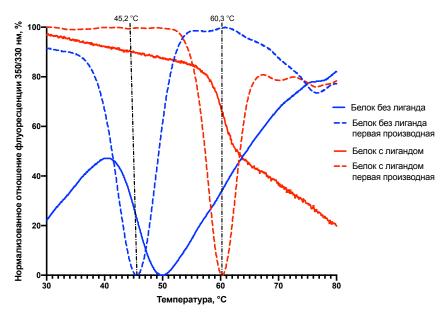


Рис. 5. Пример данных nanoDSF.

Сплошными линиями обозначено отношение флуоресценции образца на длине волны 350 нм к флуоресценции на 330 нм, пунктирными линиями обозначена первая производная отношения. Кривые синего цвета отражают данные по плавлению белка без добавления лиганда, красные кривые — данные по плавлению белка с добавлением лиганда. Вертикальные пунктирные линии показывают температуру плавления образцов. По увеличению температуры плавления прослеживается стабилизация белка за счёт связывания с лигандом.

уникальных нанотел для каждого рецептора [282]. Протокол комплексообразования и кристаллизации рецепторов с нанотелами примерно следующий: рецептор смешивают с избытком нанотела, выдерживают реакцию при +4 °C от одного до восьми часов, очищают комплекс, концентрируют, делают аликвоты по 7-8 мкл и замораживают в жидком азоте, размораживая непосредственно перед замешиванием с липидом и постановкой кристаллизации [179, 283–285]. Если рецептор термостабильный, то комплексообразование можно проводить при комнатной температуре и быстрее [249]. Концентрировать комплекс можно до разных концентраций, например 40–50 мг/мл [286]. Допускается кристаллизация комплекса без предварительной заморозки [180]. Протокол образования комплексов «рецептор-фрагмент антитела» примерно тот же, что и с нанотелами: антитела смешивают с рецептором, который может быть очищенным

или иммобилизованным на аффинной смоле в процессе очистки или даже находиться в мембранах перед солюбилизацией. Смесь выдерживают на льду от одного до восьми часов, а затем комплекс «рецептор-фрагмент антитела» очищают с помощью гель-фильтрации, концентрируют и используют для кристаллизации [11, 240, 243, 246, 287].

Гетеротримерные G-белки – это семейство белков, меняющих активность эффекторных ферментов, способствующих генерации вторичных мессенджеров при активации GPCR. G-белок состоит из трёх субъединиц: Gα, Gβ и Gγ [288]. При активации рецептора G-белок диссоциирует на Gα и Gβγ субъединицы. G-белки на основе гомологии и связанных нижестоящих сигнальных путей классифицируются на четыре семейства в соответствии с их $G\alpha$ субъединицей: G_s (G_s и G_{olf}), $G_{i/o}(G_{i1}, G_{i2}, G_{i3}, G_o, G_{t1}, G_{t2}, G_{t3}, \mu G_z), G_{o/11}(G_o, G_{11}, G_{14} \mu G_{15}) \mu G_{12/13}$ $(G_{12} \text{ и } G_{13})$ [289]. G_s субъединицы активизируют аденилатциклазу, $G_{i/o}$ ингибируют аденилциклазу, $G_{q/11}$ активируют фосфолипазу С- β , $G_{12/13}$ активируют небольшие семейства GTPa3 [290]. Кроме того, существует 5 различных типов G_8 и 12 типов G_7 субъединиц, которые в свою очередь запускают ассоциированные с ними сигнальные пути, что приводит к огромному количеству возможных комбинаций гетеротримерных G-белков. Ga субъединицы являются ГТФазами, которые используют энергию расщепления ГТФ до ГДФ и запускают внутриклеточные каскады. [291-293].

Первая кристаллическая структура GPCR с G-белком была опубликована в 2008 году. Солюбилизированный из бычьей сетчатки родопсин смешивали с химически синтезированным С-концевым фрагментом Gα субъединицы в молярном отношении 1:4, выдерживали на льду, освещали зелёным светом (500±20 нм) и ставили кристаллизацию методом висящей капли [236].

Следующая кристаллическая структура комплекса β 2-адренергического рецептора, G_s гетеротримера и нанотела-35 (Nb-35) была венцом десятилетий работы с GPCR: была получена структура рецептора в момент его активации и передачи сигнала через G-белок. Субъединицы G-белка (рекомбинантные бычьи G α и G γ , крысиный G β) были по отдельности экспрессированы, объединены в комплекс, затем смешаны с комплексом лиганд-рецептор в небольшом избытке G_s . Реакция выдерживалась 3 часа при комнатной температуре с добавлением апиразы для гидролиза ГД Φ , высвобождающегося из G_s при образовании комплекса с рецептором. Это предотвращает распад комплекса «рецептор- G_s ». Образовавшийся комплекс отделяли от не связавшихся G-белков с помощью aнти-FLAG смолы, а от не связавшихся рецепторов с помощью SEC. За 1 час перед кристаллизацией комплекс «лиганд-T4L- β 2AR- G_s » смешивали с неболь-

шим молярным избытком Nb-35 и выдерживали при комнатной температуре. Nb35 служит для стабилизации комплекса G_s , что улучшает его аффинность к рецептору. Кристаллизацию комплекса «лиганд—T4L–B2AR– G_s » проводили с помощью метода LCP [85].

Для облегчения кристаллизации комплекса «GPCR- G_s белок», был создан мини- G_s (mini- G_s , конструкция 414), представляющий из себя укороченный вариант $G\alpha_s$ с восемью точечными мутациями [294], которые стабилизируют белок в отсутствии $G\beta\gamma$ [92, 295]. Мини- G_s увеличивает аффинность рецептора к агонисту также, как и гетеротримерный G-белкок G_s , и демонстрирует идентичную чувствительность к присутствию Na^+ — аллостерического модулятора. Комплекс A2aR с агонистом NECA и mini- G_s оказался более термостабильным, чем комплекс «рецептор-NECA». Комплексообразование проводили путём смешивания очищенного A2a рецептора с мини- G_s в 1,2 молярном избытке мини- G_s в присутствии апиразы. Смесь выдерживалась ночь на льду, и перед постановкой кристаллизации комплекс очищали с помощью гель-фильтрации [294].

Для других Gα субъединиц также были созданы версии мини-G [92]. Протокол образования комплекса GPCR с мини-G-белками достаточно универсальный [171].

Все предыдущие комплексы созданы для нуклеотид-свободного состояния G-белка. Чтобы получить комплекс «рецептор-G_s-GDP», необходимо провести дополнительные эксперименты. В работе под руководством Брайана Кобилки [296] было решено поместить аминокислотную последовательность ГДФ-связывающей области Gα_s (далее G_sCT) в β2-адренергический рецептор вместо третьей внутриклеточной петли. G_sCT была помещена через оптимизированные линкеры между ТМ5 и Т4L, между Т4L и G_sCT, между G_sCT и ТМ6, а также введён дисульфидный мостик между G_sCT и пятой трансмембранной спиралью рецептора. Дисульфидный мостик стабилизировал взаимодействие между рецептором и G-белком. В результате удалось получить кристаллы хорошего качества и понять взаимодействие между рецептором и нуклеотид-свободным Gα_s. $G_{\mbox{\tiny i/o}}CT$ пептиды, созданные по аналогии с $G_{\mbox{\tiny s}}CT$, были использованы для изучения структурных изменений, связанных с передачей сигнала от зрительных рецепторов к G-белку [297–304].

На данный момент последняя кристаллическая структура комплекса «GPCR–G-белок» опубликована в 2021 году [305]. Комплекс, состоящий из D1 дофаминового рецептора, лиганда, G_s гетеротримерного белка и Nb35 сравнивался с аналогичным комплексом с β 2A рецептором. Были собраны данные о взаимодействии рецептора с

G-белком. Особенностью комплексообразования в данной работе является то, что реакция проводилась на анти-FLAG смоле. Компоненты комплекса добавлялись к смоле и выдерживали 3 часа при температуре +4°C при осторожном покачивании. Затем рецепторы и собранные комплексы элюировались со смолы, и финальное очищение комплекса проводилось с помощью гель-фильтрации.

Для сборки комплекса GPCR с G-белками важно добавлять апиразу для удаления нуклеотидов, которые могут привести к диссоциации комплекса [85]. Для катализа образования дисульфидных мостиков между рецептором и G-белком можно использовать фенантролин меди [296]. Для предотвращения дисульфид-опосредованной агрегации в момент образования комплекса можно добавлять TCEP, но нельзя использовать йодацетамид для блокировки реакционноспособных цистеинов на α и β субъединицах G_s , поскольку он вызывает диссоциацию комплекса [85].

Помимо G-белков, важнейшими участниками пути передачи сигнала через GPCR являются аррестины. Эти белки участвуют в процессах десенсибилизации рецептора, удаления его из клеточной мембраны, а также запускают независимые от G-белков клеточные биохимические пути. Семейство аррестинов включает следующие подсемейства: зрительные аррестины (аррестин-1 и аррестин-4) и не визуальные β-аррестины (β-аррестин-1 и β-аррестин-2, также называемые аррестин-2 и аррестин-3 соответственно). Кроме того, было идентифицировано семейство α-аррестинов, структурно родственное β-аррестинам. В структурных работах обычно рассматривают β-аррестины 1 и 2 типов, которые повсеместно экспрессируются в большинстве тканей и типов клеток млекопитающих [306].

В настоящее время получено четыре структуры комплексов «зрительный родопсин-аррестин-1», из них три комплекса были получены с помощью коэкспрессии этих белков в одной полипептидной цепи: человеческий полноразмерный родопсин с Т4 лизоцимом на N-концевой части и аррестин первого типа через подвижный линкер AAAGSAGSAGSAGSA на С-конце. При замешивании LCP к комплексу добавлялся полностью транс-ретиналь [15, 307]. Ещё один комплекс «родопсин-аррестин-1» был собран из выделенного из бычьей сетчатки родопсина и химически синтезированного пептида ArrFL-1 (петлевой участок аррестина-1). Солюбилизированный рецептор смешивался с пептидом в молярном соотношении 1:12 соответственно. Смесь выдерживалась на льду 5 минут и облучалась светом на длине волны 530 нм. Этот комплекс кристаллизовался методом сидячей капли [308].

ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУР КОМПЛЕКСОВ МЕТОДОМ CRYO-EM

Первым рецептором, структуру которого получили в 2017 году с помощью метода криоэлектронной микроскопии, стал кальцитониновый рецептор [309]. В этом же году Жак Дюбуше, Йоахим Франк и Ричард Хендерсон получили нобелевскую премию за «разработку методов криоэлектронной микроскопии высокого разрешения для определения трехмерных структур биомолекул в растворе». После десятилетий совершенствования этого метода, его применение в структурной биологии GPCR имело колоссальный успех. По данным GPCRdb 337 структур GPCR было получено с помощью метода криоэлектронной микроскопии всего лишь за 5 лет.

Протокол первой работы был следующим: рецептор с N-концевым FLAG-тагом и C-концевым His-тагом, $G\alpha_s$ и $G\beta_1\gamma_2$ были коэкспрессированы с помощью бакуловирусов в Hi5 клеточной линии насекомых [310]. Одновременное заражение клеточной культуры вирусными суспензиями происходило в эффективном соотношении 1:2:2 соответственно. После экспрессии в течении 48 часов клетки центрифугировали, ресуспендировали и запустили процесс комплексообразования, добавляя лиганд (кальцитонин лосося), Nb35 и апиразу. Nb35 связывается с $G\alpha_s$ – $G\beta$ комплексом и таким образом стабилизирует G-белок. Реакцию комплексообразования проводили 1 час при комнатной температуре, а затем рецепторы солюбилизировали и проводили многоэтапную очистку комплексов.

Из-за ограничений метода крио-электронной микроскопии, связанных с минимальной массой и необходимой формой объекта, среди всех GPCR только структуры представителей класса С могут быть получены в комплексе с малыми молекулами-лигандами благодаря наличию больших внемембранных доменов [311–315]. В остальных семействах структуру комплекса «рецептор-лиганд» без присутствия иных молекул можно получить за счет димеризации рецептора, как в работе с родопсином [172], или использовать большой белковый лиганд, такой как хорионический гонадотропин [316].

Коэкспрессия как метод создания белковых комплексов возможен как в бактериальной системе экспрессии [317–319], так и в клетках эукариот [320–323]. В структурной биологии GPCR наиболее частым подходом является трансфекция клеток разными векторами [320–323]. Коэкспрессия белков в одной рамке считывания используется реже [313].

Формирование белковых комплексов из очищенных компонентов [12, 184, 324], до очистки белков [325], или перед солюбилизацией рецептора [326, 327] кажется абсолютно равнозначным. Возможно,

авторы последних работ оптимизировали протокол очистки комплекса для применения к своим индивидуальным задачам.

С помощью метода криоэлектронной микроскопии стало возможно получение структуры µ-опиоидного рецептора (µOR) в комплексе с G_{i1} белком [328]. µOR сигнализирует практически всегда через подсемейство $G_{i/o}$ белков, ингибирующих аденилатциклазу [329]. Активация опиоидных рецепторов приводит к подавлению боли [330], поэтому комплекс «агонист-µOR-G_{il}» был особенно важен. Для стабилизации нуклеотид-несвязывающего G_{i1} гетеротримера был использован фрагмент одноцепочечного вариабельного антитела (single-chain variable fragment, scFv), который связывался с Gα_i и СВ субъединицами, стабилизируя С-белок и не влияя на взаимодействие G-белка с рецептором. Эта работа стала первой, в которой показана структура комплекса GPCR с G-белком, не относящимся к подсемейству G_s. Экспериментальный протокол образования комплекса «лиганд-GPCR-G_i» не сильно отличается от процедур для комплексов с G_s-белками: коэкспрессированные субъединицы G-белка очищаются, концентрируются и добавляются к очищенному и сконцентрированному комплексу рецептора с лигандом. Реакция комплексообразования проходит 1 час при комнатной температуре, а затем в присутствии апиразы ещё 1 час. Комплекс проходит очистку и обработку протеазами, и в конце к нему добавляют scFv16. Получившийся в финале комплекс очищают с помощью гель-фильтрации, концентрируют и используют для структурных исследований.

 $G\alpha_{12/13}$ подсемейство состоит всего из двух представителей: $G\alpha_{12}$ и Gа₁₃ [331]. Порядка 30 рецепторов при активации связываются с этим подсемейством G-белков [332]. G₁₂ и G₁₃ активируют фактор обмена гуаниновых нуклеотидов (guanine nucleotide exchange factor, GEF), которые регулируют Rho мономерные ГТФазы [333]. Долгое время взаимодействие рецепторов с G_{12} и G_{13} оставалось неясным, пока в 2022 году не были получены структуры комплексов рецептора сфингозин-1-фосфата второго типа (S1PR2) [334] и рецептора адгезии ADGRG1 (GPR56) [335]. В работе с S1PR2 G₁₃ гетеротример не был устойчив [334], поэтому было решено сделать химерную $G\alpha_{13}$ субъединицу: αN спираль дикого типа $G\alpha_{13}$ заменили на αN спираль Gα_i [336], а также стабилизировали G-белок с помощью scFv16. Очищенные и сконцентрированные компоненты смешивали поочередно: сначала рецептор и G-белок, затем scFv16. В работе с рецептором адгезии [335] был создан вариант мини-Gа₁₃, по аналогии с термостабильным мини- $G\alpha_{12}$, созданным ранее [336].

Отдельным случаем являются исследования комплексов GPCR с белком $G\alpha_0$. Подсемейство белков $G_{\alpha/1}$ при связывании с GPCR акти-

вируют β -фосфолипазу, которая в свою очередь запускает длинный каскад реакций [337–339]. Структуры комплексов «рецептор- $G_{q/11}$ » были получены лишь после того, как как были найдены удачные стабилизирующие делеции, мутации, а также модификации, позволяющие $G\alpha_q$ связываться с хорошо зарекомендовавшим себя ранее scFv16: были созданы мини- G_q конструкции, N-концевая последовательность $G\alpha_{q/11}$ была заменена на N-концевые последовательности других $G\alpha$ субъединиц [92, 340, 341]. $G\alpha_{q/11}$ субъединицы во всех комплексах являются химерными [342–344].

Бета-аррестины способны как десенсибилизировать GPCR [345], так и выполнять сигнальные функции при связывании с GPCR [346–348]. В отличии от визуальных аррестинов, комплексы с которыми были закристаллизованы, β-аррестины гораздо более подвижны, что сделало рентгеноструктурный анализ комплексов с ними затруднительной задачей. С помощью криоэлектронной микроскопии удалось установить структуру комплекса аррестина-2 (Arr2) с рецептором нейротензина 1 типа (NTSR1) [349]. Конструкция, состоящая из рецептора, β-аррестина и лёгкой цепи Fab30 (BRIL-NTSR1-Arr2-Fab30L), соединенных через линкеры, была коэкспрессирована с тяжелой цепью Fab30H и киназой GRK5 в клеточной линии насекомых Sf9. Рецептор солюбилизировали, комплекс «рецептор-β-аррестин-тяжёлая и лёгкая цепь Fab30» был очищен, сконцентрирован и использован для дальнейших исследований. GRK5 в данном случае была необходима для успешного формирования комплекса (о роли фосфорилирования при присоединении бета-аррестинов к рецепторам чуть ниже). Комплекс «рецептор-β-аррестин» также можно образовать из отдельных очищенных и сконцентрированных компонентов, используя сортазу для присоединения фосфорилированного пептида к С-концевому участку рецептора [350] или обрабатывая рецептор GRK [351].

Перед присоединением β-аррестинов С-концевые и внутриклеточные петлевые участки рецепторов подвергаются избирательному фосфорилированию семейством киназ рецепторов, связанных с G-белками (GRK), включающем в себя семь представителей [352]. Данный процесс обусловливает направление и динамику биохимической сигнализации и «судьбы» рецептора, поэтому отдельно представляют интерес структуры «GPCR – GRK». В настоящее время получены структуры для комплекса зрительного родопсина с GRK1 с использованием кросслинкинга и ингибиторов киназ для стабилизации комплекса [184].

Считается, что при активации GPCR взаимодействуют с G-белками. После этого G-белки отделяются от рецепторов. Затем GRK фосфорилируют внутриклеточные домены рецептора, и рецептор десенсибилизируется В-аррестинами. Однако, было замечено, что иногда рецептор продолжает сигнализировать [353-355], и была выдвинута и доказана гипотеза о том, что некоторые GPCR взаимодействуют одновременно и с β-аррестинами, и с G-белками [356]. Структуру такого «мегакомплекса» удалось получить в 2019 году [357]. Коэкспрессировали β2-адренергический рецептор с замененной С-концевой последовательностью рецептора вазопрессина второго типа (β2V2R), β-аррестин-1 (β-arr1) и GRK2. Перед цетрифугированием клетки нагревали до +37 °C с добавлением лиганда для образования комплекса. Перед солюбилизацией к мембранам добавляли избыток Fab30 и инкубировали смесь 30 минут при комнатной температуре. Затем рецептор солюбилизировали. К очищенному комплексу «β2V2R-β-arr1-GRK2-Fab30» добавляли избыток G_s-гетеротримера, Nb35 и Nb32. Образование комплекса проводили при комнатной температуре в течение часа. В дополнение к основной статье вышла небольшая статья с комментариями к этой структуре [205].

VII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем обзоре мы рассмотрели современные подходы к получению гомогенных стабилизированных образцов GPCR. Для достижения этой цели в первую очередь вводятся генетические модификации в белок дикого типа, которые позволяют удалить неупорядоченные участки аминокислотной последовательности белка, уменьшить его конформационную подвижность, удалить гетерогенные посттрансляционные модификации и добавить фьюжн-белки для дальнейшего увеличения стабильности белка, а также облегчения формирования кристаллизационных контактов или создания дополнительного объёма и выделенного направления в форме белка в случае исследований методами криоэлектронной микроскопии. В дальнейшем конструкции целевого белка экспрессируются в системах, обеспечивающих правильный фолдинг. Согласно GPCRdb, наиболее успешно себя показала бакуловирусная система экспрессии в клетках насекомых. На следующих этапах работы происходит процедура очистки и стабилизации рецептора в суспензиях с мембрано-моделирующими средами, характеризация гомогенности и стабильности полученного белка. Отдельно мы обсудили вопросы, связанные с получением образцов комплексов GPCR с их основными партнёрами взаимодействия – G-белками, β- аррестином и GRK.

ЛИТЕРАТУРА

- Sriram, K., Insel, P.A. (2018) G Protein-Coupled Receptors as Targets for Approved Drugs: How Many Targets and How Many Drugs?, Molecular Pharmacology, 93, 251–258.
- 2. Hauser, A.S., Attwood, M.M., Rask-Andersen, M., Schiöth, H.B., Gloriam, D.E. (2017) Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications, *Nature Reviews Drug Discovery*, **16**, 829–842.
- van Montfort, R.L.M., Workman, P. (2017) Structure-based drug design: aiming for a perfect fit, Essays in Biochemistry, 61, 431–437.
- Kermani, A.A. (2021) A guide to membrane protein X-ray crystallography, The FEBS Journal, 288, 5788–5804.
- Callaway, E. (2020) Revolutionary cryo-EM is taking over structural biology, *Nature*, 578, 201.
- Martynowycz, M.W., Gonen, T. (2021) Studying Membrane Protein Structures by MicroED, *Methods in Molecular Biology*, 2302, 137–151.
- 7. Danmaliki, G.I., Hwang, P.M. (2020) Solution NMR spectroscopy of membrane proteins, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, **1862**, 183356.
- 8. Zhang, K., Zhang, J., Gao, Z.G., Zhang, D., Zhu, L., Han, G.W., Moss, S.M., Paoletta, S., Kiselev, E., Lu, W., et al. (2014) Structure of the human P2Y12 receptor in complex with an antithrombotic drug, *Nature*, **508**, 115–118.
- Yasuda, S., Kajiwara, Y., Toyoda, Y., Morimoto, K., Suno, R., Iwata, S., Kobayashi, T., Murata, T., Kinoshita, M. (2017) Hot-Spot Residues to be Mutated Common in G Protein-Coupled Receptors of Class A: Identification of Thermostabilizing Muta-

- tions Followed by Determination of Three-Dimensional Structures for Two Example Receptors, *Journal of Physical Chemistry B*, **121**, 6341–6350.
- Katritch, V., Fenalti, G., Abola, E.E., Roth, B.L., Cherezov, V., Stevens, R.C. (2014) Allosteric sodium in class A GPCR signaling, *Trends in Biochemical Sciences*, 39, 233–244.
- Wu, F., Yang, L., Hang, K., Laursen, M., Wu, L., Han, G.W., Ren, Q., Roed, N.K., Lin, G., Hanson, M.A., et al. (2020) Full-length human GLP-1 receptor structure without orthosteric ligands, *Nature Communications*, 11, 1272.
- 12. Tsutsumi, N., Qu, Q., Mavri, M., Baggesen, M.S., Maeda, S., Waghray, D., Berg, C., Kobilka, B.K., Rosenkilde, M.M., Skiniotis, G., et al. (2021) Structural basis for the constitutive activity and immunomodulatory properties of the Epstein-Barr virusencoded G protein-coupled receptor BILF1, *Immunity*, 54, 1405–1416.
- Cherezov, V., Rosenbaum, D.M., Hanson, M.A., Rasmussen, S.G.F., Foon, S.T., Kobilka, T.S., Choi, H.J., Kuhn, P., Weis, W.I., Kobilka, B.K., et al. (2007) High-resolution crystal structure of an engineered human β2-adrenergic G protein-coupled receptor, *Science*, 318, 1258–1265.
- 14. Zhang, C., Srinivasan, Y., Arlow, D.H., Fung, J.J., Palmer, D., Zheng, Y., Green, H.F., Pandey, A., Dror, R.O., Shaw, D.E., et al. (2012) Highresolution crystal structure of human protease-activated receptor 1, *Nature*, 492, 387–392.
- Kang, Y., Zhou, X.E., Gao, X., He, Y., Liu, W., Ishchenko, A., Barty, A., White, T.A., Yefanov, O., Han, G.W., et al. (2015) Crystal structure of rhodopsin bound to arrestin by

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

- femtosecond X-ray laser, *Nature*, **523**, 561–567.
- Patwardhan, A., Cheng, N., Trejo, J. (2021) Post-Translational Modifications of G Protein—Coupled Receptors Control Cellular Signaling Dynamics in Space and Time, *Pharmacological Reviews*, 73, 120–151.
- 17. Matsumura, M., Signor, G., Matthews, B.W. (1989) Substantial increase of protein stability by multiple disulphide bonds, *Nature*, **342**, 291–293.
- Darby, N., Creighton, T.E. (1995)
 Disulfide bonds in protein folding and stability., Methods in Molecular Biology, 40, 219–252.
- Zavodszky, M., Chen, C.-W., Huang, J.-K., Zolkiewski, M., Wen, L., Krishnamoorthi, R. (2001) Disulfide bond effects on protein stability: Designed variants of Cucurbita maxima trypsin inhibitor-V, *Protein Science*, 10, 149–160.
- Standfuss, J., Xie, G., Edwards, P.C., Burghammer, M., Oprian, D.D., Schertler, G.F.X. (2007) Crystal Structure of a Thermally Stable Rhodopsin Mutant, *Journal of Molecular Biology*, 372, 1179–1188.
- Xie, G., Gross, A.K., Oprian, D.D. (2003) An Opsin Mutant with Increased Thermal Stability, *Biochemistry*, 42, 1995–2001.
- Standfuss, J., Zaitseva, E., Mahalingam, M., Vogel, R. (2008) Structural Impact of the E113Q Counterion Mutation on the Activation and Deactivation Pathways of the G Protein-coupled Receptor Rhodopsin, *Journal of Molecular Biology*, 380, 145–157.
- Salam, N.K., Adzhigirey, M., Sherman, W., Pearlman, D.A., Thirumalai,
 D. (2014) Structure-based approach to the prediction of disulfide bonds in proteins, *Protein Engineering*, *Design and Selection*, 27, 365–374.

- Chrencik, J.E., Roth, C.B., Terakado, M., Kurata, H., Omi, R., Kihara, Y., Warshaviak, D., Nakade, S., Asmar-Rovira, G., Mileni, M., et al. (2015) Crystal Structure of Antagonist Bound Human Lysophosphatidic Acid Receptor 1, Cell, 161, 1633–1643.
- 25. Song, G., Yang, D., Wang, Y., De Graaf, C., Zhou, Q., Jiang, S., Liu, K., Cai, X., Dai, A., Lin, G., et al. (2017) Human GLP-1 receptor transmembrane domain structure in complex with allosteric modulators, *Nature*, **546**, 312–315.
- Morrison, K.L., Weiss, G.A. (2001) Combinatorial alanine-scanning, Current Opinion in Chemical Biology, 5, 302–307.
- 27. Cunningham, B.C., Wells, J.A. (1989) High-resolution epitope mapping of hGH-receptor interactions by alanine-scanning mutagenesis, *Science*, **244**, 1081–1085.
- 28. Blaber, M., Zhang, X.J., Matthews, B.W. (1993) Structural basis of amino acid α helix propensity, *Science*, **260**, 1637–1640.
- Serrano-Vega, M.J., Magnani, F., Shibata, Y., Tate, C.G. (2008) Conformational thermostabilization of the β1-adrenergic receptor in a detergent-resistant form, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 877–882.
- 30. Magnani, F., Shibata, Y., Serrano-Vega, M.J., Tate, C.G. (2008) Coevolving stability and conformational homogeneity of the human adenosine A2a receptor, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 10744–10749.
- 31. Lomasneys, J.W., Leeb-lundberg, L.M.F., Cotecchiag, S., Regan, J.W., Debernardisli, J.F., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1986) Mammalian a1-Adrenergic Receptor, *The Jour-*

- nal of Biological Chemistry, **261**, 7710–7716
- 32. Huang, H., Tao, Y.X. (2014) Functions of the dry motif and intracellular loop 2 of human melanocortin 3 receptor, *Journal of Molecular Endocrinology*, **53**, 319–330.
- 33. Shibata, Y., Gvozdenovic-Jeremic, J., Love, J., Kloss, B., White, J.F., Grisshammer, R., Tate, C.G. (2013) Optimising the combination of thermostabilising mutations in the neurotensin receptor for structure determination, *Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes*, 1828, 1293–1301.
- Robertson, N., Jazayeri, A., Errey, J., Baig, A., Hurrell, E., Zhukov, A., Langmead, C.J., Weir, M., Marshall, F.H. (2011) The properties of thermostabilised G protein-coupled receptors (StaRs) and their use in drug discovery, *Neuropharmacology*, 60, 36–44.
- Magnani, F., Serrano-Vega, M.J., Shibata, Y., Abdul-Hussein, S., Lebon, G., Miller-Gallacher, J., Singhal, A., Strege, A., Thomas, J.A., Tate, C.G. (2016) A mutagenesis and screening strategy to generate optimally thermostabilized membrane proteins for structural studies, *Nature Protocols*, 11, 1554–1571.
- Warne, T., Serrano-Vega, M.J., Baker, J.G., Moukhametzianov, R., Edwards, P.C., Henderson, R., Leslie, A.G.W., Tate, C.G., Schertler, G.F.X. (2008) Structure of a β1-adrenergic G-protein-coupled receptor, *Nature*, 454, 486–491.
- Sato, T., Baker, J., Warne, T., Brown, G.A., Leslie, A.G.W., Congreve, M., Tate, C.G. (2015) Pharmacological analysis and structure determination of 7-methylcyanopindolol-bound β1-adrenergic receptor, *Molecular Pharmacology*, 88, 1024–1034.
- 38. Cheng, R.K.Y., Fiez-Vandal, C., Schlenker, O., Edman, K., Aggeler,

- B., Brown, D.G., Brown, G.A., Cooke, R.M., Dumelin, C.E., Doré, A.S., et al. (2017) Structural insight into allosteric modulation of protease-activated receptor 2, *Nature*, **545**, 112–115.
- Rappas, M., Ali, A.A.E., Bennett, K.A., Brown, J.D., Bucknell, S.J., Congreve, M., Cooke, R.M., Cseke, G., De Graaf, C., Doré, A.S., et al. (2020) Comparison of Orexin 1 and Orexin 2 Ligand Binding Modes Using X-ray Crystallography and Computational Analysis, *Journal* of Medicinal Chemistry, 63, 1528– 1543.
- 40. Brown, A.J.H., Bradley, S.J., Marshall, F.H., Brown, G.A., Bennett, K.A., Brown, J., Cansfield, J.E., Cross, D.M., de Graaf, C., Hudson, B.D., et al. (2021) From structure to clinic: Design of a muscarinic M1 receptor agonist with potential to treatment of Alzheimer's disease, *Cell*, **184**, 5886-5901,e22.
- 41. Warne, T., Moukhametzianov, R., Baker, J.G., Nehmé, R., Edwards, P.C., Leslie, A.G.W., Schertler, G.F.X., Tate, C.G. (2011) The structural basis for agonist and partial agonist action on a β1-adrenergic receptor, *Nature*, **469**, 241–245.
- 42. Doré, A.S., Robertson, N., Errey, J.C., Ng, I., Hollenstein, K., Tehan, B., Hurrell, E., Bennett, K., Congreve, M., Magnani, F., et al. (2011) Structure of the adenosine A 2A receptor in complex with ZM241385 and the xanthines XAC and caffeine, Structure, 19, 1283–1293.
- 43. Moukhametzianov, R., Warne, T., Edwards, P.C., Serrano-Vega, M.J., Leslie, A.G.W., Tate, C.G., Schertler, G.F.X. (2011) Two distinct conformations of helix 6 observed in antagonist-bound structures of a β1adrenergic receptor, *Proceedings of* the National Academy of Sciences of the United States of America, 108, 8228–8232.

- 44. White, J.F., Noinaj, N., Shibata, Y., Love, J., Kloss, B., Xu, F., Gvozdenovic-Jeremic, J., Shah, P., Shiloach, J., Tate, C.G., et al. (2012) Structure of the agonist-bound neurotensin receptor, *Nature*, **490**, 508–513.
- 45. Warne, T., Edwards, P.C., Leslie, A.G.W., Tate, C.G. (2012) Crystal structures of a stabilized β1-adrenoceptor bound to the biased agonists bucindolol and carvedilol, *Structure*, **20**, 841–849.
- Christopher, J.A., Brown, J., Doré, A.S., Errey, J.C., Koglin, M., Marshall, F.H., Myszka, D.G., Rich, R.L., Tate, C.G., Tehan, B., et al. (2013) Biophysical fragment screening of the β1-adrenergic receptor: Identification of high affinity arylpiperazine leads using structure-based drug design, *Journal of Medicinal Chemistry*, 56, 3446–3455.
- 47. Egloff, P., Hillenbrand, M., Klenk, C., Batyuk, A., Heine, P., Balada, S., Schlinkmann, K.M., Scott, D.J., Schütz, M., Plückthun, A. (2014) Structure of signaling-competent neurotensin receptor 1 obtained by directed evolution in Escherichia coli, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 111, E655–E662.
- 48. Miller-Gallacher, J.L., Nehmé, R., Warne, T., Edwards, P.C., Schertler, G.F.X., Leslie, A.G.W., Tate, C.G. (2014) The 2.1 Å resolution structure of cyanopindolol-bound β1adrenoceptor identifies an intramembrane Na+ ion that stabilises the ligand-free receptor, *PLoS ONE*, 9, e92727.
- Waltenspühl, Y., Jeliazkov, J.R., Kummer, L., Plückthun, A. (2021) Directed evolution for high functional production and stability of a challenging G protein-coupled receptor., Scientific reports, 11, 8630.
- 50. Sarkar, C.A., Dodevski, I., Kenig, M., Dudli, S., Mohr, A., Hermans,

- E., Plückthun, A. (2008) Directed evolution of a G protein-coupled receptor for expression, stability, and binding selectivity, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 14808–14813.
- Scott, D.J., Plückthun, A. (2013) Direct molecular evolution of detergent-stable g protein-coupled receptors using polymer encapsulated cells, *Journal of Molecular Biology*, 425, 662–677.
- Schlinkmann, K.M., Hillenbrand, M., Rittner, A., Künz, M., Strohner, R., Plückthun, A. (2012) Maximizing detergent stability and functional expression of a GPCR by exhaustive recombination and evolution, *Journal* of Molecular Biology, 422, 414–428.
- Schütz, M., Schöppe, J., Sedlák, E., Hillenbrand, M., Nagy-Davidescu, G., Ehrenmann, J., Klenk, C., Egloff, P., Kummer, L., Plückthun, A. (2016) Directed evolution of G proteincoupled receptors in yeast for higher functional production in eukaryotic expression hosts, *Scientific Reports*, 6, 21508.
- Waltenspühl, Y., Schöppe, J., Ehrenmann, J., Kummer, L., Plückthun, A. (2020) Crystal structure of the human oxytocin receptor., *Science advances*, 6, eabb5419.
- Ehrenmann, J., Schöppe, J., Klenk, C., Rappas, M., Kummer, L., Doré, A.S., Plückthun, A. (2018) Highresolution crystal structure of parathyroid hormone 1 receptor in complex with a peptide agonist, *Nature Structural and Molecular Biology*, 25, 1086–1092.
- Claff, T., Yu, J., Blais, V., Patel, N., Martin, C., Wu, L., Han, G.W., Holleran, B.J., Van der Poorten, O., White, K.L., et al. (2019) Elucidating the active δ-opioid receptor crystal structure with peptide and small-molecule agonists, *Science advances*, 5, eaax9115.

- 57. Meltzer, M., Zvagelsky, T., Hadad, U., Papo, N., Engel, S. (2022) Yeast-based directed-evolution for high-throughput structural stabilization of G protein-coupled receptors (GPCRs), Scientific Reports, 12, 1–14.
- 58. Popov, P., Peng, Y., Shen, L., Stevens, R.C., Cherezov, V., Liu, Z.J., Katritch, V. (2018) Computational design of thermostabilizing point mutations for G protein-coupled receptors, *eLife*, 7, 7:e34729.
- Arey, B. J. (2012) Glycosylation. The Role of Glycosylation in Receptor Signaling. London: IntechOpen. 273–286.
- Pándy-Szekeres, G., Munk, C., Tsonkov, T.M., Mordalski, S., Harpsøe, K., Hauser, A.S., Bojarski, A.J., Gloriam, D.E. (2018) GPCRdb in 2018: Adding GPCR structure models and ligands, *Nucleic Acids Research*, 46, D440–D446.
- 61. Hamby, S.E., Hirst, J.D. (2008) Prediction of glycosylation sites using random forests, *BMC Bioinformatics*, **9**, 500.
- 62. Xie, H.L., Fu, L., Nie, X. Du. (2013) Using ensemble SVM to identify human GPCRs N-linked glycosylation sites based on the general form of Chou's PseAAC, *Protein Engineering, Design and Selection*, **26**, 735–742.
- 63. West, G.M., Chien, E.Y.T., Katritch, V., Gatchalian, J., Chalmers, M.J., Stevens, R.C., Griffin, P.R. (2011) Ligand-dependent perturbation of the conformational ensemble for the GPCR β 2 adrenergic receptor revealed by HDX, Structure, 19, 1424–1432.
- 64. Chun, E., Thompson, A.A., Liu, W., Roth, C.B., Griffith, M.T., Katritch, V., Kunken, J., Xu, F., Cherezov, V., Hanson, M.A., et al. (2012) Fusion Partner Toolchest for the Stabilization and Crystallization of G

- Protein-Coupled Receptors, *Structure*, 967–976.
- 65. Guan, X.M., Tong Sun Kobilka, Kobilka, B.K. (1992) Enhancement of membrane insertion and function in a type IIIb membrane protein following introduction of a cleavable signal peptide, *Journal of Biological Chemistry*, 267, 21995–21998.
- 66. Quitterer, U., Pohl, A., Langer, A., Koller, S., AbdAlla, S. (2011) A cleavable signal peptide enhances cell surface delivery and heterodimerization of Cerulean-tagged angiotensin II AT1 and bradykinin B2 receptor, Biochemical and Biophysical Research Communications, 409, 544–549.
- 67. Zhang, S., Hansen, D.T., Martin-Garcia, J.M., Zook, J.D., Pan, S., Craciunescu, F.M., Burnett, J.C., Fromme, P. (2022) Purification, characterization, and preliminary serial crystallography diffraction advances structure determination of full-length human particulate guanylyl cyclase A receptor., *Scientific reports*, 12, 11824.
- 68. Koehl, A., Hu, H., Feng, D., Sun, B., Zhang, Y., Robertson, M.J., Chu, M., Kobilka, T.S., Laeremans, T., Steyaert, J., et al. (2019) Structural insights into the activation of metabotropic glutamate receptors, *Nature*, 566, 79–84.
- Watkins, L.R., Orlandi, C. (2021) In vitro profiling of orphan G protein coupled receptor (GPCR) constitutive activity, *British journal of* pharmacology, 178, 2963–2975.
- Sherrill, J.D., Miller, W.E. (2006) G Protein-coupled Receptor (GPCR) Kinase 2 Regulates Agonist-independent Gq/11 Signaling from the Mouse Cytomegalovirus GPCR M33, *Journal of Biological Chemistry*, 281, 39796–39805.
- 71. Böhme, I., Beck-Sickinger, A.G. (2009) Illuminating the life of

- GPCRs, Cell Communication and Signaling, 7, 16.
- Kobilka, B.K. (1995) Amino and carboxyl terminal modifications to facilitate the production and purification of a G protein-coupled receptor, *Analytical Biochemistry*, 231, 269–271.
- Prickett, K.S., Amberg, D.C., Hopp, T.P. (1989) A calcium-dependent antibody for identification and purification of recombinant proteins, *BioTechniques*, 7, 580–589.
- Beerepoot, P., Lam, V.M., Salahpour, A. (2013) Measurement of G proteincoupled receptor surface expression, *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 33, 162–165.
- Shao, Z., Shen, Q., Yao, B., Mao, C., Chen, L.-N., Zhang, H., Shen, D.-D., Zhang, C., Li, W., Du, X., et al. (2022) Identification and mechanism of G protein-biased ligands for chemokine receptor CCR1, *Nature Chemical Biology*, 18, 264–271.
- Bertin, B., Freissmuth, M., Breyer, R.M., Schutz, W., Strosberg, A.D., Marullo, S. (1992) Functional expression of the human serotonin 5-HT1A receptor in Escherichia coli. Ligand binding properties and interaction with recombinant G protein α-subunits, *Journal of Biological Chemistry*, 267, 8200–8206.
- Grisshammer, R., Duckworth, R., Henderson, R. (1993) Expression of a rat neurotensin receptor in Escherichia coli, *Biochemical Journal*, 295, 571–576.
- Park, S.H., Das, B.B., Casagrande, F., Tian, Y., Nothnagel, H.J., Chu, M., Kiefer, H., Maier, K., De Angelis, A.A., Marassi, F.M., et al. (2012) Structure of the chemokine receptor CXCR1 in phospholipid bilayers, Nature, 491, 779–783.
- Schmidt, T.G.M., Skerra, A. (1993)
 The random peptide library-assisted engineering of a c-terminal affinity

- peptide, useful for the detection and purification of a functional ig Fv fragment, *Protein Engineering*, *Design and Selection*, **6**, 109–122.
- 80. Zhu, Y., Lin, X., Zong, X., Han, S., Wang, M., Su, Y., Ma, L., Chu, X., Yi, C., Zhao, Q., et al. (2022) Structural basis of FPR2 in recognition of Aβ42 and neuroprotection by humanin, *Nature Communications*, 13, 1775.
- Klein, J.S., Jiang, S., Galimidi, R.P., Keeffe, J.R., Bjorkman, P.J., Regan, L. (2014) Design and characterization of structured protein linkers with differing flexibilities, *Protein Engineering, Design and Selection*, 27, 325–330.
- 82. Lohse, M.J., Maiellaro, I., Calebiro, D. (2014) Kinetics and mechanism of G protein-coupled receptor activation, *Current Opinion in Cell Biology*, **27**, 87–93.
- Xiang, J., Chun, E., Liu, C., Jing, L., Al-Sahouri, Z., Zhu, L., Liu, W. (2016) Successful Strategies to Determine High-Resolution Structures of GPCRs, *Trends in Pharma*cological Sciences, 37, 1055–1069.
- 84. Rosenbaum, D.M., Cherezov, V., Hanson, M.A., Rasmussen, S.G.F.F., Thian, F.S., Kobilka, T.S., Choi, H.-J.J., Yao, X.-J.J., Weis, W.I., Stevens, R.C., et al. (2007) GPCR Engineering Yields High-Resolution Structural Insights into β2-Adrenergic Receptor Function, *Science*, 318, 1266–1273.
- 85. Rasmussen, S.G.F., Devree, B.T., Zou, Y., Kruse, A.C., Chung, K.Y., Kobilka, T.S., Thian, F.S., Chae, P.S., Pardon, E., Calinski, D., et al. (2011) Crystal structure of the β2 adrenergic receptor-Gs protein complex, *Nature*, 477, 549–557.
- 86. Zhang, H., Qiao, A., Yang, D., Yang, L., Dai, A., De Graaf, C., Reedtz-Runge, S., Dharmarajan, V., Zhang, H., Han, G.W., et al. (2017) Structure of the full-length glucagon class B

- G-protein-coupled receptor, *Nature*, **546**, 259–264.
- Yeliseev, A., Zoubak, L., Gawrisch, K. (2007) Use of dual affinity tags for expression and purification of functional peripheral cannabinoid receptor, *Protein Expression and Purification*, 53, 153–163.
- 88. Johansson, L.C., Stauch, B., McCorvy, J.D., Han, G.W., Patel, N., Huang, X.-P., Batyuk, A., Gati, C., Slocum, S.T., Li, C., et al. (2019) XFEL structures of the human MT2 melatonin receptor reveal the basis of subtype selectivity, *Nature*, 569, 289–292.
- 89. Yin, J., Mobarec, J.C., Kolb, P., Rosenbaum, D.M. (2015) Crystal structure of the human OX2 orexin receptor bound to the insomnia drug suvorexant, *Nature*, **519**, 247–250.
- Ishihara, G., Goto, M., Saeki, M., Ito, K., Hori, T., Kigawa, T., Shirouzu, M., Yokoyama, S. (2005) Expression of G protein coupled receptors in a cell-free translational system using detergents and thioredoxin-fusion vectors, *Protein Expression and Pu*rification, 41, 27–37.
- 91. Krepkiy, D., Wong, K., Gawrisch, K., Yeliseev, A. (2006) Bacterial expression of functional, biotinylated peripheral cannabinoid receptor CB2, *Protein Expression and Purification*, **49**, 60–70.
- 92. Nehmé, R., Carpenter, B., Singhal, A., Strege, A., Edwards, P.C., White, C.F., Du, H., Grisshammer, R., Tate, C.G. (2017) Mini-G proteins: Novel tools for studying GPCRs in their active conformation, *PLOS ONE*, 12, e0175642.
- 93. García-Nafría, J., Lee, Y., Bai, X., Carpenter, B., Tate, C.G. (2018) Cryo-EM structure of the adenosine A2A receptor coupled to an engineered heterotrimeric G protein., *eLife*, 7, e35946.

- 94. Mittl, P.R., Ernst, P., Plückthun, A. (2020) Chaperone-assisted structure elucidation with DARPins, *Current Opinion in Structural Biology*, **60**, 93–100.
- Deluigi, M., Klipp, A., Klenk, C., Merklinger, L., Eberle, S.A., Morstein, L., Heine, P., Mitt, P.R.E., Ernst, P., Kamenecka, T.M., et al. (2021) Complexes of the neurotensin receptor 1 with small-molecule ligands reveal structural determinants of full, partial, and inverse agonism, *Science Advan*ces, 7, 5504–5531.
- Deluigi, M., Morstein, L., Schuster, M., Klenk, C., Merklinger, L., Cridge, R.R., de Zhang, L.A., Klipp, A., Vacca, S., Vaid, T.M., et al. (2022) Crystal structure of the α1B-adrenergic receptor reveals molecular determinants of selective ligand recognition, *Nature Com*munications, 13, 382.
- 97. Li, J., Mahajan, A., Tsai, M.D. (2006) Ankyrin repeat: A unique motif mediating protein-protein interactions, *Biochemistry*, **45**, 15168–15178.
- 98. Wu, Y., Batyuk, A., Honegger, A., Brandl, F., Mittl, P.R.E., Plückthun, A. (2017) Rigidly connected multispecific artificial binders with adjustable geometries, *Scientific Reports*, 7, 1–11.
- Okada, T., Takeda, K., Kouyama, T. (1998) Highly Selective Separation of Rhodopsin from Bovine Rod Outer Segment Membranes Using Combination of Divalent Cation and Alkyl(thio)glucoside, *Photo-chemistry and Photobiology*, 67, 495–499.
- 100. Okada, T., Le Trong, I., Fox, B.A., Behnke, C.A., Stenkamp, R.E., Palczewski, K. (2000) X-ray diffraction analysis of three-dimensional crystals of Bovine Rhodopsin obtained from mixed micelles,

- Journal of Structural Biology, **130**, 73–80
- Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C.A., Motoshima, H., Fox, B.A., Trong, I. Le, Teller, D.C., Okada, T., Stenkamp, R.E., et al. (2000) Crystal Structure of Rhodopsin: A G Protein-Coupled Receptor, Science, 289, 739–745.
- 102. Murakami, M., Kouyama, T. (2008) Crystal structure of squid rhodopsin, *Nature*, 453, 363–367.
- 103. Sahdev, S., Khattar, S.K., Saini, K.S. (2008) Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: A review of the existing biotechnology strategies, Molecular and Cellular Biochemistry, 307, 249–264.
- 104. 104. Qu, X., Wang, D., Wu, B. (2020) GPCRs. Chapter 1 Progress in GPCR structure determination. Elsevier. 3–22.
- 105. Ledesma, L., Sandoval, E., Cruz-Martínez, U., Escalante, A.M., Mejía, S., Moreno-Álvarez, P., Ávila, E., García, E., Coello, G., Torres-Quiroz, F. (2018) YAAM: Yeast Amino Acid Modifications Database, *Database*, 2018, bax099.
- 106. Byrne, B. (2015) Pichia pastoris as an expression host for membrane protein structural biology, *Current Opinion in Structural Biology*, 32, 9–17.
- 107. He, Y., Wang, K., Yan, N. (2014) The recombinant expression systems for structure determination of eukaryotic membrane proteins, *Protein & cell*, **5**, 658–672.
- 108. Shimamura, T., Shiroishi, M., Weyand, S., Tsujimoto, H., Winter, G., Katritch, V., Abagyan, R., Cherezov, V., Liu, W., Han, G.W., et al. (2011) Structure of the human histamine H 1 receptor complex with doxepin, *Nature*, 475, 65–72.

- 109. Hino, T., Arakawa, T., Iwanari, H., Yurugi-Kobayashi, T., Ikeda-Suno, C., Nakada-Nakura, Y., Kusano-Arai, O., Weyand, S., Shimamura, T., Nomura, N., et al. (2012) G-protein-coupled receptor inactivation by an allosteric inverse-agonist antibody, *Nature*, 482, 237–240.
- 110. Eddy, M.T., Lee, M.Y., Gao, Z.G., White, K.L., Didenko, T., Horst, R., Audet, M., Stanczak, P., McClary, K.M., Han, G.W., et al. (2018) Allosteric Coupling of Drug Binding and Intracellular Signaling in the A2A Adenosine Receptor, Cell, 172, 68-80.e12.
- 111. Hori, T., Okuno, T., Hirata, K., Yamashita, K., Kawano, Y., Yamamoto, M., Hato, M., Nakamura, M., Shimizu, T., Yokomizo, T., et al. (2018) Na+-mimicking ligands stabilize the inactive state of leukotriene B 4 receptor BLT1, *Nature Chemical Biology*, 14, 262–269.
- 112. Harrison, R.L., Jarvis, D.L. (2006)
 Protein N-Glycosylation in the Baculovirus-Insect Cell Expression
 System and Engineering of Insect
 Cells to Produce "Mammalianized" Recombinant Glycoproteins,
 Advances in Virus Research, 68,
 159–191.
- Thomas, J., Tate, C.G. (2014) Quality control in eukaryotic membrane protein overproduction, *Journal of molecular biology*, 426, 4139–4154.
- 114. Ghaderi, D., Zhang, M., Hurtado-Ziola, N., Varki, A. (2012) Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation, *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 28, 147–176.
- 115. Milić, D., Veprintsev, D.B. (2015) Large-scale production and protein engineering of G protein-coupled receptors for structural studies, Frontiers in Pharmacology, 6, 66.

- 116. Warne, T., Chirnside, J., Schertler, G.F.X. (2003) Expression and purification of truncated, non-glycosylated turkey beta-adrenergic receptors for crystallization, *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*, 1610, 133–140.
- 117. Chien, E.Y.T., Liu, W., Zhao, Q., Katritch, V., Han, G.W., Hanson, M.A., Shi, L., Newman, A.H., Javitch, J.A., Cherezov, V., et al. (2010) Structure of the human dopamine D3 receptor in complex with a D2/D3 selective antagonist, *Science*, **330**, 1091–1095.
- 118. Luckow, V.A., Lee, S.C., Barry, G.F., Olins, P.O. (1993) Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in Escherichia coli, *Journal of Virology*, **67**, 4566–4579.
- Contreras-Gómez, A., Sánchez-Mirón, A., García-Camacho, F., Molina-Grima, E., Chisti, Y. (2014) Protein production using the baculovirus-insect cell expression system, *Biotechnology Progress*, 30, 1–18
- 120. Chaudhary, S., Pak, J.E., Gruswitz, F., Sharma, V., Stroud, R.M. (2012) Overexpressing human membrane proteins in stably transfected and clonal human embryonic kidney 293S cells, *Nature Protocols*, 7, 453–466.
- 121. Fricker, S.P., Anastassov, V., Cox, J., Darkes, M.C., Grujic, O., Idzan, S.R., Labrecque, J., Lau, G., Mosi, R.M., Nelson, K.L., et al. (2006) Characterization of the molecular pharmacology of AMD3100: A specific antagonist of the G-protein coupled chemokine receptor, CXCR4, *Biochemical Pharmacology*, 72, 588–596.

- 122. Cheng, Z., Garvin, D., Paguio, A., Stecha, P., Wood, K., Fan, F. (2012) Luciferase Reporter Assay System for Deciphering GPCR Pathways, Current Chemical Genomics, 4, 84–91.
- 123. Tate, C.G. (2001) Overexpression of mammalian integral membrane proteins for structural studies, *FEBS Letters*, **504**, 94–98.
- 124. Andréll, J., Tate, C.G. (2013) Overexpression of membrane proteins in mammalian cells for structural studies., *Molecular membrane biology*, **30**, 52–63.
- 125. Mikami, S., Kobayashi, T., Masutani, M., Yokoyama, S., Imataka, H. (2008) A human cell-derived in vitro coupled transcription/translation system optimized for production of recombinant proteins, *Protein Expression and Purification*, **62**, 190–198.
- 126. Goren, M.A., Nozawa, A., Makino, S. ichi, Wrobel, R.L., Fox, B.G. (2009) Chapter 37 Cell-Free Translation of Integral Membrane Proteins into Unilamelar Liposomes, *Methods in Enzymology*, **463**, 647–673.
- 127. Kögler, L.M., Stichel, J., Beck-Sickinger, A.G. (2019) Structural investigations of cell-free expressed G protein-coupled receptors, *Biological Chemistry*, 401, 97–116.
- 128. Schwarz, D., Junge, F., Durst, F., Frölich, N., Schneider, B., Reckel, S., Sobhanifar, S., Dötsch, V., Bernhard, F. (2007) Preparative scale expression of membrane proteins in Escherichia coli-based continuous exchange cell-free systems., *Nature* protocols, 2, 2945–2957.
- 129. Proverbio, D., Henrich, E., Orbán, E., Dötsch, V., Bernhard, F. (2014) Membrane protein quality control in cell-free expression systems: Tools, strategies and case studies,

- Membrane Proteins Production for Structural Analysis, 45–70.
- 130. Zemella, A., Thoring, L., Hoff-meister, C., Kubick, S. (2015) Cell-Free Protein Synthesis: Pros and Cons of Prokaryotic and Eukaryotic Systems, *ChemBioChem*, **16**, 2420–2431.
- 131. Klammt, C., Schwarz, D., Löhr, F., Schneider, B., Dötsch, V., Bernhard, F. (2006) Cell-free expression as an emerging technique for the large scale production of integral membrane protein, FEBS Journal, 273, 4141–4153.
- 132. Quast, R.B., Mrusek, D., Hoff-meister, C., Sonnabend, A., Kubick, S. (2015) Cotranslational incorporation of non-standard amino acids using cell-free protein synthesis, FEBS Letters, 589, 1703–1712.
- 133. Klammt, C., Schwarz, D., Eifler, N., Engel, A., Piehler, J., Haase, W., Hahn, S., Dötsch, V., Bernhard, F. (2007) Cell-free production of G protein-coupled receptors for functional and structural studies, *Journal of Structural Biology*, **158**, 482–493.
- 134. Henrich, E., Dötsch, V., Bernhard, F. (2015) Screening for lipid requirements of membrane proteins by combining cell-free expression with nanodiscs, *Methods in Enzymology*, **556**, 351–369.
- 135. Boland, C., Li, D., Shah, S.T.A., Haberstock, S., Dötsch, V., Bernhard, F., Caffrey, M. (2014) Cellfree expression and in meso crystallisation of an integral membrane kinase for structure determination, Cellular and Molecular Life Sciences, 71, 4895–4910.
- 136. Umbach, S., Dötsch, V., Bernhard, F. (2022) Cell-Free Expression of GPCRs into Nanomembranes for Functional and Structural Studies, *Methods in Molecular Biology*, **2507**, 405–424.

- 137. Carlson, E.D., Gan, R., Hodgman, C.E., Jewett, M.C. (2012) Cell-free protein synthesis: Applications come of age, *Biotechnology Advances*, **30**, 1185–1194.
- 138. Tarui, H., Imanishi, S., Hara, T. (2000) A novel cell-free translation/ glycosylation system prepared from insect cells, *Journal of Bioscience* and Bioengineering, 90, 508–514.
- 139. Suzuki, T., Ito, M., Ezure, T., Shikata, M., Ando, E., Utsumi, T., Tsunasawa, S., Nishimura, O. (2006) N-terminal protein modifications in an insect cell-free protein synthesis system and their identification by mass spectrometry, *Proteomics*, 6, 4486–4495.
- 140. Hancock, J.F. (1995) Reticulocyte Lysate Assay for in Vitro Translation and Posttranslational Modification of Ras Proteins, *Methods in Enzy-mology*, 255, 60–65.
- 141. Brödel, A.K., Sonnabend, A., Kubick, S. (2014) Cell-free protein expression based on extracts from CHO cells, *Biotechnology and Bioengineering*, **111**, 25–36.
- 142. Foshag, D., Henrich, E., Hiller, E., Schäfer, M., Kerger, C., Burger-Kentischer, A., Diaz-Moreno, I., García-Mauriño, S.M., Dötsch, V., Rupp, S., et al. (2018) The E. coli S30 lysate proteome: A prototype for cell-free protein production, New Biotechnology, 40, 245–260.
- 143. Yin, G., Swartz, J.R. (2004) Enhancing Multiple Disulfide Bonded Protein Folding in a Cell-Free System, *Biotechnology and Bioengineering*, **86**, 188–195.
- 144. Kim, D.M., Swartz, J.R. (2004) Efficient Production of a Bioactive, Multiple Disulfide-Bonded Protein Using Modified Extracts of Escherichia coli, *Biotechnology and Bioengineering*, 85, 122–129.
- 145. Goerke, A.R., Swartz, J.R. (2008) Development of cell-free protein

- synthesis platforms for disulfide bonded proteins, *Biotechnology and Bioengineering*, **99**, 351–367.
- 146. Jaroentomeechai, T., Stark, J.C., Natarajan, A., Glasscock, C.J., Yates, L.E., Hsu, K.J., Mrksich, M., Jewett, M.C., Delisa, M.P. (2018) Single-pot glycoprotein biosynthesis using a cell-free transcription-translation system enriched with glycosylation machinery, *Nature Communications*, 9, 1–11.
- 147. Schoborg, J.A., Hershewe, J.M., Stark, J.C., Kightlinger, W., Kath, J.E., Jaroentomeechai, T., Natarajan, A., DeLisa, M.P., Jewett, M.C. (2018) A cell-free platform for rapid synthesis and testing of active oligosaccharyltransferases, *Biotechnology and Bioengineering*, 115, 739–750.
- 148. Kightlinger, W., Lin, L., Rosztoczy, M., Li, W., Delisa, M.P., Mrksich, M., Jewett, M.C. (2018) Design of glycosylation sites by rapid synthesis and analysis of glycosyltransferases article, *Nature Chemical Biology*, 14, 627–635.
- 149. Suzuki, Y., Ogasawara, T., Tanaka, Y., Takeda, H., Sawasaki, T., Mogi, M., Liu, S., Maeyama, K. (2018) Functional G-protein-coupled receptor (GPCR) synthesis: The pharmacological analysis of human histamine H1 receptor (HRH1) synthesized by a wheat germ cell-free protein synthesis system combined with asolectin glycerosomes, Frontiers in Pharmacology, 9, 38.
- 150. Yang, J.P., Cirico, T., Katzen, F., Peterson, T.C., Kudlicki, W. (2011) Cell-free synthesis of a functional G protein-coupled receptor complexed with nanometer scale bilayer discs, BMC Biotechnology, 11, 1–8.
- Sonnabend, A., Spahn, V., Stech, M., Zemella, A., Stein, C., Kubick, S. (2017) Production of G proteincoupled receptors in an insect-based

- cell-free system, *Biotechnology and Bioengineering*, **114**, 2328–2338.
- 152. Junge, F., Luh, L.M., Proverbio, D., Schäfer, B., Abele, R., Beyermann, M., Dötsch, V., Bernhard, F. (2010) Modulation of G-protein coupled receptor sample quality by modified cell-free expression protocols: A case study of the human endothelin A receptor, *Journal of Structural Biology*, 172, 94–106.
- 153. Zemella, A., Grossmann, S., Sachse, R., Sonnabend, A., Schaefer, M., Kubick, S. (2017) Qualifying a eukaryotic cell-free system for fluorescence based GPCR analyses, *Scientific Reports*, 7, 1–10.
- 154. Rues, R.B., Dong, F., Dötsch, V., Bernhard, F. (2018) Systematic optimization of cell-free synthesized human endothelin B receptor folding, *Methods*, **147**, 73–83.
- 155. Takeda, H., Ogasawara, T., Ozawa, T., Muraguchi, A., Jih, P.J., Morishita, R., Uchigashima, M., Watanabe, M., Fujimoto, T., Iwasaki, T., et al. (2015) Production of monoclonal antibodies against GPCR using cell-free synthesized GPCR antigen and biotinylated liposome-based interaction assay, *Scientific Reports*, 5, 1–14.
- 156. Wada, T., Shimono, K., Kikukawa, T., Hato, M., Shinya, N., Kim, S.Y., Kimura-Someya, T., Shirouzu, M., Tamogami, J., Miyauchi, S., et al. (2011) Crystal structure of the eukaryotic light-driven proton-pumping rhodopsin, Acetabularia rhodopsin II, from marine alga, *Journal of Molecular Biology*, 411, 986–998.
- 157. Chen, Y.J., Pornillos, O., Lieu, S., Ma, C., Chen, A.P., Chang, G. (2007) X-ray structure of EmrE supports dual topology model, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 18999–19004.

- 158. Bornhorst, J.A., Falke, J.J. (2000) Purification of proteins using polyhistidine affinity tags, *Methods in Enzymology*, **326**, 245–254.
- 159. Qu, X., Qiu, N., Wang, M., Zhang, B., Du, J., Zhong, Z., Xu, W., Chu, X., Ma, L., Yi, C., et al. (2022) Structural basis of tethered agonism of the adhesion GPCRs ADGRD1 and ADGRF1, *Nature*, 604, 779–785.
- 160. Bous, J., Orcel, H., Floquet, N., Leyrat, C., Lai-Kee-Him, J., Gaibelet, G., Ancelin, A., Saint-Paul, J., Trapani, S., Louet, M., et al. (2021) Cryo–electron microscopy structure of the antidiuretic hormone arginine-vasopressin V2 receptor signaling complex, Science Advances, 7, eabg5628.
- 161. Cong, Z., Chen, L.N., Ma, H., Zhou, Q., Zou, X., Ye, C., Dai, A., Liu, Q., Huang, W., Sun, X., et al. (2021) Molecular insights into agoallosteric modulation of the human glucagon-like peptide-1 receptor, *Nature Communications*, 12, 1–11.
- 162. Ma, S., Shen, Q., Zhao, L.H., Mao, C., Zhou, X.E., Shen, D.D., de Waal, P.W., Bi, P., Li, C., Jiang, Y., et al. (2020) Molecular Basis for Hormone Recognition and Activation of Corticotropin-Releasing Factor Receptors, *Molecular Cell*, 77, 669-680.e4.
- 163. Wang, H., Hetzer, F., Huang, W., Qu, Q., Meyerowitz, J., Kaindl, J., Hübner, H., Skiniotis, G., Kobilka, B.K., Gmeiner, P. (2022) Structure-Based Evolution of G Protein-Biased μ-Opioid Receptor Agonists, Angewandte Chemie International Edition, 61, e202200269.
- 164. Cao, J., Belousoff, M.J., Liang, Y.-L., Johnson, R.M., Josephs, T.M., Fletcher, M.M., Christopoulos, A., Hay, D.L., Danev, R., Wootten, D., et al. (2022) A structural basis for amylin receptor phenotype, *Science*, **375**, eabm9609.

- 165. Bokoch, M.P., Zou, Y., Rasmussen, S.G.F., Liu, C.W., Nygaard, R., Rosenbaum, D.M., Fung, J.J., Choi, H.J., Thian, F.S., Kobilka, T.S., et al. (2010) Ligand-specific regulation of the extracellular surface of a G-protein-coupled receptor, *Nature*, 463, 108–112.
- 166. Rosenbaum, D.M., Zhang, C., Lyons, J.A., Holl, R., Aragao, D., Arlow, D.H., Rasmussen, S.G.F., Choi, H.J., Devree, B.T., Sunahara, R.K., et al. (2011) Structure and function of an irreversible agonist-β2 adrenoceptor complex, *Nature*, **469**, 236–242.
- 167. Brizzard, B.L., Chubet, R.G., Vizard, D.L. (1994) Immunoaffinity purification of FLAG® epitopetagged bacterial alkaline phosphatase using a novel monoclonal antibody and peptide elution, *BioTechniques*, 16, 730-732+734.
- 168. Slootstra, J.W. (1997) Identification of new tag sequences with differential and selective recognition properties for the anti-FLAG monoclonal antibodies Ml, M2 and M5, *Molecular Diversity*, **2**, 156–164.
- 169. Park, S.H., Cheong, C., Idoyaga, J., Kim, J.Y., Choi, J.H., Do, Y., Lee, H., Jo, J.H., Oh, Y.S., Im, W., et al. (2008) Generation and application of new rat monoclonal antibodies against synthetic FLAG and OLLAS tags for improved immunodetection, *Journal of Immunological Methods*, 331, 27–38.
- 170. Gerace, E., Moazed, D. (2015) Affinity Pull-Down of Proteins Using Anti-FLAG M2 Agarose Beads, *Methods in Enzymology*, 559, 99–110.
- 171. Tsai, C.J., Pamula, F., Nehmé, R., Mühle, J., Weinert, T., Flock, T., Nogly, P., Edwards, P.C., Carpenter, B., Gruhl, T., et al. (2018) Crystal structure of rhodopsin in complex with a mini-Go sheds light on the

- principles of G protein selectivity, *Science Advances*, **4**, 7052.
- 172. Zhao, D.Y., Pöge, M., Morizumi, T., Gulati, S., Van Eps, N., Zhang, J., Miszta, P., Filipek, S., Mahamid, J., Plitzko, J.M., et al. (2019) Cryo-EM structure of the native rhodopsin dimer in nanodiscs, *Journal of Biological Chemistry*, **294**, 14215–14230.
- 173. Wong, J.P., Reboul, E., Molday, R.S., Kast, J. (2009) A carboxy-terminal affinity tag for the purification and mass spectrometric characterization of integral membrane proteins, *Journal of Proteome Research*, **8**, 2388–2396.
- 174. Langlois, M., Brémont, B., Rousselle, D., Gaudy, F. (1993) Structural analysis by the comparative molecular field analysis method of the affinity of β-adrenoreceptor blocking agents for 5-HT1A and 5-HT1B receptors, European Journal of Pharmacology: Molecular Pharmacology, 244, 77–87.
- 175. Sun, R., Mak, S., Haschemi, J., Horn, P., Boege, F., Luppa, P.B. (2019) Nanodiscs Incorporating Native β1 Adrenergic Receptor as a Novel Approach for the Detection of Pathological Autoantibodies in Patients with Dilated Cardiomyopathy, *The journal of applied laboratory medicine*, 4, 391–403.
- 176. Parker, E.M., Kameyama, K., Higashijima, T., Ross, E.M. (1991) Reconstitutively active G protein-coupled receptors purified from baculovirus-infected insect cells, *Journal of Biological Chemistry*, **266**, 519–527.
- 177. Stadel, J.M. (1985) Photoaffinity labeling of β-adrenergic receptors, *Pharmacology and Therapeutics*, **31**, 57–77.
- 178. Caron, M.G., Srinivasan, Y., Pitha, J., Kociolek, K., Lefkowitz, R.J. (1979) Affinity chromatography

- of the β adrenergic receptor, *Journal of Biological Chemistry*, **254**, 2923–2927.
- 179. Ring, A.M., Manglik, A., Kruse, A.C., Enos, M.D., Weis, W.I., Garcia, K.C., Kobilka, B.K. (2013) Adrenaline-activated structure of β 2-adrenoceptor stabilized by an engineered nanobody, *Nature*, **502**, 575–579.
- 180. Masureel, M., Zou, Y., Picard, L.P., van der Westhuizen, E., Mahoney, J.P., Rodrigues, J.P.G.L.M., Mildorf, T.J., Dror, R.O., Shaw, D.E., Bouvier, M., et al. (2018) Structural insights into binding specificity, efficacy and bias of a β2AR partial agonist, *Nature Chemical Biology*, 14, 1059–1066.
- 181. Haga, K., Kruse, A.C., Asada, H., Yurugi-Kobayashi, T., Shiroishi, M., Zhang, C., Weis, W.I., Okada, T., Kobilka, B.K., Haga, T., et al. (2012) Structure of the human M2 muscarinic acetylcholine receptor bound to an antagonist, *Nature*, **482**, 547–551.
- 182. Edwards, P.C., Li, J., Burghammer, M., Hugh McDowell, J., Villa, C., Hargrave, P.A., Schertler, G.F.X. (2004) Crystals of native and modified bovine rhodopsins and their heavy atom derivatives, *Journal of Molecular Biology*, 343, 1439–1450.
- 183. Rasmussen, S.G.F., Choi, H.J., Rosenbaum, D.M., Kobilka, T.S., Thian, F.S., Edwards, P.C., Burghammer, M., Ratnala, V.R.P., Sanishvili, R., Fischetti, R.F., et al. (2007) Crystal structure of the human β2 adrenergic G-proteincoupled receptor, *Nature*, **450**, 383–387.
- 184. Chen, Q., Plasencia, M., Li, Z., Mukherjee, S., Patra, D., Chen, C.L., Klose, T., Yao, X.Q., Kossiakoff, A.A., Chang, L., et al. (2021) Structures of rhodopsin in complex

- with G-protein-coupled receptor kinase 1, *Nature*, **595**, 600–605.
- 185. Whitaker, J.R. (1963) Determination of Molecular Weights of Proteins by Gel Filtration of Sephadex., *Analytical Chemistry*, **35**, 1950–1953.
- 186. Andrews, P. (1964) Estimation of the molecular weights of proteins by Sephadex gel-filtration., *The Biochemical journal*, **91**, 222–233.
- 187. Zhou, F., Zhang, H., Cong, Z., Zhao, L.-H., Zhou, Q., Mao, C., Cheng, X., Shen, D.-D., Cai, X., Ma, C., et al. (2020) Structural basis for activation of the growth hormone-releasing hormone receptor, *Nature Communications*, 11, 5205.
- 188. Yuan, Y., Jia, G., Wu, C., Wang, W., Cheng, L., Li, Q., Li, Z., Luo, K., Yang, S., Yan, W., et al. (2021) Structures of signaling complexes of lipid receptors S1PR1 and S1PR5 reveal mechanisms of activation and drug recognition, *Cell Research*, 31, 1263–1274.
- 189. Isaikina, P., Tsai, C.-J., Dietz, N., Pamula, F., Grahl, A., Goldie, K.N., Guixà-González, R., Branco, C., Paolini-Bertrand, M., Calo, N., et al. (2021) Structural basis of the activation of the CC chemokine receptor 5 by a chemokine agonist, *Science Advances*, 7, eabg8685.
- 190. Jones, A.J.Y., Gabriel, F., Tandale, A., Nietlispach, D. (2020) Structure and Dynamics of GPCRs in Lipid Membranes: Physical Principles and Experimental Approaches, *Molecules*, 25, 4729.
- 191. Popot, J.L. (2010) Amphipols, nanodiscs, and fluorinated surfactants: Three nonconventional approaches to studying membrane proteins in aqueous solutions, *Annual Review of Biochemistry*, **79**, 737–775.
- 192. Zhou, H.X., Cross, T.A. (2013) Influences of membrane mimetic environments on membrane protein

- structures, Annual Review of Biophysics, **42**, 361–392.
- 193. Vanaken, T., Foxall-Vanaken, S., Castleman, S., Ferguson-Miller, S. (1986) Alkyl Glycoside Detergents: Synthesis and Applications to the Study of Membrane Proteins, *Methods in Enzymology*, **125**, 27–35.
- 194. Tulumello, D. V., Deber, C.M. (2009) SDS micelles as a membrane-mimetic environment for transmembrane segments, *Biochemistry*, **48**, 12096–12103.
- 195. Bhuyan, A.K. (2010) On the mechanism of SDS-induced protein denaturation, *Biopolymers*, **93**, 186–199.
- 196. Heim, B., Handrick, R., Hartmann, M.D., Kiefer, H. (2021) Refolding and characterization of two G protein-coupled receptors purified from E. coli inclusion bodies, *PLoS ONE*, 16, e0247689.
- 197. Lee, S., Ghosh, S., Jana, S., Robertson, N., Tate, C.G., Vaidehi, N. (2020) How Do Branched Detergents Stabilize GPCRs in Micelles?, *Biochemistry*, 59, 2125–2134.
- 198. Makowska, J., Wyrzykowski, D., Pilarski, B., Chmurzyński, L. (2015) Thermodynamics of sodium dodecyl sulphate (SDS) micellization in the presence of some biologically relevant pH buffers, *Jour*nal of Thermal Analysis and Calorimetry, 121, 257–261.
- 199. Seddon, A.M., Curnow, P., Booth, P.J. (2004) Membrane proteins, lipids and detergents: Not just a soap opera, *Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes*, **1666**, 105–117.
- Singh, S.K., Sigworth, F.J. (2015)
 Cryo-EM: Spinning the Micelles Away, Structure, 23, 1561.
- 201. Birch, J., Axford, D., Foadi, J., Meyer, A., Eckhardt, A., Thielmann, Y., Moraes, I. (2018) The fine art of

- integral membrane protein crystallisation, *Methods*, **147**, 150–162.
- Kampjut, D., Steiner, J., Sazanov, L.A. (2021) Cryo-EM grid optimization for membrane proteins, iScience, 24, 102139.
- 203. Maeda, S., Yamamoto, H., Kinch, L.N., Garza, C.M., Takahashi, S., Otomo, C., Grishin, N. V., Forli, S., Mizushima, N., Otomo, T. (2020) Structure, lipid scrambling activity and role in autophagosome formation of ATG9A, Nature Structural and Molecular Biology, 27, 1194–1201.
- 204. Ratkeviciute, G., Cooper, B.F., Knowles, T.J. (2021) Methods for the solubilisation of membrane proteins: The micelle-aneous world of membrane protein solubilisation, *Biochemical Society Transactions*, 49, 1763–1777.
- 205. Nguyen, A.H., Lefkowitz, R.J. (2021) Signaling at the endosome: cryo-EM structure of a GPCR-G protein-beta-arrestin megacomplex, FEBS Journal, 288, 2562-2569.
- 206. Tsai, C.-J., Marino, J., Adaixo, R., Pamula, F., Muehle, J., Maeda, S., Flock, T., Taylor, N.M., Mohammed, I., Matile, H., et al. (2019) Cryo-EM structure of the rhodopsin-Gαi-βγ complex reveals binding of the rhodopsin C-terminal tail to the gβ subunit, *eLife*, **8**, e46041.
- Tribet, C., Audebert, R., Popot, J.L. (1996) Amphipols: Polymers that keep membrane proteins soluble in aqueous solutions, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 15047–15050.
- 208. Popot, J.L., Althoff, T., Bagnard, D., Banéres, J.L., Bazzacco, P., Billon-Denis, E., Catoire, L.J., Champeil, P., Charvolin, D., Cocco, M.J., et al. (2011) Amphipols from a to Z*,

- Annual Review of Biophysics, **40**, 379–408
- 209. Bosco, M., Damian, M., Chauhan, V., Roche, M., Guillet, P., Fehrentz, J.A., Bonneté, F., Polidori, A., Banères, J.L., Durand, G. (2020) Biotinylated non-ionic amphipols for GPCR ligands screening, *Methods*, 180, 69–78.
- 210. Wheatley, M., Charlton, J., Jamshad, M., Routledge, S.J., Bailey, S., La-Borde, P.J., Azam, M.T., Logan, R.T., Bill, R.M., Dafforn, T.R., et al. (2016) GPCR-styrene maleic acid lipid particles (GPCR-SMALPs): Their nature and potential, *Biochemical Society Transactions*, 44, 619–623.
- 211. Tedesco, D., Maj, M., Malarczyk, P., Cingolani, A., Zaffagnini, M., Wnorowski, A., Czapiński, J., Benelli, T., Mazzoni, R., Bartolini, M., et al. (2021) Application of the SMALP technology to the isolation of GPCRs from low-yielding cell lines, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Biomembranes*, **1863**, 183641.
- 212. Routledge, S.J., Jamshad, M., Little, H.A., Lin, Y.-P., Simms, J., Thakker, A., Spickett, C.M., Bill, R.M., Dafforn, T.R., Poyner, D.R., et al. (2020) Ligand-induced conformational changes in a SMALP-encapsulated GPCR., Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Biomembranes, 1862, 183235.
- 213. Denisov, I.G., Sligar, S.G. (2016) Nanodiscs for structural and functional studies of membrane proteins, *Nature Structural and Molecular Biology*, 23, 481–486.
- 214. Cai, Y., Liu, Y., Culhane, K.J., DeVree, B.T., Yang, Y., Sunahara, R.K., Yan, E.C.Y. (2017) Purification of family B G protein-coupled receptors using nanodiscs: Application to human glucagon-like pep-

- tide-1 receptor, *PLOS ONE*, **12**, e0179568.
- 215. Nasr, M.L., Baptista, D., Strauss, M., Sun, Z.Y.J., Grigoriu, S., Huser, S., Plückthun, A., Hagn, F., Walz, T., Hogle, J.M., et al. (2016) Covalently circularized nanodiscs for studying membrane proteins and viral entry, *Nature Methods*, 14, 49–52.
- 216. Zhao, Z., Zhang, M., Hogle, J.M., Shih, W.M., Wagner, G., Nasr, M.L. (2018) DNA-Corralled Nanodiscs for the Structural and Functional Characterization of Membrane Proteins and Viral Entry, *Journal of the American Chemical Society*, 140, 10639–10643.
- 217. Kishimoto, Y., Hiraiwa, M., O'Brien, J.S. (1992) Saposins: Structure, function, distribution, and molecular genetics, *Journal of Lipid Research*, **33**, 1255–1267.
- 218. Popovic, K., Holyoake, J., Pomès, R., Privé, G.G. (2012) Structure of saposin A lipoprotein discs, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 109, 2908–2912.
- 219. Flayhan, A., Mertens, H.D.T., Ural-Blimke, Y., Martinez Molledo, M., Svergun, D.I., Löw, C. (2018) Saposin Lipid Nanoparticles: A Highly Versatile and Modular Tool for Membrane Protein Research, Structure, 26, 345-355.e5.
- Dürr, U.H.N., Gildenberg, M., Ramamoorthy, A. (2012) The magic of bicelles lights up membrane protein structure, *Chemical Reviews*, 112, 6054–6074.
- 221. Schmidt, P., Bender, B.J., Kaiser, A., Gulati, K., Scheidt, H.A., Hamm, H.E., Meiler, J., Beck-Sickinger, A.G., Huster, D. (2018) Improved in vitro folding of the Y2 G protein-coupled receptor into bicelles, Frontiers in Molecular Biosciences, 4, 100.

- 222. Murugova, T.N., Ivankov, O.I., Ryzhykau, Y.L., Soloviov, D. V., Kovalev, K. V., Skachkova, D. V., Round, A., Baeken, C., Ishchenko, A. V., Volkov, O.A., et al. (2022) Mechanisms of membrane protein crystallization in "bicelles", *Scientific Reports*, 12, 1–17.
- 223. Ujwal, R., Bowie, J.U. (2011) Crystallizing membrane proteins using lipidic bicelles, *Methods*, **55**, 337–341.
- 224. Goddard, A.D., Dijkman, P.M., Adamson, R.J., Dos Reis, R.I., Watts, A. (2015) Reconstitution of Membrane Proteins: A GPCR as an Example, *Methods in Enzymology*, **556**, 405–424.
- 225. Ong, S.G.M., Chitneni, M., Lee, K.S., Ming, L.C., Yuen, K.H. (2016) Evaluation of extrusion technique for nanosizing liposomes, *Pharmaceutics*, **8**, 36.
- 226. Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S.W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., Samiei, M., Kouhi, M., Nejati-Koshki, K. (2013) Liposome: Classification, preparation, and applications, *Nanoscale Research Letters*, **8**, 1–9.
- 227. Nakhaei, P., Margiana, R., Bokov, D.O., Abdelbasset, W.K., Jadidi Kouhbanani, M.A., Varma, R.S., Marofi, F., Jarahian, M., Beheshtkhoo, N. (2021) Liposomes: Structure, Biomedical Applications, and Stability Parameters With Emphasis on Cholesterol, Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 9, 748.
- 228. Cherezov, V. (2011) Lipidic cubic phase technologies for membrane protein structural studies, *Current Opinion in Structural Biology*, **21**, 559–566.
- 229. Caffrey, M. (2015) A comprehensive review of the lipid cubic phase or in meso method for crystallizing membrane and soluble proteins and

- complexes, *Acta Crystallographica Section F Structural Biology Communications*, **71**, 3–18.
- 230. Cherezov, V., Clogston, J., Misquitta, Y., Abdel-Gawad, W., Caffrey, M. (2002) Membrane Protein Crystallization In Meso: Lipid Type-Tailoring of the Cubic Phase, *Biophysical Journal*, 83, 3393–3407.
- 231. Cherezov, V., Abola, E., Stevens, R.C. (2010) Recent progress in the structure determination of GPCRs, a membrane protein family with high potential as pharmaceutical targets., Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 654, 141–168.
- 232. Ishchenko, A., Gati, C., Cherezov, V. (2018) Structural biology of G protein-coupled receptors: new opportunities from XFELs and cryoEM, Current Opinion in Structural Biology, 51, 44–52.
- 233. Martynowycz, M.W., Shiriaeva, A., Ge, X., Hattne, J., Nannenga, B.L., Cherezov, V., Gonen, T. (2021) MicroED structure of the human adenosine receptor determined from a single nanocrystal in LCP, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 118, e2106041118.
- 234. Alexandrov, A.I., Mileni, M., Chien, E.Y.T., Hanson, M.A., Stevens, R.C. (2008) Microscale Fluorescent Thermal Stability Assay for Membrane Proteins, *Structure*, **16**, 351–359.
- 235. Kooistra, A.J., Mordalski, S., Pándy-Szekeres, G., Esguerra, M., Mamyrbekov, A., Munk, C., Keserű, G.M., Gloriam, D.E. (2021) GPCRdb in 2021: Integrating GPCR sequence, structure and function, *Nucleic Acids Research*, 49, D335–D343.
- 236. Park, J.H., Scheerer, P., Hofmann, K.P., Choe, H.W., Ernst, O.P. (2008) Crystal structure of the ligand-free G-protein-coupled receptor opsin, *Nature*, 454, 183–187.

- 237. Taniguchi, R., Inoue, A., Sayama, M., Uwamizu, A., Yamashita, K., Hirata, K., Yoshida, M., Tanaka, Y., Kato, H.E., Nakada-Nakura, Y., et al. (2017) Structural insights into ligand recognition by the lysophosphatidic acid receptor LPA 6, *Nature*, **548**, 356–360.
- 238. 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., et al. (2018) Crystal structure of the Frizzled 4 receptor in a ligand-free state, *Nature*, **560**, 666–670.
- 239. Lin, X., Li, M., Wang, N., Wu, Y., Luo, Z., Guo, S., Han, G.W., Li, S., Yue, Y., Wei, X., et al. (2020) Structural basis of ligand recognition and self-activation of orphan GPR52, *Nature*, **579**, 152–157.
- 240. Asada, H., Horita, S., Hirata, K., Shiroishi, M., Shiimura, Y., Iwanari, H., Hamakubo, T., Shimamura, T., Nomura, N., Kusano-Arai, O., et al. (2018) Crystal structure of the human angiotensin II type 2 receptor bound to an angiotensin II analog, *Nature Structural & Molecular Biology*, **25**, 570–576.
- Coulter, A., Harris, R. (1983) Simplified preparation of rabbit fab fragments, *Journal of Immunological Methods*, 59, 199–203.
- 242. Ishchenko, A., Wacker, D., Kapoor, M., Zhang, A., Han, G.W., Basu, S., Patel, N., Messerschmidt, M., Weierstall, U., Liu, W., et al. (2017) Structural insights into the extracellular recognition of the human serotonin 2B receptor by an antibody, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 114, 8223–8228.
- 243. Maeda, S., Shiimura, Y., Asada, H., Hirata, K., Luo, F., Nango, E., Tanaka, N., Toyomoto, M., Inoue, A., Aoki, J., et al. (2021)

- Endogenous agonist-bound S1PR3 structure reveals determinants of G protein-subtype bias, *Science Advances*, 7, eabf5325.
- 244. Asada, H., Inoue, A., Ngako Kadji, F.M., Hirata, K., Shiimura, Y., Im, D., Shimamura, T., Nomura, N., Iwanari, H., Hamakubo, T., et al. (2020) The Crystal Structure of Angiotensin II Type 2 Receptor with Endogenous Peptide Hormone, Structure, 28, 418–425.e4.
- 245. Shiimura, Y., Horita, S., Hamamoto, A., Asada, H., Hirata, K., Tanaka, M., Mori, K., Uemura, T., Kobayashi, T., Iwata, S., et al. (2020) Structure of an antagonist-bound ghrelin receptor reveals possible ghrelin recognition mode, *Nature Communications*, 11, 1–9.
- 246. Im, D., Inoue, A., Fujiwara, T., Nakane, T., Yamanaka, Y., Uemura, T., Mori, C., Shiimura, Y., Kimura, K.T., Asada, H., et al. (2020) Structure of the dopamine D2 receptor in complex with the antipsychotic drug spiperone, *Nature Communications*, 11, 1–11.
- 247. Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hammers, C., Songa, E.B., Bendahman, N., Hammers, R. (1993) Naturally occurring antibodies devoid of light chains, *Nature*, **363**, 446–448.
- 248. Rasmussen, S.G.F., Choi, H.J., Fung, J.J., Pardon, E., Casarosa, P., Chae, P.S., Devree, B.T., Rosenbaum, D.M., Thian, F.S., Kobilka, T.S., et al. (2011) Structure of a nanobody-stabilized active state of the β2 adrenoceptor, *Nature*, **469**, 175–181.
- 249. Weichert, D., Kruse, A.C., Manglik, A., Hiller, C., Zhang, C., Hubner, H., Kobilka, B.K., Gmeiner, P. (2014) Covalent agonists for studying G protein-coupled receptor activation, *Proceedings of the*

- National Academy of Sciences of the United States of America, 111, 10744–10748.
- 250. Staus, D.P., Strachan, R.T., Manglik, A., Pani, B., Kahsai, A.W., Kim, T.H., Wingler, L.M., Ahn, S., Chatterjee, A., Masoudi, A., et al. (2016) Allosteric nanobodies reveal the dynamic range and diverse mechanisms of G-protein-coupled receptor activation, *Nature*, **535**, 448–452.
- 251. Che, T., English, J., Krumm, B.E., Kim, K., Pardon, E., Olsen, R.H.J., Wang, S., Zhang, S., Diberto, J.F., Sciaky, N., et al. (2020) Nanobodyenabled monitoring of kappa opioid receptor states, *Nature Commu*nications, 11, 1–12.
- 252. Ghosh, E., Kumari, P., Jaiman, D., Shukla, A.K. (2015) Methodological advances: The unsung heroes of the GPCR structural revolution, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **16**, 69–81.
- 253. Robertson, M.J., Papasergi-Scott, M., He, F., Seven, A.B., Meyerowitz, J.G., Panova, O., Peroto, M.C., Che, T., Skiniotis, G. (2022) Structure Determination of Inactive-State GPCRs with a Universal Nanobody, bioRxiv, 2021.11.02.466983.
- 254. Che, T., Majumdar, S., Zaidi, S.A., Ondachi, P., McCorvy, J.D., Wang, S., Mosier, P.D., Uprety, R., Vardy, E., Krumm, B.E., et al. (2018) Structure of the Nanobody-Stabilized Active State of the Kappa Opioid Receptor, *Cell*, **172**, 55–67. e15.
- 255. Collins, K.D. (2004) Ions from the Hofmeister series and osmolytes: Effects on proteins in solution and in the crystallization process, *Methods*, **34**, 300–311.
- 256. Gusach, A., Luginina, A., Marin, E., Brouillette, R.L., Besserer-Offroy, É., Longpré, J.M., Ishchenko, A., Popov, P., Patel, N., Fujimoto, T., et

- al. (2019) Structural basis of ligand selectivity and disease mutations in cysteinyl leukotriene receptors, *Nature Communications*, **10**, 1–9.
- 257. Michaelian, N., Sadybekov, A., Besserer-Offroy, É., Han, G.W., Krishnamurthy, H., Zamlynny, B.A., Fradera, X., Siliphaivanh, P., Presland, J., Spencer, K.B., et al. (2021) Structural insights on ligand recognition at the human leukotriene B4 receptor 1, Nature Communications, 12, 2971.
- 258. Luginina, A., Gusach, A., Marin, E., Mishin, A., Brouillette, R., Popov, P., Shiriaeva, A., Besserer-Offroy, É., Longpré, J.-M., Lyapina, E., et al. (2019) Structure-based mechanism of cysteinyl leukotriene receptor inhibition by antiasthmatic drugs, Science Advances, 5, eaax2518.
- 259. Batyuk, A., Galli, L., Ishchenko, A., Han, G.W., Gati, C., Popov, P.A., Lee, M.Y., Stauch, B., White, T.A., Barty, A., et al. (2016) Native phasing of x-ray free-electron laser data for a G protein-coupled receptor, *Science Advances*, 2, e160029.
- 260. Holik, H., Heß, H., Müller, W., Lüdtke, O. (2013) Unit Operations, Handbook of Paper and Board: Second Edition, 1, 351–472.
- 261. Krumm, B.E., Lee, S., Bhattacharya, S., Botos, I., White, C.F., Du, H., Vaidehi, N., Grisshammer, R. (2016) Structure and dynamics of a constitutively active neurotensin receptor, *Scientific Reports*, 6, 38564.
- Vagenende, V., Yap, M.G.S., Trout, B.L. (2009) Mechanisms of protein stabilization and prevention of protein aggregation by glycerol, *Biochemistry*, 48, 11084–11096.
- 263. Krumm, B.E., White, J.F., Shah, P., Grisshammer, R. (2015) Structural prerequisites for G-protein activation by the neurotensin recep-

- tor, Nature Communications, 6, 7895
- 264. Jang, K., Kim, H.G., Hlaing, S.H.S., Kang, M., Choe, H.-W., Kim, Y.J. (2022) A Short Review on Cryoprotectants for 3D Protein Structure Analysis, *Crystals*, 12, 138.
- Suttapitugsakul, S., Xiao, H., Smeekens, J., Wu, R. (2017) Evaluation and optimization of reduction and alkylation methods to maximize peptide identification with MS-based proteomics, *Molecular BioSystems*, 13, 2574–2582.
- Tao, Y.X., Conn, P.M. (2014) Chaperoning G protein-coupled receptors: From cell biology to therapeutics, *Endocrine Reviews*, 35, 602–647.
- Lim, W.K., Kanelakis, K.C., Neubig, R.R. (2013) Regulation of G protein signaling by the 70kDa heat shock protein, *Cellular Signalling*, 25, 389–396.
- 268. Barth, H.G., Jackson, C., Boyes, B.E. (1994) Size Exclusion Chromatography, *Analytical Chemistry*, 66, 595–620.
- 269. Duong-Ly, K.C., Gabelli, S.B. (2014) Gel filtration chromatography (size exclusion chromatography) of proteins, *Methods in Enzymology*, **541**, 105–114.
- 270. Kawate, T., Gouaux, E. (2006) Fluorescence-Detection Size-Exclusion Chromatography for Precrystallization Screening of Integral Membrane Proteins, *Structure*, 14, 673–681.
- 271. Gimpl, K., Klement, J., Keller, S. (2016) Characterising protein/ detergent complexes by triple-detection size-exclusion chromatography, *Biological Procedures On*line, 18, 4.
- 272. Newby, Z.E.R., O'Connell, J.D., Gruswitz, F., Hays, F.A., Harries, W.E.C., Harwood, I.M., Ho, J.D.,

- Lee, J.K., Savage, D.F., Miercke, L.J.W., et al. (2009) A general protocol for the crystallization of membrane proteins for X-ray structural investigation, *Nature Protocols*, **4**, 619–637.
- 273. Wyatt, P.J. (1993) Light scattering and the absolute characterization of macromolecules, *Analytica Chimica Acta*, **272**, 1–40.
- 274. Some, D., Amartely, H., Tsadok, A., Lebendiker, M. (2019) Characterization of Proteins by Size-Exclusion Chromatography Coupled to Multi-Angle Light Scattering (SEC-MALS), Journal of Visualized Experiments, 2019, e59615.
- 275. Dupeux, F., Röwer, M., Seroul, G., Blot, D., Márquez, J.A. (2011) A thermal stability assay can help to estimate the crystallization likelihood of biological samples, *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, **67**, 915–919.
- 276. Huynh, K., Partch, C.L. (2015) Analysis of protein stability and ligand interactions by thermal shift assay, *Current protocols in protein* science, **79**, 28.9.1-28.9.14.
- 277. Lo, M.C., Aulabaugh, A., Jin, G., Cowling, R., Bard, J., Malamas, M., Ellestad, G. (2004) Evaluation of fluorescence-based thermal shift assays for hit identification in drug discovery, *Analytical Biochemistry*, 332, 153–159.
- 278. Real-Hohn, A., Groznica, M., Löffler, N., Blaas, D., Kowalski, H. (2020) nanoDSF: In vitro Label-Free Method to Monitor Picornavirus Uncoating and Test Compounds Affecting Particle Stability, Frontiers in Microbiology, 11, 1442.
- Duy, C., Fitter, J. (2006) How aggregation and conformational scrambling of unfolded states govern fluo-

- rescence emission spectra, *Biophysical Journal*, **90**, 3704–3711.
- 280. Kotov, V., Bartels, K., Veith, K., Josts, I., Subhramanyam, U.K.T., Günther, C., Labahn, J., Marlovits, T.C., Moraes, I., Tidow, H., et al. (2019) High-throughput stability screening for detergent-solubilized membrane proteins, *Scientific Reports*, **9**, 10379.
- 281. Lea, W.A., Simeonov, A. (2012) Differential Scanning Fluorometry Signatures as Indicators of Enzyme Inhibitor Mode of Action: Case Study of Glutathione S-Transferase, PLoS ONE, 7, e36219.
- 282. Pardon, E., Laeremans, T., Triest, S., Rasmussen, S.G.F., Wohlkönig, A., Ruf, A., Muyldermans, S., Hol, W.G.J., Kobilka, B.K., Steyaert, J. (2014) A general protocol for the generation of Nanobodies for structural biology, *Nature Protocols*, **9**, 674–693.
- 283. Wingler, L.M., McMahon, C., Staus, D.P., Lefkowitz, R.J., Kruse, A.C. (2019) Distinctive Activation Mechanism for Angiotensin Receptor Revealed by a Synthetic Nanobody, *Cell*, **176**, 479-490.e12.
- 284. Kruse, A.C., Ring, A.M., Manglik, A., Hu, J., Hu, K., Eitel, K., Hübner, H., Pardon, E., Valant, C., Sexton, P.M., et al. (2013) Activation and allosteric modulation of a muscarinic acetylcholine receptor, *Nature*, **504**, 101–106.
- 285. Deshpande, I., Liang, J., Hedeen, D., Roberts, K.J., Zhang, Y., Ha, B., Latorraca, N.R., Faust, B., Dror, R.O., Beachy, P.A., et al. (2019) Smoothened stimulation by membrane sterols drives Hedgehog pathway activity, *Nature*, **571**, 284–288.
- Haffke, M., Fehlmann, D., Rummel, G., Boivineau, J., Duckely, M., Gommermann, N., Cotesta, S.,

- Sirockin, F., Freuler, F., Littlewood-Evans, A., et al. (2019) Structural basis of species-selective antagonist binding to the succinate receptor, *Nature*, **574**, 581–585.
- 287. Zhang, H.-L., Ye, H.-Q., Deng, C.-L., Liu, S.-Q., Shi, P.-Y., Qin, C.-F., Yuan, Z.-M., Zhang, B. (2017) Generation and characterization of West Nile pseudo-infectious reporter virus for antiviral screening, *Antiviral Research*, **141**, 38–47.
- 288. Gilman, A.G. (1987) G proteins: transducers of receptor-generated signals, *Annual Review of Biochemistry*, **56**, 615–649.
- 289. Hepler, J.R., Gilman, A.G. (1992) G proteins, *Trends in Biochemical Sciences*, **17**, 383–387.
- 290. Neves, S.R., Ram, P.T., Iyengar, R. (2002) G protein pathways, *Science*, **296**, 1636–1639.
- 291. Hillenbrand, M., Schori, C., Schöppe, J., Plückthun, A. (2015) Comprehensive analysis of heterotrimeric G-protein complex diversity and their interactions with GPCRs in solution, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112, E1181–E1190.
- 292. Masuho, I., Skamangas, N.K., Muntean, B.S., Martemyanov, K.A. (2021) Diversity of the Gβγ complexes defines spatial and temporal bias of GPCR signaling, *Cell Systems*, **12**, 324-337.e5.
- 293. Milligan, G., Kostenis, E. (2006) Heterotrimeric G-proteins: a short history, *British Journal of Pharma*cology, **147**, S46–S55.
- 294. Carpenter, B., Tate, C.G. (2016) Engineering a minimal G protein to facilitate crystallisation of G protein-coupled receptors in their active conformation, *Protein Engi*neering, Design and Selection, 29, 583–593.

- Carpenter, B., Tate, C. (2017) Expression and Purification of Mini G Proteins from Escherichia coli, BIO-PROTOCOL, 7, e2235.
- 296. Liu, X., Xu, X., Hilger, D., Aschauer, P., Tiemann, J.K.S., Du, Y., Liu, H., Hirata, K., Sun, X., Guixà-González, R., et al. (2019) Structural Insights into the Process of GPCR-G Protein Complex Formation, Cell, 177, 1243-1251.e12.
- Standfuss, J., Edwards, P.C., D'Antona, A., Fransen, M., Xie, G., Oprian, D.D., Schertler, G.F.X. (2011) The structural basis of agonist-induced activation in constitutively active rhodopsin, *Nature*, 471, 656–660.
- 298. Scheerer, P., Park, J.H., Hildebrand, P.W., Kim, Y.J., Krauß, N., Choe, H.W., Hofmann, K.P., Ernst, O.P. (2008) Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation, *Nature*, **455**, 497–502.
- 299. Singhal, A., Guo, Y., Matkovic, M., Schertler, G., Deupi, X., Yan, E.C., Standfuss, J. (2016) Structural role of the T94I rhodopsin mutation in congenital stationary night blindness, *EMBO reports*, 17, 1431–1440.
- Singhal, A., Ostermaier, M.K., Vishnivetskiy, S.A., Panneels, V., Homan, K.T., Tesmer, J.J.G., Veprintsev, D., Deupi, X., Gurevich, V. V., Schertler, G.F.X., et al. (2013) Insights into congenital stationary night blindness based on the structure of G90D rhodopsin, *EMBO Reports*, 14, 520–526.
- 301. Mattle, D., Singhal, A., Schmid, G., Dawson, R., Standfuss, J. (2015) Mammalian expression, purification, and crystallization of rhodopsin variants, In Rhodopsin: Methods and Protocols, pp 39–54.
- 302. Park, J.H., Morizumi, T., Li, Y., Hong, J.E., Pai, E.F., Hofmann, K.P., Choe, H.W., Ernst, O.P.

- (2013) Opsin, a structural model for olfactory receptors?, *Angewandte Chemie International Edition*, **52**, 11021–11024.
- 303. Deupi, X., Edwards, P., Singhal, A., Nickle, B., Oprian, D., Schertler, G., Standfuss, J. (2012) Stabilized G protein binding site in the structure of constitutively active metarhodopsin-II, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 109, 119–124.
- 304. Choe, H.W., Kim, Y.J., Park, J.H., Morizumi, T., Pai, E.F., Krau, N., Hofmann, K.P., Scheerer, P., Ernst, O.P. (2011) Crystal structure of metarhodopsin II, *Nature*, **471**, 651–655.
- 305. Sun, B., Feng, D., Chu, M.L.-H., Fish, I., Lovera, S., Sands, Z.A., Kelm, S., Valade, A., Wood, M., Ceska, T., et al. (2021) Crystal structure of dopamine D1 receptor in complex with G protein and a non-catechol agonist, *Nature Com*munications, 12, 3305.
- 306. van Gastel, J., Hendrickx, J.O., Leysen, H., Santos-Otte, P., Luttrell, L.M., Martin, B., Maudsley, S. (2018) β-Arrestin Based Receptor Signaling Paradigms: Potential Therapeutic Targets for Complex Age-Related Disorders, Frontiers in Pharmacology, 9, 1369.
- 307. Zhou, X.E., Gao, X., Barty, A., Kang, Y., He, Y., Liu, W., Ishchenko, A., White, T.A., Yefanov, O., Han, G.W., et al. (2016) X-ray laser diffraction for structure determination of the rhodopsin-arrestin complex, *Scientific Data*, 3, 160021.
- 308. Szczepek, M., Beyrière, F., Hofmann, K.P., Elgeti, M., Kazmin, R., Rose, A., Bartl, F.J., von Stetten, D., Heck, M., Sommer, M.E., et al. (2014) Crystal structure of a common GPCR-binding interface for G protein and arrestin, *Nature Communications*, 5, 4801.

- 309. Liang, Y.L., Khoshouei, M., Radjainia, M., Zhang, Y., Glukhova, A., Tarrasch, J., Thal, D.M., Furness, S.G.B., Christopoulos, G., Coudrat, T., et al. (2017) Phaseplate cryo-EM structure of a class B GPCR-G-protein complex, *Nature*, **546**, 118–123.
- 310. Fu, Y., Yang, Y., Zhang, H., Farley, G., Wang, J., Quarles, K.A., Weng, Z., Zamore, P.D. (2018) The genome of the Hi5 germ cell line from Trichoplusia ni, an agricultural pest and novel model for small RNA biology, *eLife*, 7, e31628.
- 311. Papasergi-Scott, M.M., Robertson, M.J., Seven, A.B., Panova, O., Mathiesen, J.M., Skiniotis, G. (2020) Structures of metabotropic GABAB receptor, *Nature*, 584, 310–314.
- 312. Jeong, E., Kim, Y., Jeong, J., Cho, Y. (2021) Structure of the class C orphan GPCR GPR158 in complex with RGS7-Gβ5, *Nature Communications*, **12**, 6805.
- 313. Patil, D.N., Singh, S., Laboute, T., Strutzenberg, T.S., Qiu, X., Wu, D., Novick, S.J., Robinson, C. V., Griffin, P.R., Hunt, J.F., et al. (2022) Cryo-EM structure of human GPR158 receptor coupled to the RGS7-Gb5 signaling complex, *Science*, 375, 86–91.
- 314. Park, J., Zuo, H., Frangaj, A., Fu, Z., Yen, L.Y., Zhang, Z., Mosyak, L., Slavkovich, V.N., Liu, J., Ray, K.M., et al. (2021) Symmetric activation and modulation of the human calcium-sensing receptor, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118, e2115849118.
- 315. Fang, W., Yang, F., Xu, C., Ling, S., Lin, L., Zhou, Y., Sun, W., Wang, X., Liu, P., Rondard, P., et al. (2022) Structural basis of the activation of metabotropic glutamate receptor 3, Cell Research, 32, 695–698.
- 316. Duan, J., Xu, P., Cheng, X., Mao, C., Croll, T., He, X., Shi, J., Luan,

- X., Yin, W., You, E., et al. (2021) Structures of full-length glycoprotein hormone receptor signalling complexes, *Nature*, **598**, 688–692.
- 317. Bross, P., Andersen, B.A., Winter, V., Kräutle, F., Jensen, T.G., Nandy, A., Kølvraa, S., Ghisla, S., Bolund, L., Gregersen, N. (1993) Co-over-expression of bacterial GroESL chaperonins partly overcomes non-productive folding and tetramer assembly of E. coli-expressed human medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) carrying the prevalent disease-causing K304E mutation, 1182, 264–274.
- 318. Rivas, F. V., Tolia, N.H., Song, J.J., Aragon, J.P., Liu, J., Hannon, G.J., Joshua-Tor, L. (2005) Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC, *Nature Structural and Molecular Biology*, 12, 340–349.
- 319. Tolia, N.H., Joshua-Tor, L. (2006) Strategies for protein coexpression in Escherichia coli, *Nature Methods*, 3, 55–64.
- 320. Kost, T.A., Condreay, J.P., Jarvis, D.L. (2005) Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells, *Nature Biotechnology*, **23**, 567–575.
- 321. Aricescu, A.R., Lu, W., Jones, E.Y. (2006) A time- and cost-efficient system for high-level protein production in mammalian cells, *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, **62**, 1243–1250.
- 322. Aricescu, A.R., Assenberg, R., Bill, R.M., Busso, D., Chang, V.T., Davis, S.J., Dubrovsky, A., Gustafsson, L., Hedfalk, K., Heinemann, U., et al. (2006) Eukaryotic expression: Developments for structural proteomics, *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, **62**, 1114–1124.

- 323. Perrakis, A., Romier, C. (2008) Assembly of protein complexes by coexpression in prokaryotic and eukaryotic hosts: an overview., *Methods in molecular biology*, **426**, 247–256.
- 324. Seven, A.B., Barros-Álvarez, X., de Lapeyrière, M., Papasergi-Scott, M.M., Robertson, M.J., Zhang, C., Nwokonko, R.M., Gao, Y., Meyerowitz, J.G., Rocher, J.P., et al. (2021) G-protein activation by a metabotropic glutamate receptor, *Nature*, **595**, 450–454.
- 325. Draper-Joyce, C.J., Khoshouei, M., Thal, D.M., Liang, Y.L., Nguyen, A.T.N., Furness, S.G.B., Venugopal, H., Baltos, J.A., Plitzko, J.M., Danev, R., et al. (2018) Structure of the adenosine-bound human adenosine A1 receptor-Gi complex, *Nature*, **558**, 559–565.
- 326. Sun, B., Willard, F.S., Feng, D., Alsina-Fernandez, J., Chen, Q., Vieth, M., Ho, J.D., Showalter, A.D., Stutsman, C., Ding, L., et al. (2022) Structural determinants of dual incretin receptor agonism by tirzepatide, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119, e2116506119.
- 327. Zhang, H., Chen, L.N., Yang, D., Mao, C., Shen, Q., Feng, W., Shen, D.D., Dai, A., Xie, S., Zhou, Y., et al. (2021) Structural insights into ligand recognition and activation of the melanocortin-4 receptor, *Cell Research*, 31, 1163–1175.
- 328. Koehl, A., Hu, H., Maeda, S., Zhang, Y., Qu, Q., Paggi, J.M., Latorraca, N.R., Hilger, D., Dawson, R., Matile, H., et al. (2018) Structure of the μ-opioid receptor-Gi protein complex, *Nature*, **558**, 547–552.
- 329. Connor, M., Christie, M.J. (1999) Opioid receptor signalling mechanisms, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, **26**, 493–499.

- 330. Raffa, R.B., Martinez, R.P., Connelly, C.D. (1994) G-protein antisense oligodeoxyribonucleotides and μ-opioid supraspinal antinociception, *European Journal of Pharmacology*, **258**, R5–R7.
- 331. Strathmann, M.P., Simon, M.I. (1991) Gα12 and Gα13 subunits define a fourth class of G protein α subunits, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 88, 5582–5586.
- 332. Riobo, N.A., Manning, D.R. (2005) Receptors coupled to heterotrimeric G proteins of the G12 family, *Trends* in *Pharmacological Sciences*, **26**, 146–154.
- 333. Kozasa, T., Jiang, X., Hart, M.J., Sternweis, P.M., Singer, W.D., Gilman, A.G., Bollag, G., Sternweis, P.C. (1998) p115 RhoGEF, a GTPase Activating Protein for Gα 12 and Gα 13, Science, **280**, 2109–2111.
- 334. Chen, H., Chen, K., Huang, W., Staudt, L.M., Cyster, J.G., Li, X. (2022) Structure of S1PR2– heterotrimeric G13 signaling complex, *Science Advances*, **8**, 67.
- 335. Barros-Álvarez, X., Nwokonko, R.M., Vizurraga, A., Matzov, D., He, F., Papasergi-Scott, M.M., Robertson, M.J., Panova, O., Yardeni, E.H., Seven, A.B., et al. (2022) The tethered peptide activation mechanism of adhesion GPCRs, *Nature*, **604**, 757–762.
- 336. Kreutz, B., Yau, D.M., Nance, M.R., Tanabe, S., Tesmer, J.J.G., Kozasa, T. (2006) A new approach to producing functional Gα subunits yields the activated and deactivated structures of Gα12/13 proteins, *Biochemistry*, **45**, 167–174.
- 337. Singer, W.D., Brown, H.A., Sternweis, P.C. (1997) Regulation of eukaryotic phosphatidylinositol-specific phospholipase C and phos-

- pholipase D, Annual Review of Biochemistry, **66**, 475–509.
- 338. Taylor, S.J., Chae, H.Z., Rhee, S.G., Exton, J.H. (1991) Activation of the β1 isozyme of phospholipase C by α subunits of the Gq class of G proteins, *Nature*, **350**, 516–518.
- Smrcka, A. V., Hepler, J.R., Brown, K.O., Sternweis, P.C. (1991) Regulation of polyphosphoinositidespecific phospholipase C activity by purified Gq, Science, 251, 804–807.
- 340. Maeda, S., Koehl, A., Matile, H., Hu, H., Hilger, D., Schertler, G.F.X., Manglik, A., Skiniotis, G., Dawson, R.J.P., Kobilka, B.K. (2018) Development of an antibody fragment that stabilizes GPCR/G-protein complexes, *Nature Communications*, **9**, 3712.
- 341. Wan, Q., Okashah, N., Inoue, A., Nehme, R., Carpenter, B., Tate, C.G., Lambert, N.A. (2018) Mini G protein probes for active G protein-coupled receptors (GPCRs) in live cells, *Journal of Biological Chemistry*, **293**, 7466–7473.
- 342. Meyerowitz, J.G., Robertson, M.J., Barros-Álvarez, X., Panova, O., Nwokonko, R.M., Gao, Y., Skiniotis, G. (2022) The oxytocin signaling complex reveals a molecular switch for cation dependence, *Nature Structural and Molecular Biology*, 29, 274–281.
- 343. Xia, R., Wang, N., Xu, Z., Lu, Y., Song, J., Zhang, A., Guo, C., He, Y. (2021) Cryo-EM structure of the human histamine H1 receptor/Gq complex, *Nature Communications*, 12, 2086.
- 344. Kim, K., Che, T., Panova, O., DiBerto, J.F., Lyu, J., Krumm, B.E., Wacker, D., Robertson, M.J., Seven, A.B., Nichols, D.E., et al. (2020) Structure of a Hallucinogen-Activated Gq-Coupled 5-HT2A Serotonin Receptor, *Cell*, **182**, 1574–1588.e19.

- 345. Benovic, J.L., Kühn, H., Weyand, I., Codina, J., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1987) Functional desensitization of the isolated beta-adrenergic receptor by the beta-adrenergic receptor kinase: potential role of an analog of the retinal protein arrestin (48-kDa protein)., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 84, 8879–8882.
- 346. Luttrell, L.M., Roudabush, F.L., Choy, E.W., Miller, W.E., Field, M.E., Pierce, K.L., Lefkowitz, R.J. (2001) Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by β-arrestin scaffolds, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 98, 2449–2454.
- 347. McDonald, P.H., Chow, C.-W., Miller, W.E., Laporte, S.A., Field, M.E., Lin, F.-T., Davis, R.J., Lefkowitz, R.J. (2000) β-Arrestin 2: A Receptor-Regulated MAPK Scaffold for the Activation of JNK3, *Science*, **290**, 1574–1577.
- 348. Luttrell, L.M., Ferguson, S.S.G., Daaka, Y., Miller, W.E., Maudsley, S., Della Rocca, G.J., Lin, F.T., Kawakatsu, H., Owada, K., Luttrell, D.K., et al. (1999) β-arrestin-dependent formation of β2 adrenergic receptor-src protein kinase complexes, *Science*, **283**, 655–661.
- 349. Yin, W., Li, Z., Jin, M., Yin, Y.L., de Waal, P.W., Pal, K., Yin, Y., Gao, X., He, Y., Gao, J., et al. (2019) A complex structure of arrestin-2 bound to a G protein-coupled receptor, *Cell Research*, **29**, 971–983.
- 350. Staus, D.P., Hu, H., Robertson, M.J., Kleinhenz, A.L.W., Wingler, L.M., Capel, W.D., Latorraca, N.R., Lefkowitz, R.J., Skiniotis, G. (2020) Structure of the M2 muscarinic receptor–β-arrestin complex in a lipid nanodisc, *Nature*, **579**, 297–302.

- 351. Huang, W., Masureel, M., Qu, Q., Janetzko, J., Inoue, A., Kato, H.E., Robertson, M.J., Nguyen, K.C., Glenn, J.S., Skiniotis, G., et al. (2020) Structure of the neurotensin receptor 1 in complex with β-arrestin 1, *Nature*, **579**, 303–308.
- 352. Weiss, E.R., Ducceschi, M.H., Horner, T.J., Li, A., Craft, C.M., Osawa, S. (2001) Species-specific differences in expression of G-protein-coupled receptor kinase (GRK) 7 and GRK1 in mammalian cone photoreceptor cells: Implications for cone cell phototransduction, *Journal of Neuroscience*, 21, 9175–9184.
- 353. Calebiro, D., Nikolaev, V.O., Gagliani, M.C., de Filippis, T., Dees, C., Tacchetti, C., Persani, L., Lohse, M.J. (2009) Persistent cAMP-Signals Triggered by Internalized G-Protein-Coupled Receptors, *PLoS Biology*, 7, e1000172.
- 354. Ferrandon, S., Feinstein, T.N., Castro, M., Wang, B., Bouley, R., Potts, J.T., Gardella, T.J., Vilardaga, J.P. (2009) Sustained cyclic AMP production by parathyroid hormone receptor endocytosis, *Nature Chemical Biology*, 5, 734–742.
- 355. Feinstein, T.N., Yui, N., Webber, M.J., Wehbi, V.L., Stevenson, H.P., King, J.D., Hallows, K.R., Brown, D., Bouley, R., Vilardaga, J.P. (2013) Noncanonical control of vasopressin receptor type 2 signaling by retromer and arrestin, *Journal of Biological Chemistry*, 288, 27849–27860.
- 356. Thomsen, A.R.B., Plouffe, B., Cahill, T.J., Shukla, A.K., Tarrasch, J.T., Dosey, A.M., Kahsai, A.W., Strachan, R.T., Pani, B., Mahoney, J.P., et al. (2016) GPCR-G Protein-β-Arrestin Super-Complex Mediates Sustained G Protein Signaling, *Cell*, **166**, 907–919.

357. Nguyen, A.H., Thomsen, A.R.B., Cahill, T.J., Huang, R., Huang, L.-Y., Marcink, T., Clarke, O.B., Heissel, S., Masoudi, A., Ben-Hail, D., et al. (2019) Structure of an

endosomal signaling GPCR–G protein–β-arrestin megacomplex, *Nature Structural & Molecular Biology*, **26**, 1123–1131.