

Receptory sprzężone z białkiem G

Szczególnie istotną rolę metod teoretycznych w badaniach dotyczących białek transbłonowych takich jak receptory GPCR jest dostarczanie wstępnego modelu białka (najczęściej homologicznego) podczas rozwiązywania jego struktury na podstawie danych pochodzących z krystalografii rentgenowskiej i kriomikroskopii elektronowej (Hendrickson et al. *Nat Struct Mol Biol* 2016). W drugim przypadku dokładne odczytanie danych strukturalnych odzwierciedlonych na zdjęciu mikroskopowym wymaga zbudowania startowej konformacji białka, która następnie jest optymalizowana na podstawie tych danych (Cheng et al. *Cell* 2015). Podobne podejście jest od wielu lat stosowane w krystalografii rentgenowskiej, w której do mapy gęstości elektronowej atomów dopasowywany jest model białka (Rossmann et al. *Acta Cryst* 1962). Różnice w stosunku do białek globularnych polegają na stworzeniu podczas eksperymentu szczególnego, niepolarnego środowiska imitującego błonę komórkową, np. za pomocą miceli (Palczewski et al. *Science* 2000) lub nanodysków lipidowych (Denisov et al. *Nat Struct Mol Biol* 2016). W przypadku badania metodami krystalografii białek błonowych podczas ich działania, np. w konformacji aktywnej w przypadku receptorów GPCR, konieczne jest dodatkowo ustabilizowanie danego stanu konformacyjnego białka. Stało się to możliwe w ostatnich latach dzięki odkryciu stabilizujących receptor nanocząstek (rekombinowanych antygenów) (Manglik et al. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2017). Brian Kobilka wraz ze współpracownikami ze Stanów Zjednoczonych i Europy w roku 2011 po raz pierwszy otrzymał strukturę krystaliczną receptora GPCR (β 2-adrenergicznego) w konformacji aktywnej w oddziaływaniu z białkiem G (Rasmussen et al. *Nature* 2011), dopiero po 11 latach od rozwiązania pierwszej struktury receptora GPCR (rodopsyny) (Palczewski et al. *Science* 2000) oraz jej dimerów (Fotiadis et al. *Nature* 2003) przez Krzysztofa Palczewskiego i współpracowników (Sławomira Filipka). Inne rozwiązanie zastosowane dla receptora adenylicznego A2A zostało zaproponowane przez Heptares Therapeutics i polega na termostabilizacji stanu aktywnego receptora GPCR przez mutacje punktowe (technologia StaR®) (Robertson et al. *Neuropharmacology* 2011). Ostatnio opublikowana struktura aktywnego receptora GPCR (kalcytoninowego CT-R z podrodziny receptorów sekretynowych) o rozdzielczości 3.3 Å została otrzymana metodą kriomikroskopii elektronowej przy zastosowaniu szczególnej metody rejestrowania danych umożliwiającej otrzymanie struktury o wysokiej rozdzielczości (płytko fazowa Volta) (Liang et al. *Nature* 2018). O trudnościach eksperymentalnych dotyczących stabilizacji stanu aktywnego receptorów GPCR świadczy fakt, że część dotychczas rozwiązanych struktur krystalicznych reprezentuje konformację tylko stanu pośredniego, czyli nie w pełni aktywnego, pomimo związania całkowitego lub częściowego agonisty (Warne et al. *Nature* 2011).

Tabela 1. Mikroprzełączniki aminokwasowe receptorów GPCR z klasy A.

Etap aktywacji¹	Mikroprzełączniki i odpowiadające im motywy sekwencyjne	Indukowana globalna zmiana konformacyjna receptora
1	Mikroprzełącznik - zamek 3-7 (ang. 3-7 lock switch) Glu3.28 (Asp3.32), Lys7.43 (Tyr7.43)	Zerwanie połączenia między helisą III a VII poprzedzone zerwaniem mostku solnego między Lys7.43 a zasadą Schiffa tworzoną przez retinal i Glu3.28.
2	Mikroprzełącznik transmisji (poprzednia nazwa: dźwigniowy [H4]) (ang. transmission switch) Trp6.48, P5.50, P6.50 CwxP (helisa VI)	Helisa VI przesuwa się w stronę helisy V i ulega niewielkiej rotacji, a następnie jej część cytoplazmatyczna ulega odchyleniu.
3	Mikroprzełącznik dźwigniowy (ang. toggle switch) Tyr7.53 nPxxy (helisa VII)	Przegrupowanie w cytoplazmatycznym końcu helisy VII poprzedzone rotacją grupy bocznej tyrozyny w celu reorganizacji sieci wiązań wodorowych wewnątrz receptora umożliwiających w następstwie oddziaływanie z białkiem G.
4	Mikroprzełącznik - zamek jonowy (ang. ionic lock switch) Glu3.49/Arg3.50 – Glu6.30/Thr6.34 (d/e)Ry (helisa III)	Zerwanie mostku solnego argininy i kwasu glutaminowego, po którym następuje zbliżenie helisy III z V oraz VI z V.

¹Kolejność etapów aktywacji receptorów klasy A uszeregowana wg Wescott et al. *PNAS* 2016, od zmian konformacyjnych w obrębie części zewnątrzkomórkowej po związaniu ligandu, przez środek receptora, kończąc na części cytoplazmatycznej oddziałującej z białkiem G.

Struktura krystaliczna receptorów kannabinoidowych CB 1 i CB 2 ukazała się dopiero w roku 2016 (konformacja nieaktywna CB1) i 2017 (aktywna CB1) (Hua et al. *Nature* 2017) oraz w 2019 (nieaktywna CB2) (Li et al. *Cell* 2019), choć już wyniki badań eksperymentalnych z początku wieku świadczyły o istnieniu szczególnego mikroprzełącznika aminokwasowego (McAllister et al. *J Med Chem* 2003). Zmiana konformacyjna takich mikroprzełączników aminokwasowych w receptorach GPCR jest uważana za początek ich lokalnych zmian konformacyjnych powodujących w kolejnych etapach globalne zmiany konformacyjne prowadzące do w pełni funkcjonalnych w oddziaływaniu z białkiem G konformacji tych receptorów. Mikroprzełączniki aminokwasowe są częścią zachowywanych w ewolucji motywów sekwencyjnych, a ich zmiana położenia, np. wskutek oddziaływania z agonistą, powoduje obniżenie energii wewnętrznej białka i w rezultacie zwiększenie populacji stanów aktywnych receptora (Manglik et al. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2017).