

РАЦИОНАЛЬНАЯ РАЗРАБОТКА ЛЕКАРСТВ, НАПРАВЛЕННЫХ НА РЕЦЕПТОРЫ, СОПРЯЖЕННЫЕ С G-БЕЛКОМ: ВЗГЛЯД СО СТОРОНЫ СТРУКТУРНОЙ БИОЛОГИИ

Обзор

© 2024 П.А. Хорн¹, А.П. Лугинина¹, В.А. Поспелов¹, Д.Е. Дашевский¹,
А.Н. Хныкин¹, О.В. Моисеева^{1,2}, Н.А. Сафронова¹, А.С. Белоусов¹,
А.В. Мишин^{1*}, В.И. Борщевский^{1,3*}

¹ Московский физико-технический институт (НИУ),

141701 Долгопрудный, Московская обл., Россия;

электронная почта: borshchevskiy.vi@phystech.edu; mishinalexey@phystech.edu

² ФИЦ ПНЦБИ РАН, Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрабина РАН,
142290 Пушкино, Московская обл., Россия

³ Объединенный институт ядерных исследований, лаборатория нейтронной физики им. Франка,
141980 Дубна, Московская обл., Россия

Поступила в редакцию 21.09.2023

После доработки 22.02.2024

Принята к публикации 29.02.2024

Рецепторы, сопряженные с G-белком (G protein-coupled Receptors, GPCR), играют ключевую роль в передаче внеклеточных сигналов и регуляции множества биологических процессов, что делает эти мембранные белки одним из наиболее важных классов мишеней фармакологических агентов. Значительное увеличение количества атомарных структур GPCR за последнее время открыло путь к разработке лекарств на их основе (Structure Based Drug Design, SBDD). SBDD использует информацию о структуре комплекса рецептор–лиганд для поиска аффинных и селективных лигандов без необходимости проведения высокопроизводительного экспериментального скрининга лигандов и позволяет существенно расширить химическое пространство поиска лигандов. В обзоре мы описываем процесс получения структуры GPCR методами рентгеноструктурного анализа и криоэлектронной микроскопии – важный этап рациональной разработки лекарств, направленных на GPCR. Нашей основной целью является освещение широкому кругу специалистов современных аспектов и ключевых особенностей методов экспериментальной структурной биологии, необходимых для детального понимания SBDD GPCR.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: разработка лекарств, GPCR, MX, крио-ЭМ, SBDD.

DOI: 10.31857/S0320972524040124 **EDN:** ZEMVSA

ВВЕДЕНИЕ

Разработка лекарственных средств представляет собой сложный, дорогостоящий и многоэтапный процесс. Он включает в себя: поиск и валидацию лекарственной мишени; поиск соединений-хитов (hit compounds), которые специфически связываются с мишенью; модификации соединения-хита до соединения-лидера (lead compound), оптимизированного по критериям медицинской химии, и проведение анализа структурно-функциональных зависимостей; отбор соединений-кандидатов;

дидатов; доклинические испытания на животных и клинические испытания [1]. Согласно аналитическим отчетам, для вывода нового терапевтического продукта на фармацевтический рынок требуется в среднем более 13 лет и около 2 миллиардов долларов [2].

Традиционная разработка лекарственных средств предусматривает широкомасштабный экспериментальный скрининг библиотек соединений, что является низкоэффективным, экстенсивным и дорогостоящим подходом. Для оптимизации этого процесса и сужения круга соединений-кандидатов применяются различные рациональные подходы, основные из которых –

* Адресат для корреспонденции.

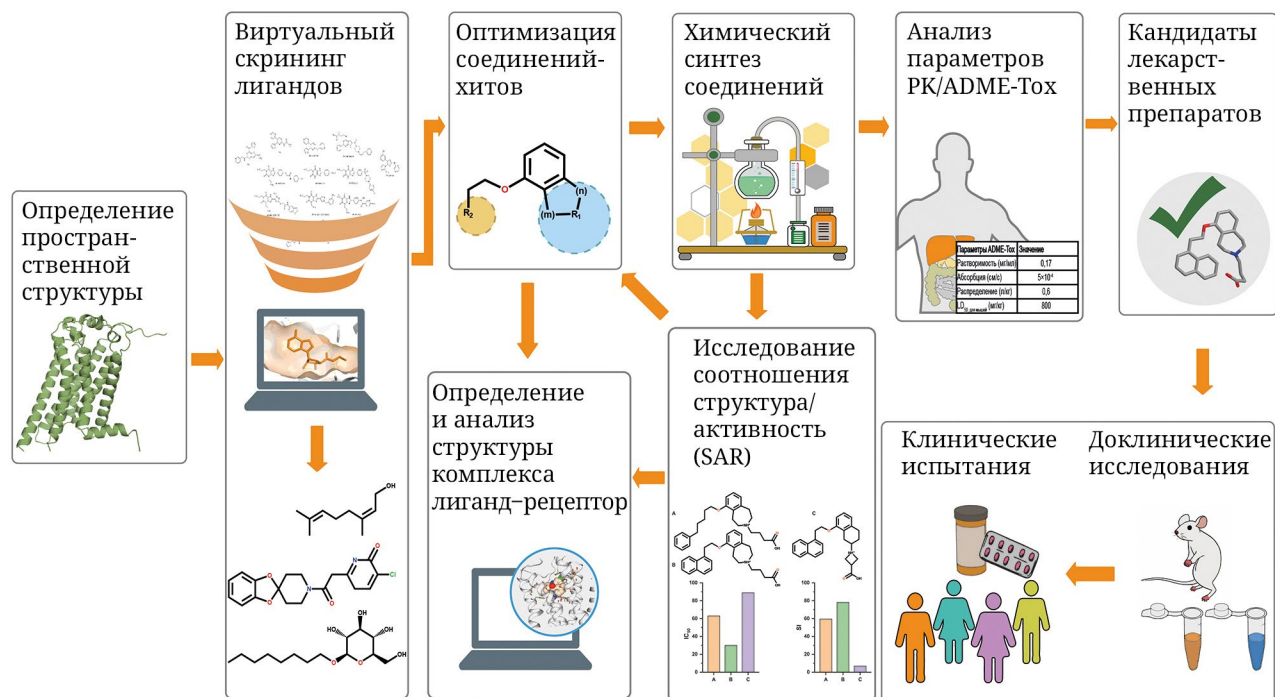


Рис. 1. Основные стадии разработки лекарств на основе структуры (SBDD)

это комбинаторная химия [3], разработка лекарств на основе малых фрагментов (Fragment-based Drug Discovery, FBDD), а также виртуальный скрининг библиотек химических соединений, основанный на структуре (Structural-base Virtual Screening, SBVS); также используют подходы, основанные на использовании моделей искусственного интеллекта [4].

Структурная биология вносит решающий вклад в оптимизацию большинства из перечисленных выше этапов разработки лекарств (рис. 1).

В первую очередь знание трехмерной структуры целевого белка позволяет определить детали молекулярного механизма его функционирования и помогает при валидации конкретных мишеней. Не менее значимым для разработки лекарств на основе структуры (SBDD) является использование полученных трехмерных структур в качестве модели для виртуального скрининга гораздо больших библиотек соединений с существенно меньшими затратами средств, времени и усилий по сравнению с широкомасштабным экспериментальным

скринингом [5]. Процесс оптимизации соединений-лидеров может быть значительно улучшен, если дополнить анализ структурным картированием лиганд-связывающего кармана. С этой целью обычно определяют сотни различных структур рецептора с лигандом, которые служат для лучшего понимания их специфических взаимодействий и которые применяют для итерационной оптимизации лигандов.

К настоящему времени на фармацевтический рынок выведено множество лекарств, полученных с использованием структур лекарственных мишеней, что говорит об успешности такого подхода. Например, еще в 1970-х гг. для разработки ряда препаратов, стабилизирующих гемоглобин в несвязанном с кислородом состоянии, использовали его структуру [6]. В 1980-е гг. анализ кристаллических структур карбоангидразы позволил улучшить аффинность лиганда к требуемой конформации фермента, что привело к созданию препарата для снижения внутриглазного давления, Дорзоламида. Более современными примерами являются инги-

Принятые сокращения: крио-ЭМ – криоэлектронная микроскопия; MMC – мембраномоделирующие системы; ПО – программное обеспечение; СИ – синхротронное излучение; BRIL – термостабилизированный апоцитохромом *b*₅₆₂RIL; CCD – coupled charge device; CHS – холестерил гемисукцинат; Fab – антигенраспознающий фрагмент антитела (Fragment Antigen Binding); GPCR – рецепторы, сопряженные с G-белком (G protein coupled receptor); ICL3 – третья внутриклеточная петля (Intracellular Loop 3); LCP – липидная кубическая фаза (Lipidic Cubic Phase); MSP – мембранный каркасный белок (Membrane Scaffold Protein); MX – макромолекулярная рентгеновская кристаллография (Macromolecular Crystallography); SBDD – разработка лекарств на основе структуры (Structure Based Drug Design); SFX – серийная фемтосекундная кристаллография (Serial Femtosecond X-ray Crystallography); SWSX – малосекторальная синхротронная кристаллография (Small-wedge Synchrotron Crystallography); XFEL – рентгеновский лазер на свободных электронах (X-ray Free Electron Laser).

битор протеазы ВИЧ Саквинавир (1995 г.), ингибиторы нейрамидазы – противовирусные препараты Занамивир (1999 г.) и Осельтамвир (1999 г.), противолейкозный цитостатический препарат Иматиниб (2001 г.), селективный ингибитор ренина Алискирен (2007 г.), противовирусный препарат Боцепревир (2011 г.) и др. [7–9].

В последнее десятилетие в структурной биологии произошел качественный скачок, вызванный революцией в возможности получения структур высокого разрешения при помощи криоэлектронной микроскопии (крио-ЭМ) [10–12], прорывами в области серийной фемтосекундной кристаллографии с использованием рентгеновских лазеров на свободных электронах (X-ray Free Electron Laser, XFEL) [13], а также в связи с появлением систем моделирования структур при помощи подходов искусственного интеллекта AlphaFold2 [14] и RoseTTAFold [15]. Благодаря этому появляются структуры высокого разрешения для важных биологических мишеней, которые невозможно было получить ранее, а структурная биология переживает ренессанс.

Наш обзор раскрывает особенности одного из ключевых этапов SBDD рецепторов, сопряженных с G-белком (GPCR) – получения структуры мишени методами белковой кристаллографии и крио-ЭМ.

БЕЛКОВАЯ КРИСТАЛЛОГРАФИЯ

Описание и особенности метода для исследования GPCR. SBDD опирается на полученные атомарные модели структур белков-мишеней высокого разрешения, которые позволяют обнаруживать специфические сайты связывания лигандов. Основным методом получения белковых структур является макромолекулярная рентгеновская кристаллография (Macromolecular X-Ray Crystallography, MX), с помощью которой получено более 85% всех известных на сегодняшний день структур (rcsb.org от 12.09.23 г.). Улучшение и введение новых сверхярких источников рентгеновского излучения, разработка оборудования для экспериментальных станций, создание новых методов молекулярной и структурной биологии постоянно совершенствуют белковую кристаллографию, сокращая время эксперимента и снижая требования к белковым кристаллам. В итоге возможности метода MX значительно расширились, что привело к появлению структур белков (в частности, GPCR) и их комплексов, которые раньше получить не удавалось. В течение последних 10 лет прирост новых белковых структур, полученных методами MX, увеличился и составляет более 8000 ежегодно, а суммарное число полученных структур к середине 2023 г. превысило 176 000.

Кристаллизация GPCR является трудоемким процессом – рецепторам свойственны низкий уровень экспрессии, высокая конформационная подвижность, амфифильность. Эти особенности, а также наличие подвижных внемембранных участков затрудняют процесс их кристаллизации. Пути решения заключаются в подборе гетерологической системы экспрессии, уменьшении конформационной подвижности методами генной инженерии, использовании метода кристаллизации *in meso*. Однако качество кристаллов GPCR в среднем остается хуже, чем для большинства водорастворимых белков, поэтому технологии и методики получения и обработки рентгеноструктурных данных GPCR требуют дальнейшего совершенствования.

Подготовка GPCR к кристаллизации. GPCR – эукариотические трансмембранные белки, как правило, с низким уровнем экспрессии, структурные исследования которых методом MX требуют получения стабильного функционального белкового препарата в миллиграммовых количествах (в среднем требуется ~5 мг на одну кристаллизацию [16]). Подготовка GPCR к кристаллизации состоит из нескольких этапов и начинается с выбора гетерологической системы экспрессии, к которой предъявляют следующие требования: корректный биосинтез целевого белка – система должна обладать необходимым набором ко- и посттрансляционных модификаций для правильного сворачивания и транспортировки белка; интересующий белок должен экспрессироваться в системе в необходимом для кристаллизации количестве, а протокол работы с системой должен быть относительно простым (как в случае с экспрессией в *Escherichia coli*). Чаще всего экспрессию GPCR проводят в клетках насекомых с использованием бакуловирусной системы или в клетках млекопитающих с использованием, к примеру, системы Bac-Mam [17]. Использование подобных экспрессионных систем подразумевает введение в ген интересующего белка N-концевых сигнальных последовательностей: пептида гемагглютинаина (Hemagglutinin (HA) signal peptide), сайта N-гликозилирования мускаринового ацетилхолинового рецептора M4 (3N-glycosylation site), лейцин-богатого пептида (leucine-rich signal peptide, Lucy tag) и др. [18, 19]. Помимо этого, с помощью метода «направленной эволюции» (Directed Evolution) вводят и отбирают точечные мутации, способствующие повышению уровня функциональной экспрессии белка [20, 21]. Метод заключается в проведении случайного мутагенеза гена исследуемого рецептора при помощи склонной к ошибкам ПЦР (error-prone PCR) и последующей экспрессии мутантных рецепторов с клеточной сортировкой (а именно, Fluorescence-activated cell sorting, FACS). Для трансформации полученной библиотеки ДНК авторы «направленной эволю-

ции» используют клетки *E. coli* и *Saccharomyces cerevisiae* в силу простоты работы с ними. Однако главная особенность этого метода, без которой невозможно его использование, – наличие флуоресцентно меченного лиганда к изучаемому белку, который применяется для отбора мутантов с наилучшей функциональной экспрессией.

Другой этап подготовки GPCR состоит в получении конформационно стабильной конструкции рецептора, для чего из последовательности гена удаляют подвижные N- и/или C-концевые участки [22]. Также на место третьей внутриклеточной петли (ICL3) вставляют белки-партнеры, например, T4 лизоцим или термостабилизированный апоцитохромом *b*₅₆₂RIL (BRIL) [23]. Помимо стабилизации белка, они способствуют кристаллизации GPCR за счет увеличения относительно небольшой площади полярной поверхности рецепторов, доступной для формирования контактов кристаллической решетки. Структуры многих GPCR, например, β_2 AR [24], A_{2A}AR [25] и др., были получены с использованием таких «драйверов кристаллизации» (панель (a) на рисунке в Приложении). В качестве еще одного инструмента стабилизации GPCR используют схожие по действию «шапероны кристаллизации» – нанотела или Fab (антигенраспознающий фрагмент антитела) к участку последовательности рецептора (например, к BRIL [26]). Добавление лиганда к рецептору при выделении и последующей кристаллизации также снижает его конформационную подвижность и способствует образованию и росту кристаллов [27].

Так как успешность кристаллизации коррелирует с термостабильностью белка [28, 29], то в качестве подготовки к кристаллизации для ее повышения в последовательность рецептора вводят одиночные аминокислотные замены. Одним из способов поиска термостабилизирующих мутаций является аланиновое сканирование [22, 30]. Причем комбинация из полученных этим методом одиночных мутаций в большей степени увеличивает термостабильность рецептора [31]. Если проводить отбор термостабильных мутантов в присутствии агонистов или антагонистов, то можно найти такое сочетание мутаций в гене, которое бы, помимо термостабильности, снижало и конформационную подвижность рецептора. Авторы этого подхода используют выражение «конформационной термостабильности» для описания полученного эффекта, а рецепторы называют StaR (**Stabilized Receptor**) [32]. Несмотря на эффективность, экспериментальные методики получения последовательностей стабилизированных рецепторов нельзя считать рациональными из-за их ресурсоемкости и невозможности использовать полученные закономерности для других рецепторов.

Альтернативными экспериментальным являются подходы, использующие вычислительные методы. Известны *in silico* инструменты для предсказания термостабилизирующих мутаций у водорастворимых белков, но они не эффективны для GPCR, так как не учитывают природу трансмембранной части рецепторов. Это привело к разработке таких вычислительных инструментов, как CompoMug (**COMputational Predictions Of MUtations in GPCRs**) [33] и Construct design tool [34]. В основе CompoMug лежат компьютерные алгоритмы, построенные на четырех различных принципах. Первый сравнивает аминокислотную последовательность целевого GPCR с другими близкородственными рецепторами, пытаясь обнаружить девиантные остатки, замена которых на консервативные увеличила бы стабильность белка. Второй, основываясь на известных структурах, пытается построить специфические стабилизирующие взаимодействия (в том числе ковалентные в виде дисульфидных связей) между различными частями рецептора за счет введения в определенные места рецептора пар аминокислотных остатков. Третий алгоритм ищет в известных структурах других GPCR «полезные» мутации – такие, которые привели бы к повышению термостабильности рецептора и способствовали образованию кристаллов. Наконец, четвертый использует накопленные данные о стабильности сотен мутаций в различных GPCR для обучения предиктора машинного обучения распознаванию стабилизирующих мутаций. CompoMug экспериментально был успешно проверен на примерах серотонинового рецептора 5-HT_{2C} [35], цистеинил лейкотриенового рецептора 2-типа (CysLT₂R) [36, 37], канбиноидного рецептора CB₂ [38] и др. Алгоритмы Construct design tool устроены схожим образом, но предсказывают также аминокислотные остатки, которые, взаимодействуя, поддерживают активную или неактивную конформации рецептора.

Отдельным этапом подготовки GPCR является подбор условий выделения и очистки. Так как GPCR – трансмембранные белки и обладают амфифильной природой, в водных растворах они нестабильны и агрегируют из-за относительно большой гидрофобной части, изначально обращенной внутрь бислойной липидной мембраны. Поэтому при работе с этими белками необходимо подбирать такие мембраномоделирующие системы (MMC), которые бы позволили переводить белки из мембран в раствор (солюбилизовать) и их стабилизировали. Среди таких MMC можно выделить основные – мицеллы детергента и нанодиски [39]. Мягкие детергенты обеспечивают солюбилизацию GPCR без его денатурации. Чаще всего применяют n-додецил- β -D-мальтопиранозид (DDM) или неопентилгликоль лаурилмальтозы (LMNG), в качестве добавки к которым исполь-

зуют холестерил гемисукцинат (CHS) [39]. При этом подбирают не только оптимальный для данного рецептора и метода исследования детергент, но и соотношение количества добавляемого детергента (в процентах) к массе клеточных мембран, из которых выделяют белок. Среди альтернативных ММС стоит отметить нативные нанодиски и липодиски, для формирования которых и солюбилизации рецептора из мембран применяют химически синтезируемые сополимеры малеиновой кислоты или фрагмент белка сапозин А (Salipro) [40]. Такие мембраномоделирующие системы призваны в большей степени, чем мицеллы, стабилизировать изучаемый рецептор, а также сохранить его нативное липидное окружение.

Помимо выбора подходящих условий выделения, варьируют условия очистки. GPCR очищают с помощью хелат-аффинной хроматографии, для чего предварительно в ген белка вводят последовательность из десяти остатков His на C- или N-конец (положение индивидуально проверяют для каждого рецептора), также для аффинной хроматографии можно использовать FLAG-метку, которую обычно вводят на N-конец гена белка для детекции его экспрессии. В процессе очистки меняют объем и состав используемых буферных растворов, в частности подбирают оптимальную концентрацию солей (например, NaCl) и глицерина.

На каждом из вышеперечисленных этапов подготовки GPCR к кристаллизации проводят: оценку уровня полной и поверхностной экспрес-

сии белка методом проточной цитофлуориметрии с использованием флуоресцентно меченных антител; оценку гомогенности полученных препаратов белка методами аналитической эксклюзионной хроматографии и денатурирующего электрофореза в ПААГ; оценку термостабильности методами ДСФ (дифференциальной сканирующей флуориметрии) и анализа кривой плавления в присутствии тиол-специфических красителей (Thermal Shift Assay, TSA). На основе результатов анализа белка этими методами выбирают ряд потенциальных кандидатов для кристаллизации [41].

Кристаллизация GPCR. Для исследования GPCR методом MX рецепторы кристаллизуют в липидной кубической фазе (Lipidic Cubic Phase, LCP). Данный подход позволил получить первые детали высокого разрешения человеческих GPCR, связанных с лигандами (панель (в) на рисунке в Приложении), а 97% рентгеновских структур суперсемейства, полученных при помощи кристаллизации в LCP (*in meso*), имеют разрешение в среднем 2,8 Å [24].

LCP является одной из многих жидкокристаллических фаз, которые спонтанно образуются при смешивании определенных липидов с водой в соответствующих условиях. Данная фаза является биконтинуальной – состоит из одного липидного бислоя, который следует из бесконечной периодической минимальной поверхности, разделяющей пространство на две непересекающиеся сети водных каналов [42] (рис. 2, а).

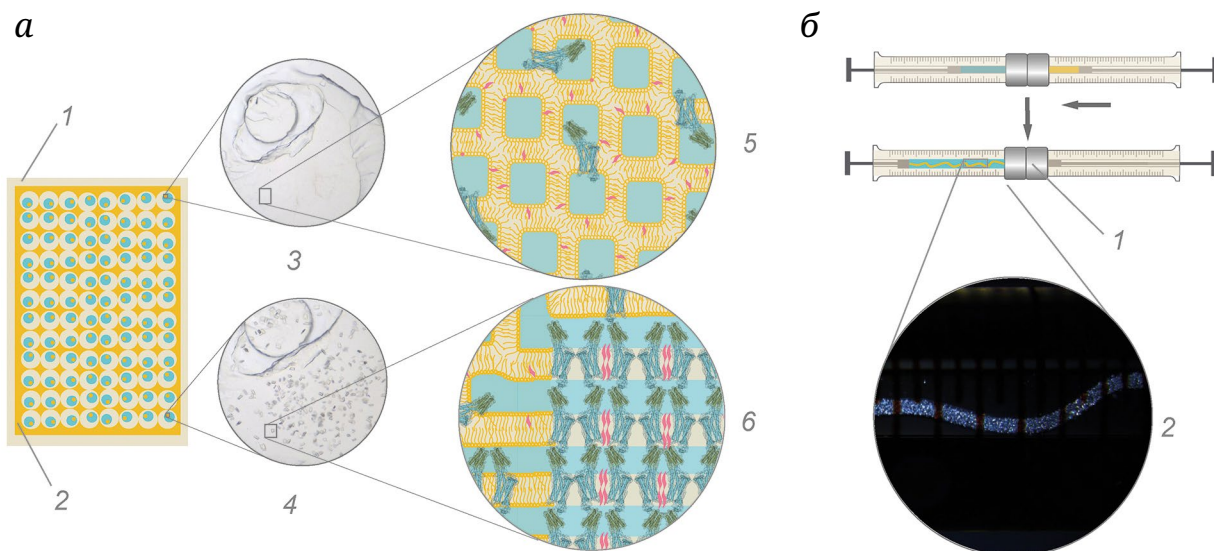


Рис. 2. Схематическое изображение получения кристаллов GPCR при использовании стеклянных плашек (а) с гидрофобным покрытием (1) и «спейсером» для разделения кристаллизационных условий (2). Кристаллизационная капля (обозначена голубым цветом) представляет собой буферный раствор преципитанта разного состава, в который с помощью робота вводится смесь белка с липидами – LCP (обозначена желтым цветом). Фото кристаллизационной капли (3 и 4). Проекция объемной LCP на плоскости представлена в момент начала кристаллизации (5) и в момент роста кристалла (6). Розовым цветом обозначены молекулы холестерина. б – Схематическое изображение получения кристаллов GPCR при использовании стеклянных шприцов: 1 – «каплер», 2 – фото шприца в кросс-поляризованном свете

При кристаллизации GPCR чаще всего используют смесь липидов моноолеин/холестерин, но использование других липидов тоже возможно [39]. Рецептор, встроенный в бислой кубической фазы, может диффундировать в трехмерном пространстве, оставаясь в липидном бислое, что обеспечивает приток белковых молекул из объема LCP к растущему кристаллу (рис. 2).

Успех использования липидной кубической фазы для выращивания высокоупорядоченных кристаллов мембранных белков человека можно объяснить несколькими факторами. Во-первых, LCP обеспечивает более нативную мембранную среду для белков в отличие от мицелл детергентов. Во-вторых, образуется кристаллическая упаковка I типа, где контакты образуются между полярными и неполярными частями белка, способствуя лучшему порядку в кристалле и дифракции, в отличие от кристаллизации белка из мицелл, где контактируют только водорастворимые участки белка (упаковка II типа) [43]. Кроме того, LCP может действовать как фильтр, эффективно удаляя из процесса кристаллизации крупноразмерные частицы и белковые агрегаты, мешающие росту кристаллов [44, 45].

Особенностью матриц LCP является изогнутость липидного бислоя, которая определяет скорость диффузии и в то же время делает энергетически выгодным образование кристаллов: гидрофобное несоответствие (*hydrophobic mismatch*), вызванное экспонированием трансмембранных участков в раствор, снижается при локальном спрямлении фазы (переход из кубической в ламеллярную), вызванном сближением белковых молекул (рис. 2) [46]. Использование специфических преципитантов (*precipitant*), таких как соли и полимеры полиэтиленгликоля, модулирует геометрические параметры фазы и гидрофильное окружение белка, способствующее образованию полярных внемембранных взаимодействий [47]. Кроме того, часто применяющийся полиэтиленгликоль выступает в качестве криопротектора во время извлечения и заморозки кристаллов для получения дифракционных данных.

При проведении кристаллизации выделенный белок смешивают с липидами в соотношении, необходимом для образования кубической фазы (обычно – 1/1,5). Перемешивание проводят с помощью воздухонепроницаемых шприцов, соединенных «каплером» (соединительный элемент), до образования прозрачной смеси, а затем к смеси в ~10-кратном избытке добавляют преципитант, заполняющий водные каналы фазы. Белок в LCP инкубируют при температуре 20–22 °C до окончания формирования кристаллов. Для исследований на синхротронах кристаллы выращивают с использованием специализированных стеклянных планше-

тов и кристаллизационных роботов, обеспечивающих возможность воспроизводимого нанесения капель LCP объемом от 25 нл, рост кристаллов детектируют при помощи микроскопии в видимом и кросс-поляризованном свете (рис. 2) [48]. Для исследований на XFEL фазу с белком при помощи каплера переносят в шприц с преципитантом, рост кристаллов при этом происходит вдоль длины шприца (рис. 2, б) [49]. Оптимальный состав преципитанта определяют итерационно перебором. Подспорьем служит метод восстановления флуоресценции после фотообесцвечивания (*Fluorescence recovery after photobleaching, FRAP*), где анализируют скорость диффузии GPCR в липидной фазе с использованием флуоресцентно меченного рецептора [47].

МХ-Методы исследования GPCR. Макромолекулярная или белковая рентгеновская кристаллография является методом получения трехмерных структур закристаллизованных макромолекул с использованием рентгеновского излучения. Благодаря упорядоченному строению кристалла, падающее на него рентгеновское излучение рассеивается и интерферирует, образуя дифракционные картины на детекторе, из которых затем удается восстановить атомарное строение изучаемого белка. Чтобы получить больше дифракционных данных, кристалл во время эксперимента вращают, собирая информацию под разными углами. От качества кристалла и параметров сбора дифракционных данных зависит разрешение конечной структуры. Чем лучше будет определено разрешение, тем больше деталей строения удастся установить, что позволит лучше понять функционирование белка на молекулярном уровне и создать надежную основу для разработки лекарств.

Основным толчком к развитию белковой кристаллографии послужило введение ультраярких источников синхротронного излучения (СИ) последних поколений. К ним относят установки класса «мегасайенс», называемые синхротронами, представляющие собой циклические ускорители заряженных частиц и являющиеся источниками рентгеновского излучения в большом энергетическом диапазоне. Непрерывный спектр СИ позволяет выбирать длину волны используемого излучения и получать дополнительную информацию об объектах методами аномальной дифракции [50]. Одним из параметров эффективности источника рентгеновского излучения является плотность генерируемого им потока. По своим характеристикам новейшие синхротроны 4-го поколения на сегодняшний день достигли потока 10^{35} фотонов/мм² в секунду, что на 15 порядков больше, чем в лабораторных рентгеновских источниках с вращающимся анодом [51]. Дальнейшие улучшения источников по этому параметру в силу

технических возможностей требуют строительства накопительных колец большего диаметра с еще более мощными сверхпроводящими магнитами. В качестве альтернативы в начале 2000-х гг. стали появляться источники рентгеновского излучения нового типа – рентгеновские лазеры на свободных электронах [52]. XFEL представляет собой линейный ускоритель, большую часть которого занимает длинный магнитный ондулятор [53]. Генерируемая им плотность потока составляет 10^{40} фотонов/мм² в секунду, что на 5 порядков выше, чем у мощнейших синхротронов [51]. На сегодняшний день в мире насчитывается более 70 синхротронов (<https://www.diamond.ac.uk/Home/About/FAQs/About-Synchrotrons>) и 5 XFEL (https://www.xfel.eu/facility/comparison/index_eng.html, <https://lightsources.org/lightsources-of-the-world/>).

Вместе с развитием установок СИ развитие получили станции MX – комплексы приборов, предназначенные для проведения дифракционных экспериментов. Одним из наиболее важных и технически сложных элементов станции является рентгеновский детектор. Благодаря высокой пространственной разрешающей способности и широкому динамическому диапазону работы в 2000-х гг. популярными были приборы с зарядовой связью – CCD-детекторы (coupled charge device) [54, 55]. Однако их существенными недостатками при проведении MX-экспериментов являются долгое время считывания и необходимость постоянного охлаждения для понижения темнового шума [51]. Поэтому на данный момент наиболее подходящими являются гибридные пиксельные детекторы (Hybrid Pixel Array Detector, HPAD) [56, 57]. Они состоят из двух независимо разрабатываемых частей: полупроводниковых матриц-сенсоров и считывающих схем (Application-Specific Integrated Circuit, ASIC). Независимость этих двух частей стала одним из ключевых нововведений в области создания детекторов. Работая совместно, эти части позволяют снизить количество шумов, по сравнению с CDD-детекторами, за счет того, что полупроводниковые сенсоры, улавливая рентгеновское излучение, при комнатной температуре работают стабильно, а ASIC оцифровывают считываемое сенсорами изображение напрямую. Помимо отсутствия шума считывания [51], такие детекторы имеют практически стопроцентную квантовую эффективность детектирования (Detective Quantum Efficiency, DQE) в нужном для белков диапазоне энергий, устойчивость и высокую скорость считывания, позволяющие наблюдать дифракцию в реальном времени. В настоящее время в связи с ростом числа источников СИ производство гибридных детекторов для синхротронов стало серийным: их созданием на коммерческой основе занимается несколько компаний, что существенно

упрощает проектировку экспериментальных станций. Тем не менее для XFEL гибридные детекторы разрабатываются индивидуально [13, 58].

Проведение экспериментов на описанных выше установках и развитие инструментария станций, к которому, помимо совершенствования детекторов, относится разработка микрофокусного оборудования, позволило снизить минимальный требуемый размер белковых кристаллов до микронного масштаба [59, 60], сократить время проведения эксперимента от суток до часов, существенно повысить качество получаемых дифракционных данных, что в совокупности позволяет решать более сложные и важные с научной точки зрения задачи [61]. Однако стоит отметить появившиеся вместе с тем особенности проведения дифракционного эксперимента – преждевременное радиационное повреждение образцов [62] и проблема доставки образца к источнику. Частично или полностью эти особенности учитываются в методах малосекторальной синхротронной и серийной белковой кристаллографии.

Малосекторальная синхротронная кристаллография. Кристалл во время эксперимента облучается и неизбежно получает радиационные повреждения, срок его жизни зависит от его размера и обратно пропорционален плотности падающего потока фотонов. Для эффективного сбора данных следует учитывать, что радиационные повреждения увеличивают кристаллическую мозаичность, изменяют объем элементарной ячейки и снижают получаемое количество пиков дифракции, помимо этого, изменения происходят в химических связях внутри белковой молекулы [63, 64]. Основным способом уменьшить вклад радиационных эффектов на сегодняшний день является последовательный сбор дифракционных данных с нескольких кристаллов микронного размера – микрокристаллов. Одну из первых работ с использованием такой стратегии для GPCR выполнила группа Вадима Черезова в 2007 г. [24]. Для получения структуры человеческого адренергического рецептора $\beta 2$ собрали дифракционные данные 40 кристаллов, средний размер которых составил $30 \times 15 \times 5$ микрон. При этом каждый кристалл снимали в диапазоне 5–10 градусов поворота петли, пока облучаемая доза не достигала предельного значения или кристалл не выходил из зоны облучения (рис. 3, а).

Сегодня данный метод называется малосекторальной синхротронной кристаллографией (Small-wedge Synchrotron Crystallography, SWSX) [65]. Его главное преимущество заключается в возможности подобрать оптимальный режим накопления интегральной интенсивности падающего потока фотонов для каждого кристалла из выборки, чего нельзя сделать при монокристалльном сборе

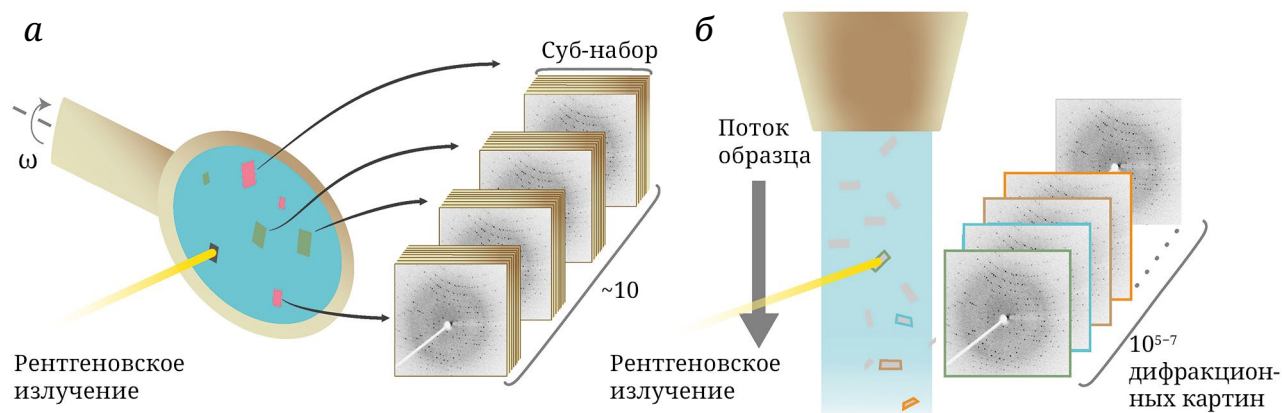


Рис. 3. Процесс сбора данных. *а* – В малосекторальной синхротронной кристаллографии (SWSX) данные последовательно собирают с нескольких кристаллов. При этом диапазон сбора для каждого кристалла определяется небольшим углом ω . *б* – Сбор данных в серийной кристаллографии нагляднее описывается с использованием инжектора в качестве системы доставки. С каждого кристалла, падающего под произвольным углом, собирается лишь одна картина дифракции, потом картины образуют единый набор

данных. Это позволяет увеличить дифрагирующий объем при накоплении данных во время съемки и обеспечивает дополнительный выигрыш в отношении сигнал/шум.

При проведении кристаллографического эксперимента одного кристалла в петлю вылавливают кристалл с линейными размерами порядка сотни микрон. Но микрокристаллы слишком малы, чтобы было возможным отделить их друг от друга при извлечении из липидной фазы. Поэтому в одной петле часто содержится несколько кристаллов. Другая особенность микрокристаллов мембранных белков и, в частности, GPCR, закристаллизованных в LCP, заключается в том, что они прозрачны – белки скрыты в липидном растворе, и их трудно распознать оптическим микроскопом – необходим другой способ их детектирования. В ранее упомянутой нами работе [24] исследователи впервые применили предварительное сканирование рентгеновским микропучком для поиска крошечных кристаллов в среде LCP. В наши дни данная процедура выполняется в автоматическом режиме [66, 67]. Благодаря автоматизации сегодня возможно провести сбор данных методом SWSX (малосекторальная синхротронная кристаллография) полностью удаленно, поскольку созданы программы, способные эффективно отцентрировать образцы, настроить яркость и размер пучка относительно измеряемых кристаллов, гарантируя определение оптимальной стратегии сбора данных [68]. Недавно одна из таких программ была использована для изучения структур CysLT₁R и CysLT₂R в комплексе с различными антагонистами [36, 37, 69].

Синергетическое развитие методов стабилизации GPCR, кристаллизации LCP *in meso* и микрокристаллографии в недавнем прошлом совершили революцию в структурной биологии GPCR. В 2007 г. при помощи SWSX была получена первая

структура гетерологически экспрессированного GPCR высокого разрешения [24], в том числе получилось достичь наивысшего для структурных исследований этой группы белков разрешения в 1,7 Å [70]. Для более сотни рецепторов были определены карманы связывания лиганда. Благодаря структурным исследованиям стабилизированного антагонистом неактивного состояния рецепторов, а также комплексов рецептора с G-белком [71] для GPCR класса А изучены примерный механизм активации рецептора с перемещением спиралей в его внутриклеточной части и перестроением консервативных мотивов-переключателей, а также роль аллостерического натрия в функционировании рецептора [72]. Кроме того, постоянное совершенствование приборной базы для SWSX и дальнейшая разработка кристаллографических подходов, таких как «вымачивание» кристаллов в буферах, содержащих различные лиганды (crystal soaking), делают методологию перспективным инструментом для SBDD [73].

Серийная белковая кристаллография. Одним из наиболее трудных этапов белковой кристаллографии все еще является получение хорошо дифрагирующих белковых кристаллов. Метод SWSX оказывается неэффективен, если максимальный размер кристаллов не превышает примерно 5 микрон, поскольку с них не удастся собрать данные подходящего качества и даже использовать процедуру предварительного сканирования [74] – максимальная доза облучения у них слишком мала. С появлением XFEL стало возможным успешно проводить эксперименты даже для таких образцов. Его ультраяркое излучение позволяет собирать данные благодаря эффекту «дифракция до разрушения» (diffraction-before-destruction): несмотря на то что кристалл разрушается вплоть до перехода в плазму под ультраярким рентгеновским

излучением, дифракционные картины удается детектировать быстрее, чем это произойдет [75]. Данный подход привел к созданию нового семейства методов – серийная фемтосекундная (Serial Femtosecond X-ray Crystallography, SFX) [76] и синхротронная (Serial Synchrotron X-ray Crystallography, SSX) [77] кристаллографии. Их существенное отличие от предыдущих методов в том, что набор данных собирают с тысяч изоморфных малых кристаллов, причем с каждого собирают только одну дифракционную картину [76], таким образом получают набор произвольно ориентированных картин дифракции (рис. 3, б). Друг от друга методы отличаются типом источника излучения.

Изучение кристаллов малого размера под интенсивным излучением требует разработки новых способов доставки образца к потоку фотонов. Система доставки образца является важным техническим аспектом серийной кристаллографии. На сегодняшний день в мире в основном применяют 2 типа систем: системы fixed-target и инжекторы. К первой группе также относятся и кристаллографические петли, используемые в классических подходах. За последние 15 лет были разработаны новые устройства, снижающие расход образца и фоновое рассеяние от растворителя, например, тонкие пленки из силикона [78] или синтетического полимера [79]. Созданы пленки, в которых можно вырастить кристаллы и провести сбор данных *in situ*, с заранее известными положениями кристаллов [80], что очень удобно для серийной кристаллографии. Второй тип систем доставки – инжекторы, которые выпускают поток кристаллов, ресуспендированных в подходящей среде-носителе, перпендикулярно траектории рентгеновского луча (рис. 3, б). Главный их недостаток – высокий расход образца, но инжекторы активно модифицируют. На данный момент для мембранных белков широко популярен инжектор вязкой среды – он обеспечивает широкий диапазон скоростей потока с расходом до 1 нл/мин и совместим с LCP [81]. Помимо указанных систем доставки, существует совершенно иная, называемая drop-on-demand [82]. Она сочетает акустический выброс капель с приводом конвейерной ленты, что облегчает одновременный сбор дифракционных и спектроскопических данных при наблюдении за конформационными перестройками в исследуемых белках [83].

Помимо систем доставки образцов, существуют другие особенности серийных методов, которые приходится учитывать при проектировании экспериментальных станций и разработке специализированного программного обеспечения (ПО). Ультрарезкий поток рентгеновского излучения создает огромное количество дифракционных картин (порядка сотен тысяч) за предельно малое

время, что требует создания детекторов с очень низким временем считывания и ПО для быстрой и автоматической их первичной обработки [13]. Другая особенность состоит в том, что дифракционные картины, считанные с каждого кристалла в случайной ориентации, отличаются от классических характером интерференции – интенсивности рефлексов не имеют интегральной информации. Минимизировать влияние этой особенности при обработке полученных данных можно за счет незначительного вращения кристаллов во время съемки – это позволяет проводить SSX при условии использования fixed-target-системы доставки образцов, что является преимуществом метода над SFX [74].

Для первичной обработки поступающих дифракционных картин на сегодняшний день разработаны и внедрены в системы станций на XFEL следующие ПО: Cheetah [67], NanoPeakCell [84], neural network [85], Zaef [86], Dials [87], nXDS [88], cctbx.spotfinder [89]. Принцип их работы следующий: они быстро сканируют получаемые изображения с целью идентификации дифракционных картин и отбрасывают пустые изображения, а также выполняют подготовку данных к последующей ручной обработке [74]. Для интегрирования, шкалирования дифракционных картин, имеющих случайную ориентацию, также существует несколько ПО: CrystFEL [90], ccrpxfel [91], Dials, nXDS, cctbx.spotfinder. Проблема учета отсутствия интегральной интенсивности решается в них по-разному, преимущественно с использованием методов Монте-Карло [13].

Итак, серийная белковая кристаллография, в частности SFX, является важным инструментом для структурных исследований GPCR. Первая проба метода была проведена на серотониновом рецепторе 5-HT_{2B} [92], для которого проводили сравнение с ранее решенной структурой: при общей схожести моделей было обнаружено несколько отличий в положениях аминокислотных остатков, что объясняли сбором данных при отсутствии заморозки. Стоит также отметить, что метод SFX позволил получить структуру высокого разрешения комплекса родопсина с аррестином, что до этого было невозможно ввиду малого размера кристаллов [93]. Но, несмотря на очевидные перспективы использования SFX, существуют несколько факторов, ограничивающих данный метод. Один из них – малое количество XFEL-установок: на сегодняшний день существует только пять доступных для МХ-исследований. При этом на одну установку приходится меньше станций, чем на один синхротрон. Это создает высокий спрос и существенно ограничивает число структурных экспериментов с их использованием. Первый доступный для МХ-экспериментов XFEL появился в 2011 г. [76].

А с 2017 г. крио-ЭМ стала конкурентоспособной альтернативой для получения структур GPCR – более широкая доступность электронных микроскопов и качество получаемых с них данных еще сильнее ударила по популярности SFX в области. В результате, несмотря на свои преимущества, метод SFX так и не стал популярным.

КРИОЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ

Описание метода и особенности современных микроскопов. Крио-ЭМ – совокупность процедур и инструментов, в основе которых лежит

детекция электронного пучка, проходящего через тонкослойный замороженный образец белка в растворе [94]. Данный подход применяется для GPCR с 2017 г. и к 2020 г. обогнал по популярности рентгеновскую кристаллографию, став важным подспорьем для рациональной разработки лекарств на основе структурных данных. Ряд технологических усовершенствований метода, таких как разработка детекторов, напрямую регистрирующих электроны [95], энергетические фильтры, отсеивающие неупруго рассеянные электроны [96], золотые сетки, обеспечивающие правильный режим абсорбции, снижение деформации при витрификации и меньшую подвижность образца во время

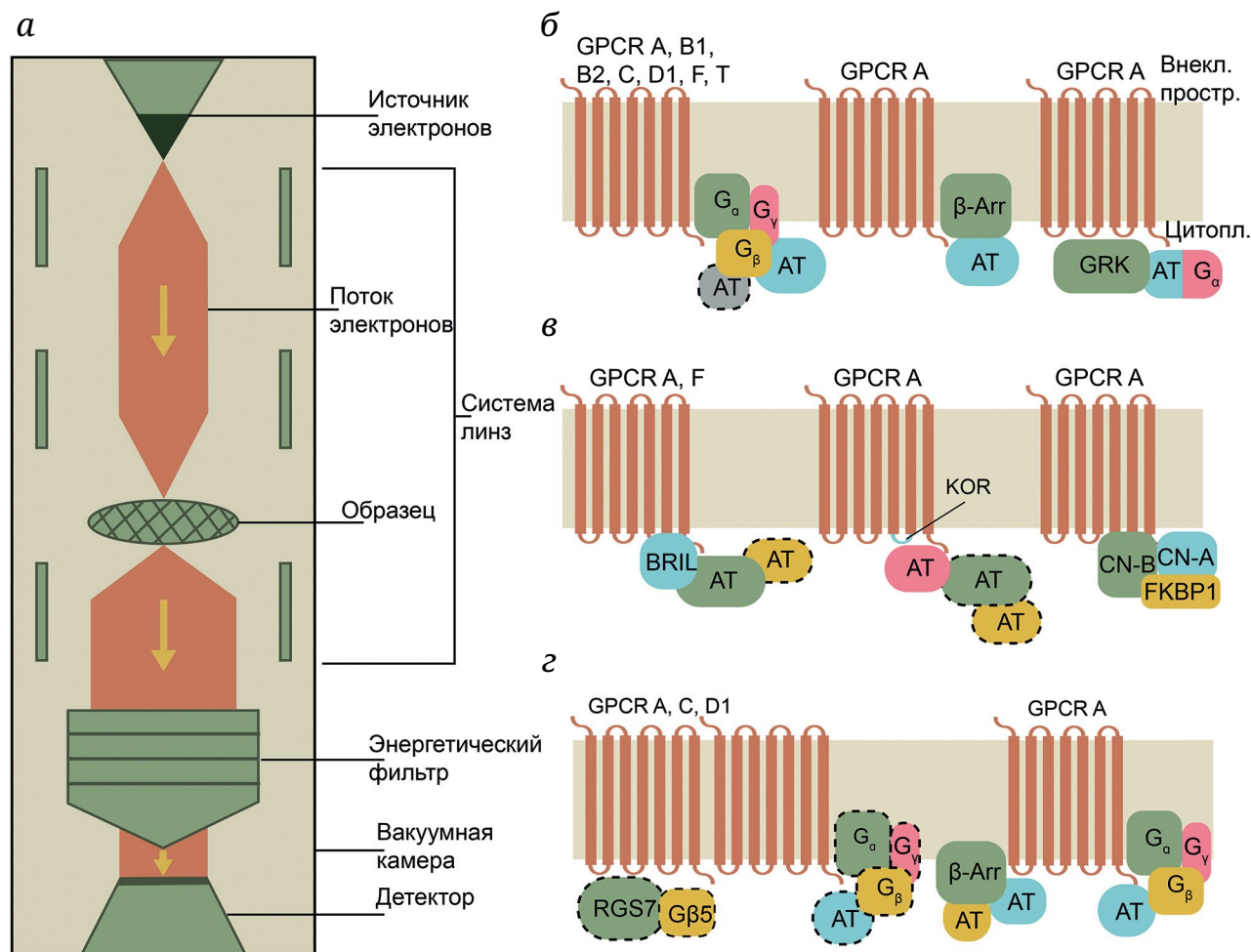


Рис. 4. Крио-ЭМ в исследовании GPCR. *а* – Схема электронного микроскопа. *б* – GPCR-комплексы в активном состоянии: комплекс GPCR–G-белок (более 80% структур, полученных методом крио-ЭМ), стабилизированный одним или двумя фрагментами антитела (наиболее популярные – scFv16, Nb-35, а также различные типы Fab); комплекс GPCR–β-аррестин-1, стабилизированный фрагментом антитела (наиболее популярные – scFv30 и Fab30 (gpcrdb.org)); комплексы GPCR–GRK, стабилизированные Fab в случае GRK₁, и комплекс GPCR–GRK₂–G_α. *в* – GPCR-комплексы в неактивном состоянии: с использованием белка-партнера в ICL3 (чаще всего BRIL), стабилизированные специфичным к партнеру антителом и, в некоторых случаях, вторичным нанотелом; с заменой ICL3 на ICL3 κ-опиоидного рецептора, стабилизированные специфичным нанотелом и, в некоторых случаях, вторичным Fab или вторичным Fab + анти-Fab Nb («сэндвич из антител»); комплекс с заменой ICL3 на CN-B, а C-конца – на CN-A-субъединицы кальцинеина, стабилизированного белком FKBP₁₂. *г* – Мегакомплексы GPCR: гомо- и гетеродимеры в активном и неактивном состояниях, в комплексе с G-белком (для некоторых активных структур) и с регулятором G-белок-сигнализации, связанным с белком Gβ5 (для некоторых неактивных структур) [99]; мегакомплекс GPCR с G-белком и β-аррестином, стабилизированный антителами

облучения [97], а также разработка и оптимизация ПО для обработки данных [98] привели к созданию эффективного подхода для массового получения пространственных структур высокого разрешения, в том числе и для таких сложных объектов, как GPCR.

Современные электронные микроскопы состоят из источника электронов, генерирующих пучок, серии электронных линз и корректирующей оптики, размещенных перед образцом и фокусирующих на нем луч, а также детектора, улавливающего прошедший луч (рис. 4, а).

В большинстве коммерческих микроскопов используются два вида источников электронов: полевые эмиссионные термоэмиссионные пушки (High-brightness Field Emission Gun, XFEG) и охлажденные полевые эмиссионные пушки (Cold Field Emission Gun, CFEG). Меньший разброс энергии испускаемых электронов улучшает временную когерентность электронного пучка, что приводит к лучшему соотношению сигнал/шум в формируемых изображениях, поэтому CFEG, которые генерируют электронный пучок с разбросом энергии около 0,3 эВ без потери яркости луча, по сравнению с XFEG, у которых разброс составляет 0,7 эВ, представляют собой предпочтительную альтернативу [100]. Но XFEG отличаются высокой надежностью и имеют более скромные требования к качеству вакуума, поэтому продолжают составлять конкуренцию CFEG. Большинство структур с высоким разрешением получают на микроскопах с напряжением в 300 кэВ, однако для уменьшения радиационного повреждения и стоимости экспериментов разрабатывают приборы и техники для съемки при 200 и даже 100 кэВ [101, 102] без потери в разрешении.

Полученный поток электронов фокусируется системой линз, которые представляют собой электромагниты (рис. 4, а). Траектории движения электронов могут изменяться в зависимости от величины тока, подаваемого на электромагниты. В микроскопе используются конденсорные линзы и линзы объектива. С помощью конденсорной линзы электронный пучок, выходящий из катода, сходится и коллимируется в относительно параллельный поток. Линзы объектива используются для фокусировки электронного луча в точку зондирования на поверхности образца и для дальнейшего направления луча [103].

В результате фокусировки при помощи линз в луче возникают сферические и хроматические aberrации. Проблему сферических aberrаций и aberrаций более высокого порядка в настоящее время решают при помощи корректоров aberrаций [104], однако хроматические aberrации в сочетании с разбросом энергии источника электронов продолжают накладывать ограничения на

пространственное разрешение. Отчасти хроматические aberrации могут быть скомпенсированы корректором хроматических aberrаций [105]. Другим подходом к улучшению распределения энергии электронов является энергетическая фильтрация падающего луча с помощью монохроматора. Монохроматоры могут улучшать энергетический разброс, но делают это за счет уменьшения потока, однако их использование значительно повышает разрешение финальной структуры [96].

После прохождения сквозь образец и корректировки при помощи оптики луч попадает на детектор. Ранее в качестве детекторов использовали устройства с зарядовой связью. Как уже указывалось, CCD-детекторы обладают длительным временем считывания, и решением проблемы могло бы стать использование CCD-детектора в режиме прямого обнаружения, однако при этом высок уровень радиационных повреждений, что делает срок службы детекторов слишком коротким для регулярного использования. Поэтому в настоящее время данный вид детекторов практически не используют. Альтернативой CCD-детекторам стали прямые детекторы электронов (Direct Electron Detector, DED), которые представлены HPAD, эксплуатирующими идею разделения датчика и считывающей электроники, и пиксельными датчиками (Active Pixel Sensor, APS) с технологией комплементарных металлоксидных полупроводников (Complementary Metal Oxide Semiconductor, CMOS). С внедрением DED произошло значительное увеличение количества структур высокого разрешения, а также случился качественный скачок предела разрешения до $\sim 1,2 \text{ \AA}$ [96]. Одним из последних достижений в усовершенствовании технологии детекции стала запись данных в формате представления электронных событий (Electron Event Representation, EER) [106]. В этом формате записывают единичные события детекции электронов с указанием места и времени события. Такой формат уменьшает необходимый объем памяти для записи, а также облегчает дальнейшую коррекцию движения, применяемую при обработке.

Получение образцов для крио-ЭМ. Особенностью крио-ЭМ является наличие нижнего предела по массе исследуемого объекта, поэтому в настоящее время при помощи этого метода преимущественно исследуют GPCR, находящиеся в активном состоянии в комплексе с G-белками (панель (г) на рисунке в Приложении) [107]. Для получения комплекса чаще всего проводят коэкспрессию GPCR с субъединицами G-белка в клеточной культуре [108]. После получения биомассы клетки разрушают, процесс образования комплекса стимулируют за счет инкубации лизата с агонистом и стабилизирующими комплекс антителами, например, Nb53, а также апиразой для стабилизации

комплекса GDP-G α [109]. Получившийся комплекс встраивают в мицеллы детергента в процессе солюбилизации и иммобилизируют на аффинном сорбенте при помощи введенного в аминокислотную последовательность тага, часто – polyHis или FLAG [110]. После промывок на смоле и элюции белковый образец концентрируют, и проводят препаративную эксклюзионную хроматографию для отделения фракции, содержащей комплекс [111]. Образец затем наносят на углеродную [112] или золотую сетку [108], которую предварительно подвергают воздействию тлеющего разряда для обеспечения лучших условий адсорбции образца. После удаления избыточного количества образца (blotting) в рамках процедуры подготовки сетки, сетку замораживают в жидком этане: происходит витрификация, это обеспечивает аморфность льду и делает возможными крио-измерения. Для витрификации используют автоматические установки [113]. Съемку изображений проводят на крио-электронных микроскопах с энергией электронов 300 кэВ, в некоторых случаях – 200 кэВ [114]. Длительность съемки ограничена из-за радиационных повреждений, возникающих в образце, поэтому за секунды записывают порядка 10 000 видеороликов с изображениями сетки [115].

В сравнении с MX, для подготовки образца к которому требуется провести колоссальную работу по подбору условий экспрессии, выделению, очистке и стабилизации белка [39], подготовка образца к проведению крио-ЭМ требует гораздо меньших усилий. В частности, отсутствует необходимость введения в белок термостабилизирующих мутаций, а также белков-драйверов кристаллизации; количество рецептора, необходимое для крио-ЭМ-исследований, существенно меньше, чем требуется для подбора кристаллизационных условий и проведения кристаллизации в шприцах, используемой в серийной фемтосекундной кристаллографии [116], а значит снимается ограничение по уровню поверхностной экспрессии рецептора. Зачастую для крио-ЭМ GPCR используют белок дикого типа [117, 118]. Несмотря на это, для подготовки белкового препарата для крио-ЭМ-исследований необходимо проводить оптимизацию условий коэкспрессии GPCR и белков-компонентов комплекса, на этапе очистки препарата вводят дополнительные стадии очистки, для контроля чистоты препарата и подтверждения успешной сборки комплекса проводят ряд дополнительных экспериментов, также варьируют условия нанесения образца на сетки и дальнейшей заморозки [119, 120].

Важную роль в подготовке образцов для крио-ЭМ играют мембраномоделирующие системы. В отличие от MX, где солюбилизированный в мицеллы GPCR кристаллизуют в LCP, для крио-ЭМ

рецептор замораживают из раствора мицелл или нанодисков, поэтому к белковому препарату предъявляют дополнительные требования по монодисперсности и функциональности. Наиболее популярными ММС для крио-ЭМ-исследований являются мицеллы на основе LMNG благодаря его низкой ККМ (критическая концентрация мицеллообразования) – это уменьшает количество свободных молекул детергента и пустых мицелл в растворе и, как следствие, улучшает качество образца и получаемых с него данных. Кроме того, используют добавки CHS и дигитонина или глико-диосгенина (GDN) для формирования более стабильных мицелл и создания близкого к нативному окружения рецептора [121, 122]. Использование нанодисков на основе мембранных каркасных белков (MSP) и сапозин-липопротеинов (Salipro), а также полимеров на основе малеиновой кислоты (SMA) и амфиблей позволяет повысить контраст данных крио-ЭМ, а также обеспечивает более нативное, чем в мицеллах, и стабилизирующее окружение мембранных белков [121]. Так, комплекс нейротензинового рецептора NTSR $_1$, встроенного в циркуляризованные нанодиски (cNW), был разрешен без использования дополнительных стабилизирующих антител и нанотел, что привело к открытию новых механизмов взаимодействия рецептора с G-белком [123]; для комплекса D $_2$ -дофаминового рецептора D $_2$ R с G-белком, встроенного в нанодиски на основе MSP1D1, были исследованы взаимодействия восьмой спирали рецептора с липидным бислоем [124]. Для адренергического рецептора β_1 (β_1 AR), встроенного в нанодиски на основе белка zap1, и мускаринового ацетилхолинового рецептора M $_2$ (M $_2$), встроенного в нанодиски на основе MSP1D1H5 и MSP1D1E3, было исследовано взаимодействие рецептора с β -аррестином [125, 126].

Обработка данных крио-ЭМ. Процесс обработки крио-ЭМ-изображений за последнее десятилетие становится все более стандартизированным. Обработка данных начинается с вычислений, предназначенных для коррекции движения образца. Для учета радиационных повреждений снимки фильтруют [127]. Частицы на снимках идентифицируют на исправленных микрофотографиях, после чего проводят двумерное (2D) выравнивание, классификацию и усреднение изображений частиц. Обработанное подмножество частиц подвергают циклам трехмерной (3D) классификации, выполняемой при помощи сопоставления проекций. 3D-Классификация служит для определения угловых распределений частиц [128]. Затем для улучшения разрешения трехмерной реконструкции угловые распределения для каждого класса уточняют отдельно [129]. По полученным 3D-классам строят модели белков и происходит их валидация при помощи различных метрик.

Основной метрикой качества для данных крио-ЭМ является кривая корреляции оболочек Фурье (FSC или номинальное разрешение) [115], которая измеряет согласованность между двумя независимо уточненными «полукартами», каждая из которых содержит случайный полунабор данных, в зависимости от пространственного разрешения. Значение, полученное при $FSC = 0,143$, обычно принимают как номинальное разрешение карты [130].

Исследования GPCR методом крио-ЭМ.

С помощью крио-ЭМ удалось исследовать взаимодействие GPCR со всеми основными группами G-белков (рис. 4, б). Были исследованы особенности механизмов передачи сигнала GPCR в случае смещенной активности, что важно для современной фармакологии [131]. Кроме того, при помощи крио-ЭМ были изучены взаимодействия GPCR с β -аррестином-1 и GRK-киназами типа 1 и 2 [132–134], а также получена структура мега-комплекса вазопрессинового рецептора 2-типа AVPR₂, связанного одновременно с G-белком и β -аррестином (рис. 4, з) [135].

При помощи крио-ЭМ возможно получение неактивного состояния GPCR (рис. 4, в). Для этого существует несколько подходов. Один из них – создание комплекса гетеродимера кальцинейрина с GPCR, стабилизированного связью между кальцинейрином и спиралями 5, 6 и 7 рецептора [131]. Другой заключается в том, чтобы вместо ICL3 GPCR вставить BRIL и использовать комплекс антител Fab/Nb против BRIL. Альтернативно вместо ICL3 вставляют домен гликогенсинтазы из *Pyrococcus abyssi* (PGS) без использования дополнительных антител [136] или аналогичный участок из к-опиоидного рецептора, к которому было разработано нанотело Nb6 [137], в последнем случае масса исследованного комплекса составила 60 кДа, что почти в 3 раза меньше по сравнению с гетеропентамерными комплексами первых крио-ЭМ GPCR-структур массой 160 кДа [109, 138, 139]. Это соответствует общему тренду уменьшения массы белковых препаратов, исследуемых методом крио-ЭМ [140]. Помимо перечисленных подходов, для исследования неактивных состояний рецепторов применяют «сэндвичи» из нескольких фрагментов антител, так, например, получили структуру комплекса гистаминового рецептора H₂R с фрагментом к-опиоидного рецептора + Nb6 + NabFab + анти-Fab Nb [137]. К числу частных примеров неактивных структур GPCR можно отнести структуры: рецептора тиреотропного гормона с ингибирующим аутоантителом [141], комплекса кальцитонинного рецептора с белком, модифицирующим активность рецептора (RAMP₁) [142], а также комплекса хемокинового рецептора с оболочечным белком gp160 ВИЧ и

водорастворимого домена рецептора CD4 Т-лимфоцита [143].

Интересным примером изучения GPCR при помощи крио-ЭМ является исследование димеризации рецепторов – важного модулятора функциональной активности белков. Так, получено несколько десятков структур представителей GPCR класса C: гомо- и гетеродимеров ГАМК-B GPCR, а также метаботропных глутаматных рецепторов как в активной, так и в неактивной формах. Стоит отметить пример структуры гомодимера апелинового рецептора, принадлежащего к GPCR класса A, а также несколько структур STE₂ – грибного рецептора класса D [131, 144, 145].

Несмотря на то что крио-ЭМ все еще уступает в разрешении рентгеноструктурному анализу, метод активно развивается: с момента первых GPCR-структур в 2017 г. с разрешением более 4 Å к 2021 г. в качестве крио-ЭМ-данных произошел существенный скачок – удалось достичь разрешения в 2 Å для структуры холецистокинового рецептора CCK₁ [146]. Стоит отметить, что разрешение структур крио-ЭМ неоднородно, оно, как правило, лучше в области образования комплекса и ухудшается в области внеклеточных петель, а в публикациях часто указывают номинальное разрешение. Однако отсутствие фазовой проблемы, характерной для МХ, быстрое развитие приборной и программной баз для крио-ЭМ позволяет ежегодно получать все большее число структур, пригодных для использования в SBDD [147] (панель (б) на рисунке в Приложении).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Благодаря развитию белковой кристаллографии и крио-ЭМ область структурной биологии стремительно развивается: в последние годы число полученных структур рецепторов класса GPCR растет экспоненциально. До 2010 г. было решено всего 6 уникальных структур «рецептор–лиганд», а после 2010 г. – 152, и 70 из них получены в период с 2021 по 2022 г. (панель (в) на рисунке в Приложении). В данном обзоре мы показали, какое существенное влияние на разработку лекарств оказали последние достижения методов структурной биологии. Возможность использования информации о структуре GPCR сделало многоэтапный процесс создания фармакологических агентов рациональным, а значит более эффективным.

Вклад авторов. А.М., Н.С. подготовили текст введения; В.П., А.Б., П.Х., В.Б. подготовили раздел по белковой кристаллографии; А.Л., Д.Д. подготовили раздел по криоэлектронной микроскопии; А.Л., П.Х., В.П., Д.Д., А.Х., А.Б. работали над рисунками;

О.М. принимала участие в редактировании текста рукописи; П.Х., А.Л., А.М., В.Б. предложили концепцию, план обзора, редактировали текст рукописи.

Финансирование. Раздел «Подготовка GPCR к кристаллизации» подготовлен при поддержке Российского научного фонда (проект № 22-74-00024, <https://rscf.ru/project/22-74-00024/>); раздел «Кристаллизация GPCR» выполнен в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования (грантовое соглашение № 075-03-2024-117, проект № FSMG-2024-0012); раздел «МХ-методы исследования GPCR» подготовлен при поддержке Министерства науки и высшего образования

(грантовое соглашение № 075-15-2021-1354); раздел «Криоэлектронная микроскопия» подготовлен при поддержке Российского научного фонда (проект № 22-74-10036, <https://rscf.ru/project/22-74-10036/>).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hughes, J. P., Rees, S., Kalindjian, S. B., and Philpott, K. L. (2011) Principles of early drug discovery, *Br. J. Pharmacol.*, **162**, 1239-1249, <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.01127.x>.
2. Paul, S. M., Mytelka, D. S., Dunwiddie, C. T., Persinger, C. C., Munos, B. H., Lindborg, S. R., and Schacht, A. L. (2010) How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **9**, 203-214, <https://doi.org/10.1038/nrd3078>.
3. Liu, R., Li, X., and Lam, K. S. (2017) Combinatorial chemistry in drug discovery, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **38**, 117-126, <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.03.017>.
4. Nguyen, A. T. N., Nguyen, D. T. N., Koh, H. Y., Toskov, J., MacLean, W., Xu, A., Zhang, D., Webb, G. I., May, L. T., and Halls, M. L. (2023) The application of artificial intelligence to accelerate G protein-coupled receptor drug discovery, *Br. J. Pharmacol.*, <https://doi.org/10.1111/bph.16140>.
5. Van Montfort, R. L. M., and Workman, P. (2017) Structure-based drug design: aiming for a perfect fit, *Essays Biochem.*, **61**, 431-437, <https://doi.org/10.1042/EBC20170052>.
6. Beddell, C. R., Goodford, P. J., Norrington, F. E., Wilkinson, S., and Wootton, R. (1976) Compounds designed to fit a site of known structure in human haemoglobin, *Br. J. Pharmacol.*, **57**, 201-209, <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1976.tb07468.x>.
7. Talele, T. T., Khedkar, S. A., and Rigby, A. C. (2010) Successful applications of computer aided drug discovery: moving drugs from concept to the clinic, *Curr. Top. Med. Chem.*, **10**, 127-141, <https://doi.org/10.2174/156802610790232251>.
8. Kim, C. U., Lew, W., Williams, M. A., Liu, H., Zhang, L., Swaminathan, S., Bischofberger, N., Chen, M. S., Mendel, D. B., Tai, C. Y., Laver, W. G., and Stevens, R. C. (1997) Influenza neuraminidase inhibitors possessing a novel hydrophobic interaction in the enzyme active site: design, synthesis, and structural analysis of carbocyclic sialic acid analogues with potent anti-influenza activity, *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 681-690, <https://doi.org/10.1021/ja963036t>.
9. Zhu, K.-F., Yuan, C., Du, Y.-M., Sun, K.-L., Zhang, X.-K., Vogel, H., Jia, X.-D., Gao, Y.-Z., Zhang, Q.-F., Wang, D.-P., and Zhang, H.-W. (2023) Applications and prospects of cryo-EM in drug discovery, *Mil. Med. Res.*, **10**, 10, <https://doi.org/10.1186/s40779-023-00446-y>.
10. Editorial (2016) Method of the Year 2015, *Nat. Methods*, **13**, 1, <https://doi.org/10.1038/nmeth.3730>.
11. Robertson, M. J., Meyerowitz, J. G., and Skiniotis, G. (2022) Drug discovery in the era of cryo-electron microscopy, *Trends Biochem. Sci.*, **47**, 124-135, <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2021.06.008>.
12. Renaud, J.-P., Chari, A., Ciferri, C., Liu, W.-T., Rémy, H.-W., Stark, H., and Wiesmann, C. (2018) Cryo-EM in drug discovery: achievements, limitations and prospects, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **17**, 471-492, <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.77>.
13. Mishin, A., Gusach, A., Luginina, A., Marin, E., Borshchevskiy, V., and Cherezov, V. (2019) An outlook on using serial femtosecond crystallography in drug discovery, *Expert Opin. Drug Discov.*, **14**, 933-945, <https://doi.org/10.1080/17460441.2019.1626822>.
14. Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Židek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohli, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., Back, T., Petersen, S., Reiman, D., Clancy, E., Zielinski, M., Steinegger, M., Pacholska, M., Berghammer, T., Bodenstein, S., Silver, D., Vinyals, O., Senior, A. W., Kavukcuoglu, K., Kohli, P., and Hassabis, D. (2021) Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold, *Nature*, **596**, 583-589, <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>.
15. Baek, M., DiMaio, F., Anishchenko, I., Dauparas, J., Ovchinnikov, S., Lee, G. R., Wang, J., Cong, Q., Kinch, L. N., Schaeffer, R. D., et al. (2021) Accurate prediction of protein structures and interactions using a three-track neural network, *Science*, **373**, 871-876, <https://doi.org/10.1126/science.abj8754>.

16. Selinsky, B. S. (2003) *Membrane Protein Protocols*, Humana Press, <https://doi.org/10.1385/159259400x>.
17. Luginina, A., Maslov, I., Khorn, P., Volkov, O., Khnykin, A., Kuzmichev, P., Shevtsov, M., Belousov, A., Dashevskii, D., Kornilov, D., et al. (2023) Functional GPCR expression in eukaryotic LEXSY system, *J. Mol. Biol.*, **23**, 168310, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2023.168310>.
18. Quitterer, U., Pohl, A., Langer, A., Koller, S., and Abdalla, S. (2011) A cleavable signal peptide enhances cell surface delivery and heterodimerization of Cerulean-tagged angiotensin II AT1 and bradykinin B2 receptor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **409**, 544-549, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.05.041>.
19. Shepard, B. D., Natarajan, N., Protzko, R. J., Acres, O. W., and Pluznick, J. L. (2013) A cleavable N-terminal signal peptide promotes widespread olfactory receptor surface expression in HEK293T cells, *PLoS One*, **8**, e68758, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068758>.
20. Sarkar, C. A., Dodevski, I., Kenig, M., Dudli, S., Mohr, A., Hermans, E., and Plückthun, A. (2008) Directed evolution of a G protein-coupled receptor for expression, stability, and binding selectivity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 14808-14813, <https://doi.org/10.1073/pnas.0803103105>.
21. Schlömann, K. M., and Plückthun, A. (2013) Directed evolution of G-protein-coupled receptors for high functional expression and detergent stability, *Methods Enzymol.*, **520**, 67-97, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391861-1.00004-6>.
22. Warne, T., Serrano-Vega, M. J., Tate, C. G., and Schertler, G. F. X. (2009) Development and crystallization of a minimal thermostabilised G protein-coupled receptor, *Protein Expr. Purif.*, **65**, 204-213, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.01.014>.
23. Chun, E., Thompson, A. A., Liu, W., Roth, C. B., Griffith, M. T., Katritch, V., Kunken, J., Xu, F., Cherezov, V., Hanson, M. A., and Stevens, R. C. (2012) Fusion partner toolchest for the stabilization and crystallization of G protein-coupled receptors, *Structure*, **20**, 967-976, <https://doi.org/10.1016/j.str.2012.04.010>.
24. Cherezov, V., Rosenbaum, D. M., Hanson, M. A., Rasmussen, S. G. F., Thian, F. S., 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 beta2-adrenergic G protein-coupled receptor, *Science*, **318**, 1258-1265, <https://doi.org/10.1126/science.1150577>.
25. Liu, W., Chun, E., Thompson, A. A., Chubukov, P., Xu, F., Katritch, V., Han, G. W., Roth, C. B., Heitman, L. H., IJzerman, A. P., et al. (2012) Structural basis for allosteric regulation of GPCRs by sodium ions, *Science*, **337**, 232-236, <https://doi.org/10.1126/science.1219218>.
26. Miyagi, H., Suzuki, M., Yasunaga, M., Asada, H., Iwata, S., and Saito, J. I. (2023) Structural insight into an anti-BRIL Fab as a G-protein-coupled receptor crystallization chaperone, *Acta Crystallogr. D. Struct. Biol.*, **79**, 435-441, <https://doi.org/10.1107/S205979832300311X>.
27. Lebon, G., Warne, T., Edwards, P. C., Bennett, K., Langmead, C. J., Leslie, A. G. W., and Tate, C. G. (2011) Agonist-bound adenosine A2A receptor structures reveal common features of GPCR activation, *Nature*, **474**, 521-525, <https://doi.org/10.1038/nature10136>.
28. Niesen, M. J. M., Bhattacharya, S., Grisshammer, R., Tate, C. G., and Vaidehi, N. (2013) Thermostabilization of the β 1-adrenergic receptor correlates with increased entropy of the inactive state, *J. Phys. Chem. B*, **117**, 7283-7291, <https://doi.org/10.1021/jp403207c>.
29. Vaidehi, N., Grisshammer, R., and Tate, C. G. (2016) How can mutations thermostabilize G-protein-coupled receptors?, *Trends Pharmacol. Sci.*, **37**, 37-46, <https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.09.005>.
30. Yang, L.-K., and Tao, Y.-X. (2020) Alanine scanning mutagenesis of the DRYxxI motif and intracellular loop 2 of human melanocortin-4 receptor, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 7611, <https://doi.org/10.3390/ijms21207611>.
31. Shibata, Y., Gvozdenovic-Jeremic, J., Love, J., Kloss, B., White, J. F., Grisshammer, R., and Tate, C. G. (2013) Optimising the combination of thermostabilising mutations in the neurotensin receptor for structure determination, *Biochim. Biophys. Acta*, **1828**, 1293-1301, <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2013.01.008>.
32. Robertson, N., Jazayeri, A., Errey, J., Baig, A., Hurrell, E., Zhukov, A., Langmead, C. J., Weir, M., and Marshall, F. H. (2011) The properties of thermostabilised G protein-coupled receptors (StaRs) and their use in drug discovery, *Neuropharmacology*, **60**, 36-44, <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2010.07.001>.
33. Popov, P., Peng, Y., Shen, L., Stevens, R. C., Cherezov, V., Liu, Z.-J., and Katritch, V. (2018) Computational design of thermostabilizing point mutations for G protein-coupled receptors, *Elife*, **7**, e34729, <https://doi.org/10.7554/eLife.34729>.
34. Munk, C., Mutt, E., Isberg, V., Nikolajsen, L. F., Bibbe, J. M., Flock, T., Hanson, M. A., Stevens, R. C., Deupi, X., and Gloriam, D. E. (2019) An online resource for GPCR structure determination and analysis, *Nat. Methods*, **16**, 151-162, <https://doi.org/10.1038/s41592-018-0302-x>.
35. Peng, Y., McCorvey, J. D., Harpsøe, K., Lansu, K., Yuan, S., Popov, P., Qu, L., Pu, M., Che, T., Nikolajsen, L. F., et al. (2018) 5-HT_{2C} receptor structures reveal the structural basis of GPCR polypharmacology, *Cell*, **172**, 719-730.e14, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.01.001>.
36. 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, *Sci. Adv.*, **5**, eaax2518, <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax2518>.

37. 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, *Nat. Commun.*, **10**, 5573, <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13348-2>.
38. Li, X., Hua, T., Vemuri, K., Ho, J.-H., Wu, Y., Wu, L., Popov, P., Benchama, O., Zvonok, N., Locke, K., Qu, L., Han, G. W., Iyer, M. R., Cinar, R., Coffey, N. J., Wang, J., Wu, M., Katritch, V., Zhao, S., Kunos, G., Bohn, L. M., Makriyannis, A., Stevens, R. C., and Liu, Z.-J.. (2019) Crystal structure of the human cannabinoid receptor CB₂, *Cell*, **176**, 459-467.e13, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.12.011>.
39. Dmitrieva, D. A., Kotova, T. V., Safronova, N. A., Sadova, A. A., Dashevskii, D. E., and Mishin, A. V. (2023) Protein design strategies for the structural-functional studies of G protein-coupled receptors, *Biochemistry*, **88**, S192-S226, <https://doi.org/10.1134/S0006297923140110>.
40. Lavington, S., and Watts, A. (2020) Lipid nanoparticle technologies for the study of G protein-coupled receptors in lipid environments, *Biophys. Rev.*, **12**, 1287-1302, <https://doi.org/10.1007/s12551-020-00775-5>.
41. Alexandrov, A. I., Mileni, M., Chien, E. Y. T., Hanson, M. A., and Stevens, R. C. (2008) Microscale fluorescent thermal stability assay for membrane proteins, *Structure*, **16**, 351-359, <https://doi.org/10.1016/j.str.2008.02.004>.
42. Landau, E. M., and Rosenbusch, J. P. (1996) Lipidic cubic phases: a novel concept for the crystallization of membrane proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 14532-14535, <https://doi.org/10.1073/pnas.93.25.14532>.
43. Caffrey, M. (2009) Crystallizing membrane proteins for structure determination: use of lipidic mesophases, *Annu. Rev. Biophys.*, **38**, 29-51, <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.050708.133655>.
44. Kors, C. A., Wallace, E., Davies, D. R., Li, L., Laible, P. D., and Nollert, P. (2009) Effects of impurities on membrane-protein crystallization in different systems, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **65**, 1062-1073, <https://doi.org/10.1107/S0907444909029163>.
45. Bogorodskiy, A., Frolov, F., Mishin, A., Round, E., Polovinkin, V., Cherezov, V., Gordeliy, V., Büldt, G., Gensch, T., and Borshchevskiy, V. (2015) Nucleation and growth of membrane protein crystals *in meso* – a fluorescence microscopy study, *Crystal Growth Des.*, **15**, 5656-5660, <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.5b01061>.
46. Caffrey, M., and Cherezov, V. (2009) Crystallizing membrane proteins using lipidic mesophases, *Nat. Protoc.*, **4**, 706-731, <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.31>.
47. Xu, F., Liu, W., Hanson, M. A., Stevens, R. C., and Cherezov, V. (2011) Development of an automated high throughput LCP-FRAP assay to guide membrane protein crystallization in lipid mesophases, *Crystal Growth Des.*, **11**, 1193-1201, <https://doi.org/10.1021/cg101385e>.
48. Li, D., Boland, C., Walsh, K., and Caffrey, M. (2012) Use of a robot for high-throughput crystallization of membrane proteins in lipidic mesophases, *J. Vis. Exp.*, **67**, e4000, <https://doi.org/10.3791/4000>.
49. Ishchenko, A., Cherezov, V., and Liu, W. (2016) Preparation and delivery of protein microcrystals in lipidic cubic phase for serial femtosecond crystallography, *J. Vis. Exp.*, **115**, e54463, <https://doi.org/10.3791/54463>.
50. Hendrickson, W. A. (2014) Anomalous diffraction in crystallographic phase evaluation, *Q. Rev. Biophys.*, **47**, 49-93, <https://doi.org/10.1017/S0033583514000018>.
51. Willmott, P. (2019) *An Introduction to Synchrotron Radiation: Techniques and Applications*, John Wiley & Sons, <https://doi.org/10.1002/9781119280453>.
52. Pellegrini, C. (2012) The history of X-ray free-electron lasers, *Eur. Phys. J.*, **37**, 659-708, <https://doi.org/10.1140/epjh/e2012-20064-5>.
53. Kurilko, V. I., and Tkach, Y. V. (1995) Physical mechanisms of generation of coherent radiation in an ultrarelativistic free-electron laser, *Usp. Fiz. Nauk*, **165**, 241-261.
54. Ponchut, C. (2006) Characterization of X-ray area detectors for synchrotron beamlines, *J. Synchrotron Radiat.*, **13**, 195-203, <https://doi.org/10.1107/S0909049505034278>.
55. Walter, R. L., Thiel, D. J., Barna, S. L., Tate, M. W., Wall, M. E., Eikenberry, E. F., Gruner, S. M., and Ealick, S. E. (1995) High-resolution macromolecular structure determination using CCD detectors and synchrotron radiation, *Structure*, **3**, 835-844, [https://doi.org/10.1016/s0969-2126\(01\)00218-0](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(01)00218-0).
56. Heijne, E. H. M., Jarron, P., Olsen, A., and Redaelli, N. (1988) The silicon micropattern detector: a dream?, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. A*, **273**, 615-619, [https://doi.org/10.1016/0168-9002\(88\)90065-4](https://doi.org/10.1016/0168-9002(88)90065-4).
57. Delpierre, P. (1994) Pixels detectors and silicon X-rays detectors, *J. Phys.*, **04**, C9-11-C9-18, <https://doi.org/10.1051/jp4:1994902>.
58. Brönnimann, C., and Trüb, P. (2016) in *Accelerator Physics, Instrumentation and Science Applications* (Jaeschke, E., Khan, S., Schneider, J., Hastings, J., eds) Springer, Cham, pp. 995-1027, https://doi.org/10.1007/978-3-319-14394-1_36.
59. Caffrey, M. (2015) A comprehensive review of the lipid cubic phase or *in meso* method for crystallizing membrane and soluble proteins and complexes, *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.*, **71**, 3-18, <https://doi.org/10.1107/S2053230X14026843>.
60. Smith, J. L., Fischetti, R. F., and Yamamoto, M. (2012) Micro-crystallography comes of age, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **22**, 602-612, <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2012.09.001>.

61. Helliwell, J. R., and Mitchell, E. P. (2015) Synchrotron radiation macromolecular crystallography: science and spin-offs, *IUCrJ*, **2**, 283-291, <https://doi.org/10.1107/S205225251402795X>.
62. Sanishvili, R., Yoder, D. W., Pothineni, S. B., Rosenbaum, G., Xu, S., Vogt, S., Stepanov, S., Makarov, O. A., Corcoran, S., Benn, R., et al. (2011) Radiation damage in protein crystals is reduced with a micron-sized X-ray beam, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 6127-6132, <https://doi.org/10.1073/pnas.1017701108>.
63. Kmetko, J., Husseini, N. S., Naides, M., Kalinin, Y., and Thorne, R. E. (2006) Quantifying X-ray radiation damage in protein crystals at cryogenic temperatures, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **62**, 1030-1038, <https://doi.org/10.1107/S0907444906023869>.
64. Garman, E. F. (2010) Radiation damage in macromolecular crystallography: what is it and why should we care?, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **66**, 339-351, <https://doi.org/10.1107/S0907444910008656>.
65. Baba, S., Matsuura, H., Kawamura, T., Sakai, N., Nakamura, Y., Kawano, Y., Mizuno, N., Kumasaka, T., Yamamoto, M., and Hirata, K. (2021) Guidelines for de novo phasing using multiple small-wedge data collection, *J. Synchrotron Radiat.*, **28**, 1284-1295, <https://doi.org/10.1107/S1600577522001655>.
66. Hilgart, M. C., Sanishvili, R., Ogata, C. M., Becker, M., Venugopalan, N., Stepanov, S., Makarov, O., Smith, J. L., and Fischetti, R. F. (2011) Automated sample-scanning methods for radiation damage mitigation and diffraction-based centering of macromolecular crystals, *J. Synchrotron Radiat.*, **18**, 717-722, <https://doi.org/10.1107/S0909049511029918>.
67. Barty, A., Kirian, R. A., Maia, F. R. N. C., Hantke, M., Yoon, C. H., White, T. A., and Chapman, H. (2014) Cheetah: software for high-throughput reduction and analysis of serial femtosecond X-ray diffraction data, *J. Appl. Crystallogr.*, **47**, 1118-1131, <https://doi.org/10.1107/S1600576714007626>.
68. Svensson, O., Malbet-Monaco, S., Popov, A., Nurizzo, D., and Bowler, M. W. (2015) Fully automatic characterization and data collection from crystals of biological macromolecules, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **71**, 1757-1767, <https://doi.org/10.1107/S1399004715011918>.
69. Marin, E., Luginina, A., Gusach, A., Kovalev, K., Bukhdruker, S., Khorn, P., Polovinkin, V., Lyapina, E., Rogachev, A., Gordeliy, V., et al. (2020) Small-wedge synchrotron and serial XFEL datasets for Cysteinyl leukotriene GPCRs, *Sci. Data*, **7**, 388, <https://doi.org/10.1038/s41597-020-00729-2>.
70. Segala, E., Guo, D., Cheng, R. K. Y., Bortolato, A., Deflorian, F., Doré, A. S., Errey, J. C., Heitman, L. H., IJzerman, A. P., Marshall, F. H., et al. (2016) Controlling the dissociation of ligands from the adenosine A2A receptor through modulation of salt bridge strength, *J. Med. Chem.*, **59**, 6470-6479, <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00653>.
71. 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 β_2 adrenergic receptor-Gs protein complex, *Nature*, **477**, 549-555, <https://doi.org/10.1038/nature10361>.
72. Zhou, Q., Yang, D., Wu, M., Guo, Y., Guo, W., Zhong, L., Cai, X., Dai, A., Jang, W., Shakhnovich, E. I., et al. (2019) Common activation mechanism of class A GPCRs, *Elife*, **8**, e50279, <https://doi.org/10.7554/eLife.50279>.
73. Rucktooa, P., Cheng, R. K. Y., Segala, E., Geng, T., Errey, J. C., Brown, G. A., Cooke, R. M., Marshall, F. H., and Doré, A. S. (2018) Towards high throughput GPCR crystallography: *in meso* soaking of adenosine A2A receptor crystals, *Sci. Rep.*, **8**, 41, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18570-w>.
74. Yamamoto, M., Hirata, K., Yamashita, K., Hasegawa, K., Ueno, G., Ago, H., and Kumasaka, T. (2017) Protein micro-crystallography using synchrotron radiation, *IUCrJ*, **4**, 529-539, <https://doi.org/10.1107/S2052252517008193>.
75. Neutze, R., Wouts, R., van der Spoel, D., Weckert, E., and Hajdu, J. (2000) Potential for biomolecular imaging with femtosecond X-ray pulses, *Nature*, **406**, 752-757, <https://doi.org/10.1038/35021099>.
76. Chapman, H. N., Fromme, P., Barty, A., White, T. A., Kirian, R. A., Aquila, A., Hunter, M. S., Schulz, J., DePonte, D. P., Weierstall, U., et al. (2011) Femtosecond X-ray protein nanocrystallography, *Nature*, **470**, 73-77, <https://doi.org/10.1038/nature09750>.
77. Gati, C., Bourenkov, G., Klinge, M., Rehders, D., Stellato, F., Oberthür, D., Yefanov, O., Sommer, B. P., Mogk, S., Duszynko, M., Betzel, C., Schneider, T. R., Chapman, H. N., and Redekker, L. (2014) Serial crystallography on *in vivo* grown microcrystals using synchrotron radiation, *IUCrJ*, **1**, 87-94, <https://doi.org/10.1107/S2052252513033939>.
78. Roedig, P., Duman, R., Sanchez-Weatherby, J., Vartiainen, I., Burkhardt, A., Warmer, M., David, C., Wagner, A., and Meents, A. (2016) Room-temperature macromolecular crystallography using a micro-patterned silicon chip with minimal background scattering, *J. Appl. Crystallogr.*, **49**, 968-975, <https://doi.org/10.1107/S1600576716006348>.
79. Huang, C. Y., Olieric, V., Ma, P., Panepucci, E., Diederichs, K., Wang, M., and Caffrey, M. (2015) *In meso* in situ serial X-ray crystallography of soluble and membrane proteins, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **71**, 1238-1256, <https://doi.org/10.1107/S1399004715005210>.
80. Baxter, E. L., Aguila, L., Alonso-Mori, R., Barnes, C. O., Bonagura, C. A., Brehmer, W., Brunger, A. T., Calero, G., Caradoc-Davies, T. T., Chatterjee, R., et al. (2016) High-density grids for efficient data collection from multiple crystals, *Acta Crystallogr. D. Struct. Biol.*, **72**, 2-11, <https://doi.org/10.1107/S2059798315020847>.

81. Weierstall, U., James, D., Wang, C., White, T. A., Wang, D., Liu, W., Spence, J. C. H., Doak, R. B., Nelson, G., Fromme, R., Grotjohann, I., Kupitz, C., Zatsepin, N. A., Liu, H., Basu, S., Wacker, D., et al. (2014) Lipidic cubic phase injector facilitates membrane protein serial femtosecond crystallography, *Nat. Commun.*, **5**, 3309, <https://doi.org/10.1038/ncomms4309>.
82. Fuller, F. D., Gul, S., Chatterjee, R., Burgie, E. S., Young, I. D., Lebrette, H., Srinivas, V., Brewster, A. S., Michels-Clark, T., Clinger, J. A., et al. (2017) Drop-on-demand sample delivery for studying biocatalysts in action at X-ray free-electron lasers, *Nat. Methods*, **14**, 443-449, <https://doi.org/10.1038/nmeth.4195>.
83. Miller, R. J. D. (2014) Femtosecond crystallography with ultrabright electrons and x-rays: capturing chemistry in action, *Science*, **343**, 1108-1116, <https://doi.org/10.1126/science.1248488>.
84. Coquelle, N., Brewster, A. S., Kapp, U., Shilova, A., Weinhausen, B., Burghammer, M., and Colletier, J. P. (2015) Raster-scanning serial protein crystallography using micro- and nano-focused synchrotron beams, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **71**, 1184-1196, <https://doi.org/10.1107/S1399004715004514>.
85. Ke, T. W., Brewster, A. S., Yu, S. X., Ushizima, D., Yang, C., and Sauter, N. K. (2018) A convolutional neural network-based screening tool for X-ray serial crystallography, *J. Synchrotron Radiat.*, **25**, 655-670, <https://doi.org/10.1107/S1600577518004873>.
86. Zaefferer, S. (2000) New developments of computer-aided crystallographic analysis in transmission electron microscopy, *J. Appl. Crystallogr.*, **33**, 10-25, <https://doi.org/10.1107/S0021889899010894>.
87. Winter, G., Waterman, D. G., Parkhurst, J. M., Brewster, A. S., Gildea, R. J., Gerstel, M., Fuentes-Montero, L., Vollmar, M., Michels-Clark, T., Young, I. D., et al. (2018) DIALS: implementation and evaluation of a new integration package, *Acta Crystallogr. D Struct. Biol.*, **74**, 85-97, <https://doi.org/10.1107/S2059798317017235>.
88. Kabsch, W. (2014) Processing of X-ray snapshots from crystals in random orientations, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **70**, 2204-2216, <https://doi.org/10.1107/S1399004714013534>.
89. Sauter, N. K., Hattne, J., Grosse-Kunstleve, R. W., and Echols, N. (2013) New Python-based methods for data processing, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **69**, 1274-1282, <https://doi.org/10.1107/S0907444913000863>.
90. White, T. A., Kirian, R. A., Martin, A. V., Aquila, A., Nass, K., Barty, A., and Chapman, H. N. (2012) CrystFEL: a software suite for snapshot serial crystallography, *J. Appl. Crystallogr.*, **45**, 335-341, <https://doi.org/10.1107/S0021889812002312>.
91. Ginn, H. M., Evans, G., Sauter, N. K., and Stuart, D. I. (2016) On the release of cpxfel for processing X-ray free-electron laser images, *J. Appl. Crystallogr.*, **49**, 1065-1072, <https://doi.org/10.1107/S1600576716006981>.
92. Liu, W., Wacker, D., Gati, C., Han, G. W., James, D., Wang, D., Nelson, G., Weierstall, U., Katritch, V., Barty, A., et al. (2013) Serial femtosecond crystallography of G protein-coupled receptors, *Science*, **342**, 1521-1524, <https://doi.org/10.1126/science.1244142>.
93. 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 femtosecond X-ray laser, *Nature*, **523**, 561-567, <https://doi.org/10.1038/nature14656>.
94. Cheng, Y., Grigorieff, N., Penczek, P. A., and Walz, T. (2015) A primer to single-particle cryo-electron microscopy, *Cell*, **161**, 438-449, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.03.050>.
95. Kühlbrandt, W. (2014) Biochemistry. The resolution revolution, *Science*, **343**, 1443-1444, <https://doi.org/10.1126/science.1251652>.
96. Nakane, T., Kotecha, A., Sente, A., McMullan, G., Masiulis, S., Brown, P. M. G. E., Grigoras, I. T., Malinauskaitė, L., Malinauskas, T., Miehl, J., et al. (2020) Single-particle cryo-EM at atomic resolution, *Nature*, **587**, 152-156, <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2829-0>.
97. Russo, C. J., and Passmore, L. A. (2014) Electron microscopy: Ultrastable gold substrates for electron cryomicroscopy, *Science*, **346**, 1377-1380, <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2015.11.006>.
98. Punjani, A., Rubinstein, J. L., Fleet, D. J., and Brubaker, M. A. (2017) CryoSPARC: algorithms for rapid unsupervised cryo-EM structure determination, *Nat. Methods*, **14**, 290-296, <https://doi.org/10.1038/nmeth.4169>.
99. Jeong, E., Kim, Y., Jeong, J., and Cho, Y. (2021) Structure of the class C orphan GPCR GPR158 in complex with RGS7-Gβ5, *Nat. Commun.*, **12**, 6805, <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27147-1>.
100. Kato, T., Makino, F., Nakane, T., Terahara, N., Kaneko, T., Shimizu, Y., Motoki, S., Ishikawa, I., Yonekura, K., and Namba, K. (2019) CryoTEM with a cold field emission gun that moves structural biology into a new stage, *Microsc. Microanal.*, **25**, 998-999, <https://doi.org/10.1017/S1431927619005725>.
101. Peet, M. J., Henderson, R., and Russo, C. J. (2019) The energy dependence of contrast and damage in electron cryomicroscopy of biological molecules, *Ultramicroscopy*, **203**, 125-131, <https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2019.02.007>.
102. Naydenova, K., McMullan, G., Peet, M. J., Lee, Y., Edwards, P. C., Chen, S., Leahy, E., Scotcher, S., Henderson, R., and Russo, C. J. (2019) CryoEM at 100 keV: a demonstration and prospects, *IUCr*, **6**, 1086-1098, <https://doi.org/10.1107/S2052252519012612>.

103. Krivanek, O. L., Corbin, G. J., Dellby, N., Elston, B. F., Keyse, R. J., Murfitt, M. F., Own, C. S., Szilagy, Z. S., and Woodruff, J. W. (2008) An electron microscope for the aberration-corrected era, *Ultramicroscopy*, **108**, 179-195, <https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2007.07.010>.
104. Yip, K. M., Fischer, N., Paknia, E., Chari, A., and Stark, H. (2020) Atomic-resolution protein structure determination by cryo-EM, *Nature*, **587**, 157-161, <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2833-4>.
105. Rose, H. (2004) Outline of an ultracorrector compensating for all primary chromatic and geometrical aberrations of charged-particle lenses, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. A*, **519**, 12-27, <https://doi.org/10.1017/S1431927603011164>.
106. Guo, H., Franken, E., Deng, Y., Benlekbi, S., Singla Lezcano, G., Janssen, B., Yu, L., Ripstein, Z. A., Tan, Y. Z., and Rubinstein, J. L. (2020) Electron-event representation data enable efficient cryoEM file storage with full preservation of spatial and temporal resolution, *IUCrJ*, **7**, 860-869, <https://doi.org/10.1107/S205225252000929X>.
107. Pándy-Szekeres, G., Munk, C., Tsonkov, T. M., Mordalski, S., Harpsøe, K., Hauser, A. S., Bojarski, A. J., and Gloriam, D. E. (2018) GPCRdb in 2018: adding GPCR structure models and ligands, *Nucleic Acids Res.*, **46**, D440-D446, <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1109>.
108. Zhuang, Y., Xu, P., Mao, C., Wang, L., Krumm, B., Zhou, X. E., Huang, S., Liu, H., Cheng, X., Huang, X.-P., et al. (2021) Structural insights into the human D1 and D2 dopamine receptor signaling complexes, *Cell*, **184**, 931-942.e18, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.027>.
109. Liang, Y.-L., Khoshouei, M., Glukhova, A., Furness, S. G. B., Zhao, P., Clydesdale, L., Koole, C., Truong, T. T., Thal, D. M., Lei, S., et al. (2018) Phase-plate cryo-EM structure of a biased agonist-bound human GLP-1 receptor-Gs complex, *Nature*, **555**, 121-125, <https://doi.org/10.1038/nature25773>.
110. Liang, Y.-L., Belousoff, M. J., Zhao, P., Koole, C., Fletcher, M. M., Truong, T. T., Julita, V., Christopoulos, G., Xu, H. E., Zhang, Y., et al. (2020) Toward a structural understanding of class B GPCR peptide binding and activation, *Mol. Cell*, **77**, 656-668.e5, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.01.012>.
111. Huang, S., Xu, P., Shen, D.-D., Simon, I. A., Mao, C., Tan, Y., Zhang, H., Harpsøe, K., Li, H., Zhang, Y., et al. (2022) GPCRs steer Gi and Gs selectivity via TM5-TM6 switches as revealed by structures of serotonin receptors, *Mol. Cell*, **82**, 2681-2695.e6, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2022.05.031>.
112. Yang, F., Mao, C., Guo, L., Lin, J., Ming, Q., Xiao, P., Wu, X., Shen, Q., Guo, S., Shen, D.-D., et al. (2020) Structural basis of GPBAR activation and bile acid recognition, *Nature*, **587**, 499-504, <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2569-1>.
113. Koning, R. I., Vader, H., van Nugteren, M., Grocutt, P. A., Yang, W., Renault, L. L. R., Koster, A. J., Kamp, A. C. F., and Schwertner, M. (2022) Automated vitrification of cryo-EM samples with controllable sample thickness using suction and real-time optical inspection, *Nat. Commun.*, **13**, 2985, <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30562-7>.
114. Zhang, X., Johnson, R. M., Drulyte, I., Yu, L., Kotecha, A., Danev, R., Wootten, D., Sexton, P. M., and Belousoff, M. J. (2021) Evolving cryo-EM structural approaches for GPCR drug discovery, *Structure*, **29**, 963-974.e6, <https://doi.org/10.1016/j.str.2021.04.008>.
115. Cheng, A., Tan, Y. Z., Dandey, V. P., Potter, C. S., and Carragher, B. (2016) Strategies for automated CryoEM data collection using direct detectors, *Methods Enzymol.*, **579**, 87-102, <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2016.04.008>.
116. Wang, H.-W., and Wang, J.-W. (2017) How cryo-electron microscopy and X-ray crystallography complement each other, *Protein Sci.*, **26**, 32-39, <https://doi.org/10.1002/pro.3022>.
117. Barros-Álvarez, X., Nwokonko, R. M., Vizurraga, A., Matzov, D., He, F., Papasergi-Scott, M. M., Robertson, M. J., Panovala, O., Yardeni, E. H., Seven, A. B., et al. (2022) The tethered peptide activation mechanism of adhesion GPCRs, *Nature*, **604**, 757-762, <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04575-7>.
118. Ye, F., Wong, T.-S., Chen, G., Zhang, Z., Zhang, B., Gan, S., Gao, W., Li, J., Wu, Z., Pan, X., et al. (2022) Cryo-EM structure of G-protein-coupled receptor GPR17 in complex with inhibitory G protein, *MedComm*, **3**, e159, <https://doi.org/10.1002/mco2.159>.
119. Weissenberger, G., Henderikx, R. J. M., and Peters, P. J. (2021) Understanding the invisible hands of sample preparation for cryo-EM, *Nat. Methods*, **18**, 463-471, <https://doi.org/10.1038/s41592-021-01130-6>.
120. Sgro, G. G., and Costa, T. R. D. (2018) Cryo-EM grid preparation of membrane protein samples for single particle analysis, *Front Mol Biosci.*, **5**, 74, <https://doi.org/10.3389/fmolb.2018.00074>.
121. Li, S. (2022) Detergents and alternatives in cryo-EM studies of membrane proteins, *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, **54**, 1049-1056, <https://doi.org/10.3724/abbs.2022088>.
122. Kampjut, D., Steiner, J., and Sazanov, L. A. (2021) Cryo-EM grid optimization for membrane proteins, *iScience*, **24**, 102139, <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102139>.
123. Zhang, M., Gui, M., Wang, Z.-F., Gorgulla, C., Yu, J. J., Wu, H., Sun, Z.-Y. J., Klenk, C., Merklinger, L., Morstein, L., et al. (2021) Cryo-EM structure of an activated GPCR-G protein complex in lipid nanodiscs, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **28**, 258-267, <https://doi.org/10.1038/s41594-020-00554-6>.
124. Yin, J., Chen, K.-Y. M., Clark, M. J., Hijazi, M., Kumari, P., Bai, X.-C., Sunahara, R. K., Barth, P., and Rosenbaum, D. M. (2020) Structure of a D2 dopamine receptor G-protein complex in a lipid membrane, *Nature*, **584**, 125-129, <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2379-5>.

125. Lee, Y., Warne, T., Nehmé, R., Pandey, S., Dwivedi-Agnihotri, H., Chaturvedi, M., Edwards, P. C., García-Nafria, J., Leslie, A. G. W., Shukla, A. K., et al. (2020) Molecular basis of β -arrestin coupling to formoterol-bound β 1-adrenoceptor, *Nature*, **583**, 862-866, <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2419-1>.
126. Staus, D. P., Hu, H., Robertson, M. J., Kleinhenz, A. L. W., Wingler, L. M., Capel, W. D., Latorraca, N. R., Lefkowitz, R. J., and Skiniotis, G. (2020) Structure of the M2 muscarinic receptor- β -arrestin complex in a lipid nanodisc, *Nature*, **579**, 297-302, <https://doi.org/10.1038/s41586-020-1954-0>.
127. Ripstein, Z. A., and Rubinstein, J. L. (2016) Processing of cryo-EM movie data, *Methods Enzymol.*, **579**, 103-124, <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2016.04.009>.
128. Scheres, S. H. W. (2016) Processing of structurally heterogeneous cryo-EM data in RELION, *Methods Enzymol.*, **579**, 125-157, <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2016.04.012>.
129. Penczek, P. A. (2010) Image restoration in cryo-electron microscopy, *Methods Enzymol.*, **482**, 35-72, [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(10\)82002-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(10)82002-6).
130. Rosenthal, P. B., and Henderson, R. (2003) Optimal determination of particle orientation, absolute hand, and contrast loss in single-particle electron cryomicroscopy, *J. Mol. Biol.*, **333**, 721-745, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2003.07.013>.
131. Gusach, A., García-Nafria, J., and Tate, C. G. (2023) New insights into GPCR coupling and dimerisation from cryo-EM structures, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **80**, 102574, <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2023.102574>.
132. 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 Res.*, **29**, 971-983, <https://doi.org/10.1038/s41422-019-0256-2>.
133. 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, <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03721-x>.
134. Duan, J., Liu, H., Ji, Y., Yuan, Q., Li, X., Wu, K., Gao, T., Zhu, S., Yin, W., Jiang, Y., et al. (2022) Structure of a G protein-coupled receptor with GRK2 and a biased ligand, *bioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2022.10.19.512855>.
135. Thomsen, A. R. B., Plouffe, B., Cahill, T. J., 3rd, Shukla, A. K., Tarrasch, J. T., Dosey, A. M., Kahsai, A. W., Strachan, R. T., Pani, B., Mahoney, J. P., Huang, L., Breton, B., Heydenreich, F. M., Sunahara, R. K., Skiniotis, G., Bouvier, M., and Lefkowitz, R. J. (2016) GPCR-G protein- β -arrestin super-complex mediates sustained G protein signaling, *Cell*, **166**, 907-919, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.004>.
136. Zhang, K., Wu, H., Hoppe, N., Manglik, A., and Cheng, Y. (2022) Fusion protein strategies for cryo-EM study of G protein-coupled receptors, *Nat. Commun.*, **13**, 4366, <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32125-2>.
137. Robertson, M. J., Papasergi-Scott, M. M., He, F., Seven, A. B., Meyerowitz, J. G., Panova, O., Peroto, M. C., Che, T., and Skiniotis, G. (2022) Structure determination of inactive-state GPCRs with a universal nanobody, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **29**, 1188-1195, <https://doi.org/10.1038/s41594-022-00859-8>.
138. 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) Phase-plate cryo-EM structure of a class B GPCR-G-protein complex, *Nature*, **546**, 118-123, <https://doi.org/10.1038/nature22327>.
139. Zhang, Y., Sun, B., Feng, D., Hu, H., Chu, M., Qu, Q., Tarrasch, J. T., Li, S., Sun Kobilka, T., Kobilka, B. K., et al. (2017) Cryo-EM structure of the activated GLP-1 receptor in complex with a G protein, *Nature*, **546**, 248-253, <https://doi.org/10.1038/nature22394>.
140. Fan, X., Wang, J., Zhang, X., Yang, Z., Zhang, J.-C., Zhao, L., Peng, H.-L., Lei, J., and Wang, H.-W. (2019) Single particle cryo-EM reconstruction of 52 kDa streptavidin at 3.2 Angstrom resolution, *Nat. Commun.*, **10**, 2386, <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10368-w>.
141. Duan, J., Xu, P., Luan, X., Ji, Y., He, X., Song, N., Yuan, Q., Jin, Y., Cheng, X., Jiang, H., et al. (2022) Hormone- and antibody-mediated activation of the thyrotropin receptor, *Nature*, **609**, 854-859, <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05173-3>.
142. Josephs, T. M., Belousoff, M. J., Liang, Y.-L., Piper, S. J., Cao, J., Garama, D. J., Leach, K., Gregory, K. J., Christopoulos, A., Hay, D. L., et al. (2021) Structure and dynamics of the CGRP receptor in apo and peptide-bound forms, *Science*, <https://doi.org/10.1126/science.abf7258>.
143. Shaik, M. M., Peng, H., Lu, J., Rits-Volloch, S., Xu, C., Liao, M., and Chen, B. (2019) Structural basis of coreceptor recognition by HIV-1 envelope spike, *Nature*, **565**, 318-323, <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0804-9>.
144. Yue, Y., Liu, L., Wu, L.-J., Wu, Y., Wang, L., Li, F., Liu, J., Han, G.-W., Chen, B., Lin, X., et al. (2022) Structural insight into apelin receptor G protein stoichiometry, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **29**, 688-697, <https://doi.org/10.1038/s41594-022-00797-5>.
145. Velazhahan, V., Ma, N., Pándy-Szekeres, G., Kooistra, A. J., Lee, Y., Gloriam, D. E., Vaidehi, N., and Tate, C. G. (2020) Structure of the class D GPCR Ste2 dimer coupled to two G proteins, *Nature*, **589**, 148-153, <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2994-1>.

146. Mobbs, J. I., Belousoff, M. J., Harikumar, K. G., Piper, S. J., Xu, X., Furness, S. G. B., Venugopal, H., Christopoulos, A., Danev, R., Wootten, D., et al. (2021) Structures of the human cholecystokinin 1 (CCK1) receptor bound to Gs and Gq mimetic proteins provide insight into mechanisms of G protein selectivity, *PLoS Biol.*, **19**, e3001295, <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001295>.
147. Van Drie, J. H., and Tong, L. (2020) Cryo-EM as a powerful tool for drug discovery, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **30**, 127524, <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127524>.

RATIONAL DRUG DESIGN TARGETING G-PROTEIN-COUPLED RECEPTORS: A STRUCTURAL BIOLOGY PERSPECTIVE

Review

**P. A. Khorn¹, A. P. Luginina¹, V. A. Pospelov¹, D. E. Dashevskii¹,
A. N. Khnykin¹, O. V. Moiseeva^{1,2}, N. A. Safronova¹, A. S. Belousov¹,
A. V. Mishin^{1*}, and V. I. Borshchevskiy^{1,3*}**

¹ *Moscow Institute of Physics and Technology (NIU), 141701 Dolgoprudny, Moscow Region, Russia;
e-mail: borshchevskiy.vi@phystech.edu, mishinalexey@phystech.edu*

² *G. K. Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Science,
142290 Pushchino, Moscow Region, Russia*

³ *Frank Laboratory of Neutron Physics, Joint Institute for Nuclear Research,
141980 Dubna, Moscow Region, Russia*

G protein-coupled Receptors (G protein-coupled Receptors, GPCRs) play a key role in the transmission of extracellular signals and regulation of many biological processes, which makes these membrane proteins one of the most important classes of targets for pharmacological agents. The significant increase in the number of atomic structures of GPCRs recently has paved the way for Structure Based Drug Design (SBDD). SBDD uses information on the structure of the receptor-ligand complex to search for affinity and selective ligands without the need for high-throughput experimental ligand screening and allows a significant expansion of the chemical ligand search space. In our review we describe the process of GPCR structure obtaining by X-ray diffraction analysis and cryo-electron microscopy (cryo-EM) – an important step in rational drug design targeting GPCRs. Our main goal is to highlight to a wide range of specialists the current aspects and key features of experimental structural biology methods necessary for a detailed understanding of SBDD GPCRs.

Keywords: drug development, GPCR, MX, cryo-EM, SBDD