

## **Receptory sprzężone z białkami G**

## Spis treści:

1.	Receptory GPCR.....	3
1.1.	Przekazanie sygnału i aktywacja białka G.....	6
1.2.	Mechanizmy aktywacji receptorów GPCR.....	8
1.3.	Receptory Opioidowe.....	10
1.3.1.	Ligandy receptorów opioidowych .....	15
1.4.	Znane struktury krystalograficzne receptorów GPCR .....	17
1.4.1.	Rodopsyna .....	18
1.4.2.	Opsyna w stanie aktywnym .....	21
1.4.3.	Receptor $\beta_1$ oraz $\beta_2$ adrenergiczny .....	24
1.4.4.	Receptor $A_{2A}$ adenozynowy .....	28
	Literatura .....	30

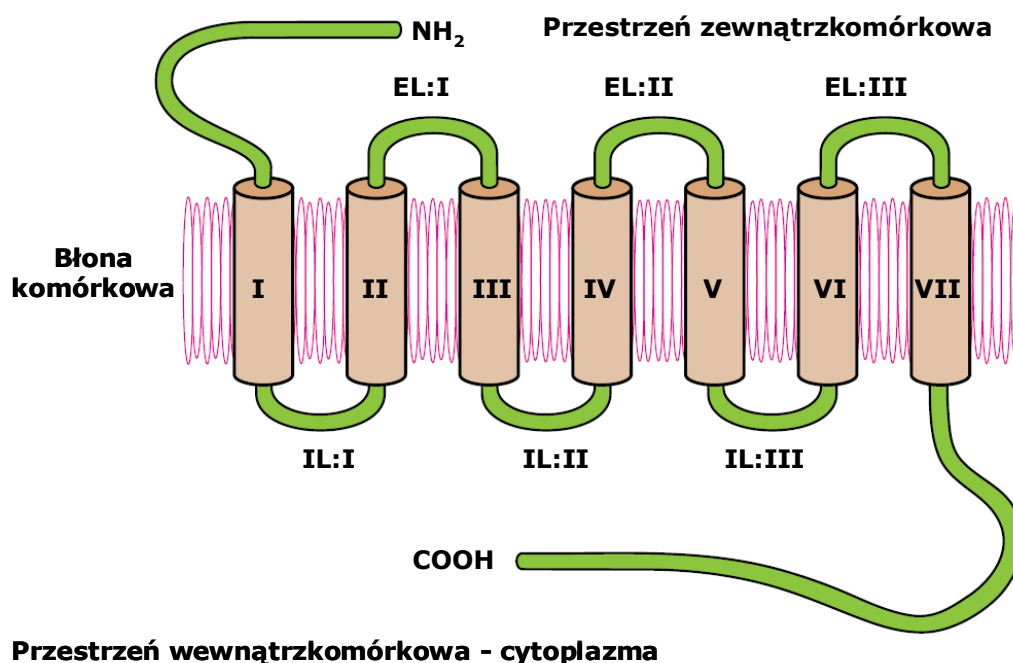
## 1. Receptory GPCR

Receptory sprzężone z białkami G (GPCR's – *ang. G protein coupled receptors*) stanowią najliczniejszą i bardzo zróżnicowaną grupę białek błonowych odpowiedzialnych za przekazywanie sygnałów przez dwuwarstwą lipidową do miejsc efektorowych znajdujących się we wnętrzu komórki [1]. Sekwencjonowanie ludzkiego genomu ujawniło występowanie ok. 800 różnych typów receptorów należących do rodziny GPCR (geny kodujące receptory GPCR stanowią powyżej 3% ludzkiego genomu), a ponad połowa z nich wykazuje potencjalne znaczenie dla przemysłu farmaceutycznego [2, 3].

Analiza porównawcza sekwencji receptorów GPCR oraz badania funkcji poszczególnych typów receptorów doprowadziły do podziału tej rodziny białek na klasy, które oznaczono literami od A do F [4, 5]. Pierwsza, najliczniejsza klasa A (nazywana również klasą podobnych do rodopsyny – *ang. rhodopsin like*), obejmująca ponad 80% wszystkich GPCR, to klasa receptorów rodopsyno-podobnych. Receptory wchodzące w skład tej grupy są jednymi z najlepiej zbadanych. Zaliczamy do nich, obok rodopsyny, między innymi: receptory adrenergiczne, opioidowe, adenozynowe, kanabinoidowe, receptory chemokin, dopaminowe i histaminowe. Klasę B stanowią receptory sekretynopodobne. Do klasy C zaliczamy receptory glutaminergiczne i feromonowe. Kolejne klasy D i E tworzą odpowiednio receptory feromonów grzybów oraz receptory cAMP. Ostatnia klasa F to receptory frizzled/smoothened. Klasyfikacja ta pokrywa się w większości z nową klasyfikacją GRAFS [6], opartą na badaniach filogenetycznych. Nazwa GRAFS pochodzi od pierwszych liter wyodrębnionych rodzin receptorów, do których należą odpowiednio: receptory Glutaminergiczne, Rodopsyno-podobne, Adhezyjne, Frizzled i smakowe oraz Sekretynopodobne.

Receptory sprzężone z białkami G uczestniczą w kaskadach sygnalizacyjnych pośrednicząc w przekazywaniu informacji przez liczne zewnątrzkomórkowe cząsteczki sygnałowe: hormony, przekaźniki neuronalne, małe białka, krótkie łańcuchy peptydowe, aminy, lipidy, nukleotydy czy pochodne aminokwasów i kwasów tłuszczowych [3, 7]. Dla każdej z wymienionych substancji istnieje receptor, bądź też grupa receptorów mogąca wiązać daną cząsteczkę, inicjującą jednocześnie przekazanie sygnału przez błonę komórkową. Receptory GPCR odgrywają kluczową rolę w wielu procesach fizjologicznych regulujących pracę komórki, jej metabolizm, wzrost i obronę immunologiczną. Receptory sprzężone z białkami G pełnią ponadto bardzo różnorodne funkcje w organizmie człowieka. Zaliczamy do nich między innymi: rodopsynę [8, 9],

białko fotoreceptorowe aktywowane przez światło, uczestniczące w procesie widzenia, receptory adrenergiczne [10-12] wywierające wpływ na ciśnienie tętnicze, receptory opioidowe [13, 14] modulujące poziom odczuwanego bólu, receptory muskarynowe kontrolujące pracę mięśni gładkich, a także receptory smakowe oraz węchowe.



**Rys. 1.** Schemat budowy receptora GPCR oraz jego lokalizacja w błonie komórkowej, IL:I do IL:III - pętle wewnątrzkomórkowe, EL:I do EL:III – pętle zewnątrzkomórkowe, helisy transbłonowe oznaczono cyframi od I do VII. N-koniec położony jest po stronie zewnątrzkomórkowej, C-koniec znajduje się po stronie cytoplazmatycznej błony. Rysunek wykonany na podstawie pracy [15]

Niezależnie od pełnionych funkcji oraz różnic w długości łańcucha białkowego receptory GPCR posiadają wspólne cechy strukturalne. Wszystkie zbudowane są z pojedynczego łańcucha polipeptydowego siedmiokrotnie przechodzącego przez dwuwarstwę lipidową. Domenę transbłonową wszystkich receptorów GPCR tworzy siedem hydrofobowych  $\alpha$ -helis (TMH:I do TMH:VII) połączonych pętlami, trzy pętle na zewnątrz komórki (EL:I do EL:III) oraz trzy wewnątrz komórki (IL:I do IL:III)). Koniec karboksylowy (C-koniec) znajduje się zawsze po stronie cytozolowej błony i zawiera miejsca fosforylacji przez odpowiednie kinazy GRK (*G protein coupled Receptor Kinase*). Mający wolną grupę aminową koniec łańcucha białkowego (N-koniec) położony jest zawsze na zewnątrz komórki i zwykle zawiera miejsca glikozylacji. Na znajdującej się po obu stronach błony komórkowej powierzchni receptora, występują liczne aminokwasy o charakterze hydrofilowym, natomiast w obszarze błony przeważają aminokwasy o

właściwościach hydrofobowych co powoduje silne zakotwiczenie białka w błonie lipidowej. Obecne pomiędzy helisami liczne wiązania wodorowe dodatkowo stabilizują strukturę receptorów GPCR.

Receptory sprzężone z białkami G wykazują duże podobieństwo sekwencyjne i strukturalne w rejonie transbłonowym [11, 16-20], natomiast długość łańcucha białkowego w obszarze N- jak i C-końca oraz pętli łączących helisy podlega dużemu zróżnicowaniu [21]. Znikome podobieństwo sekwencyjne tych fragmentów pozwala również przypuszczać, iż posiadają one odmienną strukturę przestrzenną, szczególnie w części zewnątrzkomórkowej (która wiąże odmiennie ligandy), podczas gdy są one zadziwiająco podobne pod względem długości pętli w części cytoplazmatycznej (która służy do wiązania trimeru białka G).

Miejsce wiązania ligandów receptorów rodziny A zlokalizowane jest przeważnie we wnęce tworzonej przez siedem  $\alpha$ -helis, jak ma to miejsce w przypadku receptora  $\beta_2$  adrenergicznego [10] czy rodopsyny [8]. Bezpośrednie otoczenie miejsca aktywnego stanowią aminokwasy pochodzące z helis transmembranowych TMH:I, TMH:III, TMH:V, TMH:VI, oraz TMH:VII. W niektórych typach receptorów GPCR ligandy wiążą się również do dużej domeny tworzonej przez długi N-koniec receptora (receptory feromonów, receptory GABA<sub>B</sub>), [22, 23] jak i do aminokwasów zlokalizowanych w pętlach i w obszarze transmembranowym białka receptorowego (receptory neuropeptydowe) [1, 7, 24, 25].

Wszystkie poznane dotychczas struktury krystaliczne receptorów GPCR (struktury rodopsyny nieaktywnej [8], struktura rodopsyny częściowo aktywnej [26], struktury opsyny [16], struktura receptora A<sub>2A</sub> adenozynowego [18], struktury receptora  $\beta_1$  adrenergicznego [11] oraz receptora  $\beta_2$  adrenergicznego [10]) stanowią receptory należące do klasy A, rodopsyno-podobnych. Pomimo faktu, iż podobieństwo sekwencyjne nie jest duże dla różnych typów receptorów klasy A (20-30% dla całej długości łańcucha białkowego), prezentowane struktury wykazują wysoką zbieżność w obszarze transbłonowym (po wzajemnym nałożeniu części łańcucha białkowego, wspólnego dla obszaru transmembranowego receptora  $\beta_2$  adrenergicznego oraz rodopsyny, średnie odchylenie kwadratowe położenia współrzędnych atomów białka (RMSD) nie przekracza 3.2 Å). Wysokie podobieństwo strukturalne tego obszaru sugeruje, że proces przeniesienia sygnału przez błonę komórkową inicjowany aktywacją receptora może posiadać wspólny mechanizm dla większości przedstawicieli tej rodziny.

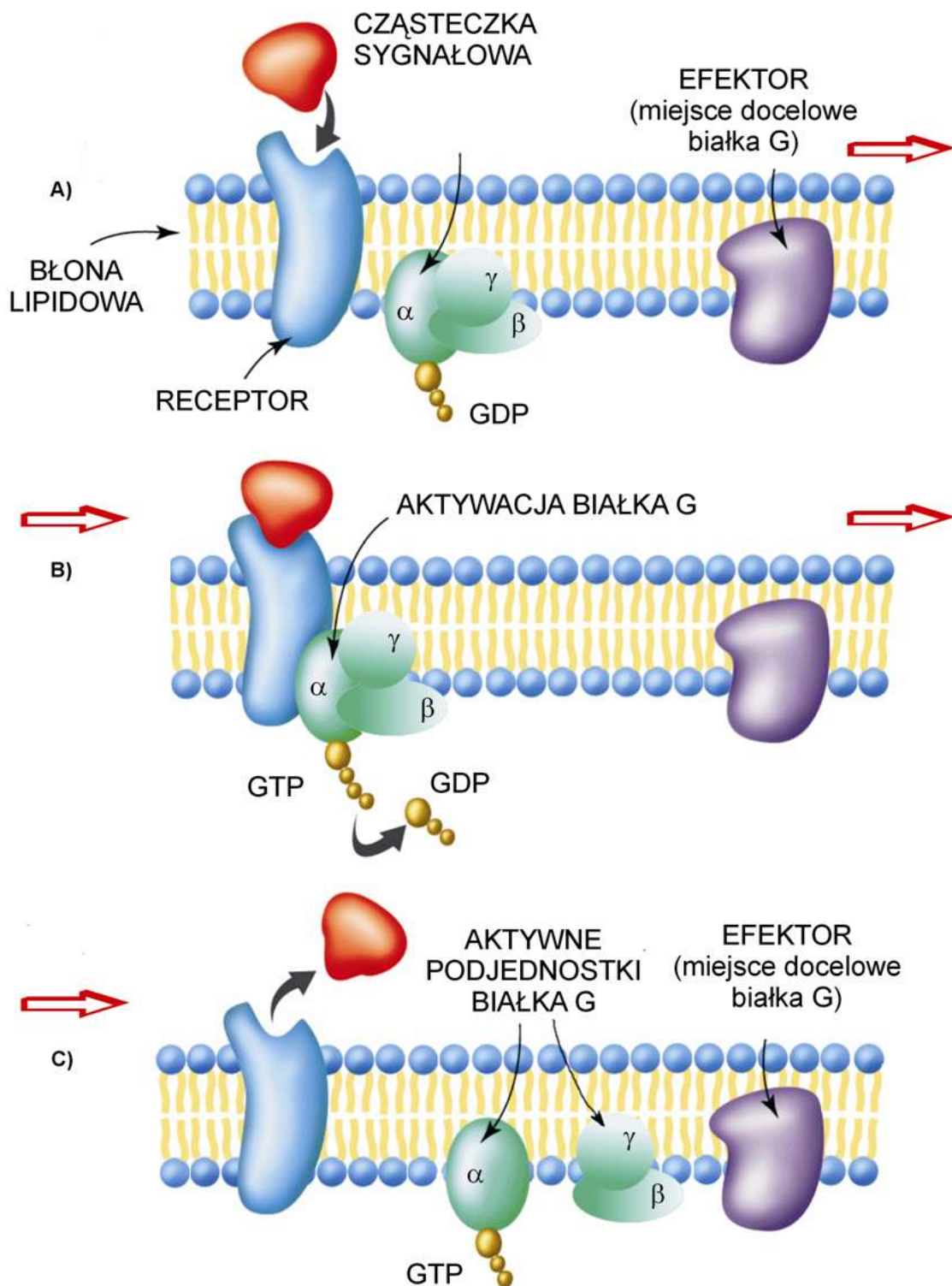
## 1.1. Przekazanie sygnału i aktywacja białka G

Kiedy zewnątrzkomórkowa cząsteczka sygnalizacyjna o właściwościach agonistycznych wiąże się z receptorem następuje zmiana konformacyjna tego białka. Dzieje się tak prawdopodobnie dlatego, iż wiązany ligand modyfikuje oddziaływania pomiędzy helisami (wiązania wodorowe, oddziaływania jonowe oraz hydrofobowe), które są niezbędne dla stabilizacji receptora w jego formie nieaktywnej [27, 28]. Podczas aktywacji, część cytoplazmatyczna receptora modyfikuje swoją strukturę, co umożliwia bezpośrednie oddziaływanie z białkiem G po wewnętrznej stronie błony komórkowej (w cytoplazmie). W procesie przeniesienia sygnału prawdopodobnie kluczową rolę odgrywa trzecia pętla cytozolowa receptora (IL:III, pętla pomiędzy helisą TMH:V i helisą TMH:VI), która bierze udział w bezpośrednim wiązaniu i aktywacji białka G [29-33].

Wszystkie białka G składają się z trzech podjednostek:  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ . Istnieje wiele odmian białek G jednak jest ich dziesięciokrotnie mniej niż receptorów GPCR, co pozwala przypuszczać, iż pojedyncze białko G może być wiązane i aktywowane przez różne typy receptorów GPCR. Sugeruje to podobieństwo mechanizmu aktywacji białka G przez poszczególne receptory [21] jak i na podobieństwo strukturalne samych receptorów GPCR.

W formie nieaktywnej białka G (Rys. 2.A.), podjednostka  $\alpha$  zawiera związaną cząsteczkę GDP (difosforan guanozyny). Po zmianie konformacji receptora GPCR, zakotwiczone w błonie białko G [34] dyfunduje w jego pobliże tworząc z nim kompleks (Rys. 2.B.). Receptor aktywując białko G katalizuje wymianę cząsteczki GDP na GTP (trifosforan guanozyny), prawdopodobnie przez chwilowe rozwarście miejsca wiązania nukleotydu guanylowego. Następuje wtedy podział na podjednostkę  $G_{\alpha}$ -GTP oraz  $G_{\beta\gamma}$  a następnie ich oddysocjowanie. Cytoplazmatyczna powierzchnia receptora zostaje uwolniona ( Rys. 2.C.), aby móc aktywować dalsze molekuly białka G. Sygnał aktywacji jest zwykle przenoszony do miejsca docelowego przez jednostkę  $G_{\alpha}$ -GTP, ale w pewnych przypadkach obiekt docelowy uruchamiany jest przez podkompleks  $G_{\beta\gamma}$ .

Podjednostki białka G pozostają aktywne przez okres rzędu od kilku sekund do kilku minut. Podczas jednego cyklu sygnał może zostać przekazany do wielu miejsc docelowych. Czas ten jest jednak ograniczony przez zachowanie  $G_{\alpha}$ -GTP. Podjednostka  $\alpha$  posiada wbudowaną zdolność hydrolizowania GTP (aktywność GTPazy). Prowadzi to ostatecznie do zhydrolizowania związanego GTP do GDP. Dwie podjednostki z powrotem łączą się tworząc kompleks – nieaktywną formę białka G.



**Rys. 2.** Schemat przekazania sygnału i aktywacji białka G. A) Wiązanie agonisty przez białko receptorowe, aktywacja receptora GPCR. B) Tworzenie kompleksu GPCR-białko G i aktywacja białka G. C) Przekazanie sygnału przez aktywne podjednostki białka G do miejsca docelowego (białko efektorowe: enzymu, kanału jonowego).

Opisany schemat obrazuje jeden ze sposobów przekazywania sygnału spoza komórki do jej wnętrza [35, 36]. Należy zauważyć, iż jeden receptor może aktywować do

kilkuset cząsteczek białka G. Również każda z aktywnych podjednostek białka G, podczas jednego cyklu, może dotrzeć do dużej liczby białek efektorowych (miejsce docelowych): enzymów, kanałów jonowych. Przekazywany sygnał ulega wtedy istotnemu wzmocnieniu (zjawisko amplifikacji sygnału).

## 1.2. Mechanizmy aktywacji receptorów GPCR

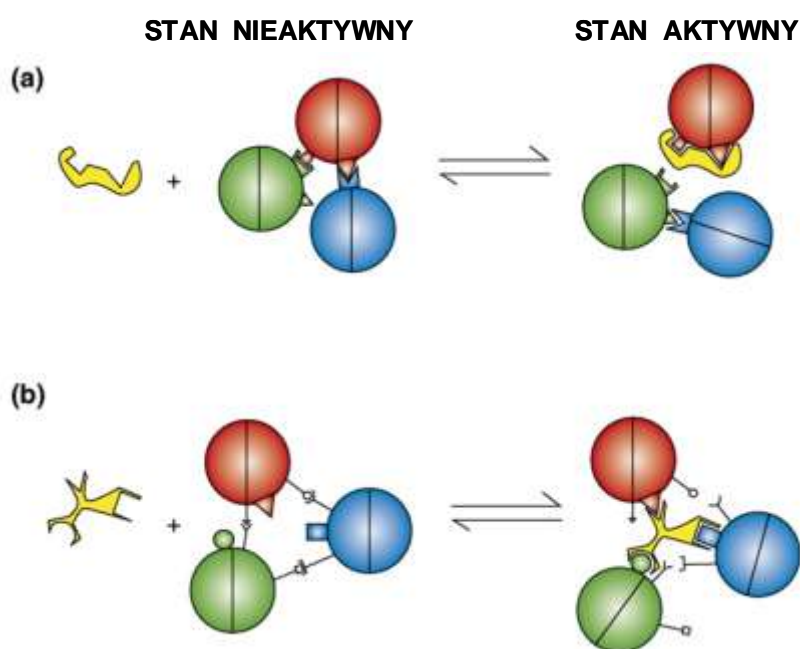
Podczas aktywacji w strukturze receptora dochodzi do szeregu zmian konformacyjnych umożliwiających wiązanie białek G po wewnętrznej stronie błony komórkowej oraz dalsze przekazanie sygnału. Receptory te nie działają jednak jak „bimodalne przełączniki” przyjmujące jedynie dwa stany: nieaktywny (podstawowy) lub aktywny [27]. Większość receptorów GPCR to receptory wykazujące pewną aktywność podstawową (*ang. basal activity*), czyli możliwość samoczynnego przejścia do formy aktywnej pod nieobecność związanego liganda. Cząsteczki sygnałowe modulujące aktywność receptora możemy podzielić na grupy w zależności od ich wpływu na funkcjonalność białka receptorowego. Pełni agoniści (*ang. full agonists*) wywołują stan całkowicie aktywny, agoniści (*ang. agonists*) prowadzą do większej aktywności receptora niż jego aktywność podstawowa, antagoniści (*ang. antagonists*) blokują jedynie miejsce wiążące białka receptorowego nie zmieniając jego aktywności podstawowej, natomiast agoniści inwersyjni (*ang. inverse agonists*) wywołują stan receptora charakteryzujący się niższą aktywnością od jego aktywności podstawowej [37]. Wykazano, iż wiązanie różnych ligandów może prowadzić do form receptora wykazujących odmienny poziom aktywności, a także charakteryzujących się odmienną konformacją białka [38-41] wpływającą na sposób przeniesienia sygnału.

W strukturze receptora w formie nieaktywnej występuje szereg oddziaływań stabilizujących jego konformację [8, 10, 11, 16-20, 26]. Należą do nich między innymi wiązania wodorowe, oddziaływania hydrofobowe oraz jonowe, obecne pomiędzy helisami [7]. Cząsteczki wody, znajdujące się w strukturze receptorów, mogą dodatkowo stabilizować ich konformację pośrednicząc w sieci wiązań wodorowych we wnętrzu białka. W strukturze receptorów GPCR należących do rodziny A, występują dobrze zachowane motywy sekwencyjne określane mianem przełączników molekularnych (*ang. molecular switches*) [42], które pełnią kluczową rolę w stabilizacji stanu podstawowego tych białek. Należą do nich między innymi: motyw E(D)RY na TMH:III, nazywany „zamkiem jonowym” (*ang. „ionic lock”*) [43, 44], sekwencja CWxPxF(H) zlokalizowana



na TMH:VI (*ang.* „rotamer toggle switch”) [45, 46], tak zwany „zamek 3-7” (*ang.* „3-7 lock”) łączący TMH:III i TMH:VII [47, 48], obecny w strukturze rodopsyny oraz sekwencja NPxxY łącząca TMH:VII z helisą ósmą [49].

Receptory GPCR, podobnie jak wszystkie białka, nie są sztywnymi strukturami i podlegają nieustannym ruchom termicznym [50]. Przejście ze stanu podstawowego do formy aktywnej wymaga zerwania oddziaływań wewnątrzcząsteczkowych stabilizujących konformację nieaktywną. Prawdopodobieństwo takiego przejścia jest odpowiednio większe dla receptorów wykazujących dużą aktywność podstawową takich, jak receptor kanabinoidowy CB1 [51]. Natomiast w receptorach posiadających znikomą aktywność podstawową jak rodopsyna czy receptor FSH (*ang.* *follicle stimulating hormone receptor*) [52], przejście takie zachodzi niezwykle rzadko.



**Rys. 3.** Schematy aktywacji receptorów GPCR wywołanej wiązaniem agonisty. Kolorem żółtym oznaczono wiązany ligand – agonistę. a) Agonista blokuje oddziaływania obecne między helisami stabilizujące stan podstawowy receptora, co umożliwia przejście białka w stan aktywny. b) Stan aktywny receptora stabilizowany jest przez nowo utworzone bezpośrednie oddziaływania ligand-receptor. Rysunek pochodzi z pracy [27].

Badania z zastosowaniem mutacji kierunkowych pozwoliły na identyfikację pojedynczych aminokwasów odpowiedzialnych za stabilizację stanu nieaktywnego niektórych receptorów z rodziny A [47, 53]. Zamiana pojedynczego aminokwasu na resztę o odmiennych właściwościach fizykochemicznych, powoduje niekiedy znaczny wzrost aktywności podstawowej mutantu albo prowadzi nawet do otrzymania stabilnej formy aktywnej danego receptora (*ang.* *CAM - constitutively active mutant*) [7, 54-59].

Wiązanie agonisty prowadzi do zmian konformacyjnych w receptorze pozwalających na przejście białka w stan aktywny [43, 60]. Mechanizm aktywacji receptora wywołany wiązaniem liganda prawdopodobnie może przebiegać w dwojaki sposób [27]. Wiązany ligand może powodować zerwanie lub blokadę obecnych oddziaływań wewnątrzcząsteczkowych stabilizujących stan podstawowy receptora, co inicjuje sekwencje zmian konformacyjnych prowadzących do stanu aktywnego białka. W drugim przypadku, stan aktywny receptora może być stabilizowany przez nowo utworzone bezpośrednie oddziaływania ligand-receptor (Rys. 3.).

Receptory GPCR należące do rodziny A, pomimo podobieństwa strukturalnego w rejonie transmembranowym, mogą wiązać ligandy do różnych mikrodomen obecnych w strukturach tych receptorów. Położenie związanego liganda ZM241385 w strukturze krystalicznej receptora A<sub>2A</sub> adenozynowego [18] znacznie odbiega od miejsca wiązania retinalu w rodopsynie czy ligandów obecnych w dostępnych strukturach krystalicznych receptorów adrenergicznych [10, 11, 19, 20]. Ponadto, ligandy tego samego receptora β<sub>2</sub>AR: katechol i ICI11855 posiadają odmienne miejsca wiązania [38], a co więcej aktywują ten receptor według odmiennych mechanizmów, powodując zmianę odmiennych przełączników molekularnych [38].

### 1.3. Receptory Opioidowe

Substancje uśmierzające ból były używane przez ludzkość od zamierzchłych czasów. Stosowanie opium, substancji otrzymywanej w procesie suszenia gęstego soku z niedojrzałych owoców maku lekarskiego (mak lekarski – *lac. Papaver Somniferum*), datuje się już na 3400 rok p.n.e. [61]. Początkowo wyciąg z maku lekarskiego był stosowany jako element kultu religijnego ze względu na silne działanie na układ nerwowy. Przyjmowanie mikstury wywoływało uczucie euforii, prowadziło do stanu otępienia i odurzenia. Pierwsze przekazy opisujące stosowanie opium na terenie Europy w celach medycznych (przeciwbólowych, uspokajających czy nasennych) pochodzą z roku 1500 n.e. W roku 1806 po raz pierwszy z opium wyodrębniono jeden z czynnych składników – morfinę, nazwaną tak na cześć boga snu Morfeusza. Od końca dziewiętnastego wieku morfinę zaczęto stosować w medycynie do celów terapeutycznych.

Wyciąg z maku lekarskiego zawiera liczne substancje psychoaktywne. W skład opium wchodzi mieszanina ponad 40 alkaloidów, które możemy podzielić na dwie podstawowe grupy: pochodne fenantrenu (morfina, kodeina, tebaina) oraz pochodne

izochinoliny (papaweryna, emetyna). Pierwsza grupa związków, zwana opiatami, wywiera istotny wpływ na układ nerwowy człowieka. W roku 1973 wykazano, iż niektóre substancje zawarte w wyciągu z opium oddziałują na specyficzne receptory zlokalizowane w centralnym układzie nerwowym [62-64], nazwane później receptorami opioidowymi. W latach 1977-90 potwierdzono występowanie trzech typów receptorów opioidowych: MOR, DOR oraz KOR, wykazujących selektywność w wiązaniu ligandów [65, 66]. Ostatecznie w 1992 roku zidentyfikowano oraz poddano ekspresji geny kodujące wszystkie trzy typy receptorów opioidowych [67-73], co w znacznym stopniu przyczyniło się do szybkiego rozwoju badań nad tymi białkami.

Receptory opioidowe występują głównie w centralnym układzie nerwowym, w błonie komórkowej neuronów. Możemy je również odnaleźć w niektórych typach mięśni gładkich. Ich obecność stwierdzono także m.in. w przewodzie pokarmowym, komórkach układu immunologicznego, w macicy, sercu oraz płucach. Skutki oddziaływania substancji opioidowych (zdolnych do modulacji aktywności podstawowej receptorów opioidowych) na organizm człowieka są liczne i bardzo zróżnicowane. Zaliczamy do nich: osłabienie reakcji na bodźce pochodzące z otoczenia, takie jak dotyk, dźwięk czy światło; ośpienie, stany euforyczne jak i depresyjne. Substancje te wywierają wpływ na ciśnienie tętnicze, częstość skurczów mięśnia sercowego, regulują także funkcje oddechowe. Receptory opioidowe odgrywają także kluczową rolę w kaskadach sygnalizacyjnych odpowiedzialnych za odczuwanie bólu, regulację funkcji motorycznych, psychofizycznych jak i kontrolę nastroju [74].

Receptory opioidowe, w odpowiedzi na związanie zewnątrzkomórkowej cząsteczki sygnałowej, aktywują białka  $G_i$  oraz  $G_o$  po wewnętrznej stronie błony komórkowej. Następnie, podjednostka  $G_{\alpha}$ -GTP oraz podkompleks  $G_{\beta\gamma}$  docierają do miejsc docelowych, białek efektorowych, którymi są między innymi kanały jonowe (wapniowe i potasowe) oraz enzymy błonowe (np. cyklaza adenylova). Jednorazowe działanie agonistów receptorów opioidowych skutkuje zahamowaniem aktywności cyklazy adenylowej co prowadzi do obniżenia poziomu cAMP, pełniącego rolę przekaźnika drugiego rodzaju (*ang. second messenger*). Przy długotrwałym działaniu agonistów obserwujemy natomiast kompensacyjną up-regulację tego enzymu i wzrost poziomu cAMP, co może być przyczyną zwiększonej pobudliwości neuronów. Obecność cAMP wywiera także wpływ na proces regulacji genów, przez fosforylację czynników transkrypcyjnych, które z kolei wiążą się z elementami regulatorowymi odpowiednich genów. Wiadomo, iż receptory

opiodowe pełnią ważną funkcję w procesie uwalniania przekazników neuronalnych, kontrolując stan bramkowanych napięciem kanałów wapniowych, zlokalizowanych w błonie presynaptycznych zakończeń nerwowych. Również, poprzez regulację przepustowości kanałów potasowych [75] receptory te mogą spowalniać przekazywanie impulsów nerwowych poprzez neurony [76-78]. Długotrwałe stosowanie substancji opiodowych może prowadzić do uzależnienia [79]. Receptory opiodowe wywierają wpływ na wydzielanie dopaminy - neuroprzekaznika syntezowanego i uwalnianego przez neurony ośrodkowego układu nerwowego [80]. Układ dopaminowy stoi u podstawy zjawiska wzmocnienia pozytywnego, które jest związane z działaniem leków uzależniających. Długotrwałe przyjmowanie opiodów prowadzi do nasilenia wydzielania dopaminy odpowiedzialnej za intensywność w układzie nagrody oraz stan określany w uproszczeniu jako euforia, a także za zjawiska motywacyjne.

Ze względu na swoje właściwości farmakologiczne, receptory opiodowe stały się przedmiotem licznych badań niezwykle istotnych dla przemysłu farmaceutycznego. Znalezienie substancji wykazujących wysoką selektywność oraz powinowactwo względem jednego z trzech podtypów receptorów opiodowych: MOR, DOR i KOR, pomogłoby w zaprojektowaniu skutecznych leków przeciwbólowych, antydepresyjnych, leków stosowanych w leczeniu uzależnień, powodujących mniej efektów ubocznych. Niestety nadal stan wiedzy dotyczący struktur tych białek receptorowych oraz mechanizmów ich aktywacji jak i dezaktywacji jest bardzo ograniczony.

Obecny stan wiedzy potwierdza występowanie trzech głównych typów receptorów opiodowych: MOR, KOR i DOR [81] oraz receptora nocyceptyny, podobnego do receptorów opiodowych (ORL 1 – *ang. opioid receptor like-1*) [82-84]. Badania farmakologiczne sugerują również występowanie większej liczby podtypów tych receptorów (np. dwa receptory DOR i po trzy KOR i MOR) [14]. Może to wynikać z faktu, iż receptory te występują w formie homo- jak i hetero-dimerów oraz merów wyższych rzędów [85, 86], które także mogą być funkcjonalne. Wiadomo również, iż niektóre opiody o właściwościach agonistycznych wykazują selektywność względem ściśle określonego dimeru lub monomeru [87] tych receptorów.

Receptory opiodowe należą do rodziny A receptorów GPCR (zwanej także rodziną podobnych do rodopsyny; *ang. rhodopsin like*). Łańcuchy peptydowe receptorów opiodowych składają się odpowiednio z 372 AA - DOR, 380 AA - KOR oraz 398 AA - MOR. Pomimo braku struktury krystalicznej tych białek przyjmuje się, że są one

zbudowane z siedmiu  $\alpha$ -helis przechodzących przez dwuwarstwę lipidową, połączonych ze sobą krótkimi pętlami. Helisa ósma jest położona prostopadle do błony po stronie wewnątrzkomórkowej. Podobieństwo sekwencyjne trzech receptorów opioidowych jest wysokie, procent identycznych aminokwasów dla poszczególnych par równy jest odpowiednio: 57% dla MOR i KOR, 61% dla DOR i KOR oraz 62% dla DOR i MOR [88]. Natomiast ponad 93% aminokwasów jest ewolucyjnie zachowanych dla danego typu receptora obecnego u przedstawicieli różnych gatunków.

Uliniowanie sekwencji trzech receptorów opioidowych oraz sekwencji rodopsyny (Rys. 4.) pokazuje, iż w sekwencji receptorów opioidowych występują dobrze zachowane motywy, charakterystyczne dla innych przedstawicieli rodziny A, receptorów GPCR. Na helisie II obecny jest motyw LxxxD, na helisie III motyw E(D)RY, motyw CWxPxF(H) występuje na helisie VI, oraz motyw NPxxY na helisie VII (gdzie x – oznacza dowolny aminokwas). W każdym z receptorów opioidowych obecne jest wiązanie disulfidowe pomiędzy cysteiną z helisy III oraz cysteiną zlokalizowaną w drugiej pętli zewnątrzkomórkowej. Jest to cecha wspólna dla wszystkich GPCR-ów z rodziny A. Największe podobieństwo sekwencyjne występuje na odcinku transmembranowym, natomiast znikome podobieństwo widoczne jest w rejonie pętli zewnątrzkomórkowych oraz C- i N-końca.

Dane eksperymentalne opisujące wpływ pojedynczych mutacji kierunkowych (*ang. point mutations*), oraz badania z zastosowaniem receptorów o zmienionej części łańcucha peptydowego (*ang. receptor chimeras*), pozwoliły na określenie prawdopodobnego miejsca wiązania typowych ligandów receptorów opioidowych [88-90]. Miejsce wiązania zlokalizowane jest we wnęce pomiędzy helisami od TMH:II do TMH:VII, którą przykrywają trzy pętle zewnątrzkomórkowe. Aminokwasy odpowiedzialne za wiązanie ligandów są w większości dobrze zachowane w trzech typach receptorów opioidowych: Asp:3.32, Tyr:3.33, Lys:5.39, Phe:5.47, Trp:6.48, Ile:6.51, His:6.52, Ile:6.53, Ile:7.39, and Tyr:7.43 [91-100] (numeracja według konwencji Ballesterosa-Weinsteina [101], gdzie pierwsza liczba oznacza numer helisy transbłonowej, druga to pozycja reszty liczona względem najbardziej zachowanego w ewolucji aminokwasu na tej helisie, oznaczonego numerem 50).



struktury rodopsyny, w miejscu znajdowania się reszty Gly w TMH:II na pozycji 2.56 nie występuje odpowiadający jej aminokwas w sekwencji trzech receptorów opioidowych. Brak reszty na wyżej wymienionej pozycji sprawia, iż ten fragment białka prawdopodobnie przyjmuje strukturę regularnej  $\alpha$ -helisy (przerwa zaznaczona kolorem żółtym, (Rys. 4.)).

### 1.3.1. Ligandy receptorów opioidowych

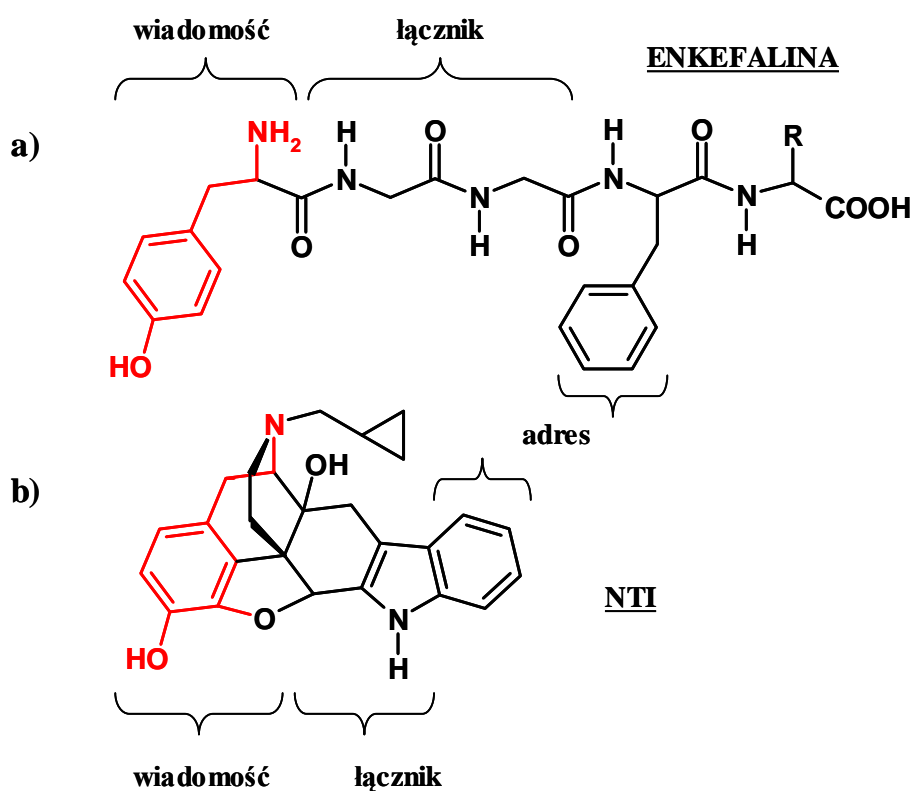
Mianem opiatów określamy wszystkie naturalne związki egzogenne modulujące aktywność podstawową (*ang. basal activity*) receptorów opioidowych. Zaliczamy do nich wszystkie alkaloidy obecne w opium, takie jak: morfina, heroina, czy kodeina, oraz ich pochodne [103]. Substancje te wpływają silnie na układ nerwowy człowieka, prowadzą do stanów euforycznych jak i depresyjnych, wykazują silne działanie przeciwbólowe [13, 74]. Przyjmowanie opiatów może prowadzić do szybkiego uzależnienia [79]. Szerszym pojęciem określającym wszystkie związki wykazujące powinowactwo w stosunku do receptorów opioidowych są opioidy. Zaliczamy do nich zarówno opiaty, ich pochodne syntetyczne, jak i również endogenne ligandy peptydowe, takie jak endorfiny, enkefaliny, endomorfiny czy dynorfiny [104, 105].

**Tabela 1. Endogenne ligandy peptydowe receptorów opioidowych.**

Peptyd	Selektywność	Sekwencja aminokwasów
Enkefalina	DOR	<b>Tyr-Gly-Gly-Phe-X</b> , X=Leu lub Met
Dynorfina A	KOR	<b>Tyr-Gly-Gly-Phe</b> -Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys-Trp-Asp-Asn-Gln
Endomorfina	MOR	<b>Tyr-Pro-X-Phe-NH<sub>2</sub></b> , X=Trp lub Phe

Endomorfiny, enkefaliny oraz dynorfiny, naturalne ligandy peptydowe receptorów opioidowych (Tabela 1.) są cząsteczkami zbudowanymi z kilku do kilkudziesięciu aminokwasów. Ligandy te wykazują selektywność względem receptorów MOR, DOR oraz KOR. Peptydy te charakteryzuje wspólny motyw obecny od strony N-końca łańcucha peptydowego, sekwencja Tyr-Gly-Gly-Phe (lub Tyr-Pro-Phe/Trp-Phe) [105-108]. Według postulowanego modelu wiązania się ligandów, nazywanego potocznie: „wiadomość-adres” (*ang. message-address*) [109], wspólna dla peptydowych ligandów opioidowych sekwencja czterech aminokwasów jest odpowiedzialna za przekazanie sygnału –

wiadomości. Pozostała część łańcucha polipeptydowego, specyficzna dla każdego liganda, odpowiada za selektywność względem danego typu receptora opioidowego – adres [110] (Rys. 5). Proponowany model oddziaływań zakłada, iż określony receptor posiada domenę odpowiedzialną za rozpoznawanie wspólnego dla ligandów opioidowych farmakoforu (modelu opisującego relacje przestrzenne między elementami wspólnymi dla ligandów oddziałujących z danym receptorem) oraz sąsiednie miejsce specyficzne dla danego typu receptora, odpowiadające za jego selektywność.



**Rys. 5. Porównanie struktury dwóch ligandów opioidowych, selektywnych względem receptora DOR: a) struktura naturalnego liganda peptydowego enkefaliny, b) struktura zaprojektowanego liganda naltrindolu (NTI) [111]. Zaznaczono fragmenty cząsteczek odpowiadające za: wiadomość, łącznik oraz adres. Kolorem czerwonym oznaczono wspólny element strukturalny – tyraminę.**

W oparciu o powyższy model wiązania peptydowych ligandów opioidowych podjęto próby zaprojektowania nowych związków wykazujących selektywność względem danego typu receptora MOR, DOR lub KOR [111-113]. Związki te składały się z trzech części: fragmentu odpowiedzialnego za „wiadomość”, którą była cząsteczka tyraminy (obecna zarówno w typowych alkaloidach jak morfina czy kodeina oraz w endogennych ligandach peptydowych), łącznika (np. szkieletu naśladowującego sekwencje -Gly-Gly- ),



oraz części odpowiedzialnej za „adres”, posiadającej podobne cechy do części adresowej endogennych ligandów peptydowych [111-113, 114 ] (Rys. 5).

Otrzymane ligandy wykazujące selektywność względem każdego z trzech typów receptorów opioidowych przyczyniły się do znacznego rozwoju badań nad mechanizmami wiązania się opioidów. Eksperymenty z zastosowaniem mutacji kierunkowych pozwoliły również na określenie miejsca wiązania tych ligandów oraz niektórych aminokwasów odpowiedzialnych za bezpośrednie oddziaływanie ligand-receptor, a także umożliwiły budowę nowych syntetycznych związków opioidowych [92, 94-99, 111, 113]. Obecnie znana jest duża liczba ligandów niepeptydowych wykazujących powinowactwo do trzech typów receptorów opioidowych: MOR, KOR oraz DOR (Tabela 2.).

**Tabela 2. Niepeptydowe ligandy receptorów opioidowych.**

Nazwa	Właściwości	Efekt działania
Naltrekson	antagonista MOR, KOR, DOR	blokada receptora, senność
Morfina	agonista MOR, DOR	silny analgetyk
GNTI	antagonista KOR	blokada receptora
Tramadol	częściowy agonista MOR	analgetyk
nor-BNI	antagonista KOR	blokada receptora
NTI	antagonista DOR	blokada receptora, senność
$\beta$ -FNA	antagonista MOR	blokada receptora
Butorfanol	agonista KOR, częściowy antagonist receptor MOR	analgetyk

#### **1.4. Znane struktury krystalograficzne receptorów GPCR**

Otrzymywanie metodami krystalografii rentgenowskiej struktur przestrzennych białek błonowych, w tym receptorów GPCR, jest bardzo trudne. Dzieje się tak ponieważ, w przeciwieństwie do globularnych białek cytoplazmatycznych, białka błonowe posiadają dużą powierzchnię hydrofobową uniemożliwiającą prawidłową krystalizację w roztworach wodnych [115]. Otrzymanie kryształów nadających się do pomiarów wymaga również uwzględnienia otaczającej błony lipidowej oraz zastosowania specyficznych warunków krystalizacji (temperatura, roztwór, ciśnienie, detergenty) [116]. Ponadto, cechą charakterystyczną większości receptorów GPCR jest niezerowa aktywność podstawowa, powodująca samoczynne przejście receptora do stanu pełnej aktywacji. Dodatkowo, duża niestabilność konformacyjna receptorów GPCR utrudnia otrzymanie kryształów nadających się do pomiarów rentgenostrukturalnych [117]. Do dzisiaj znamy struktury

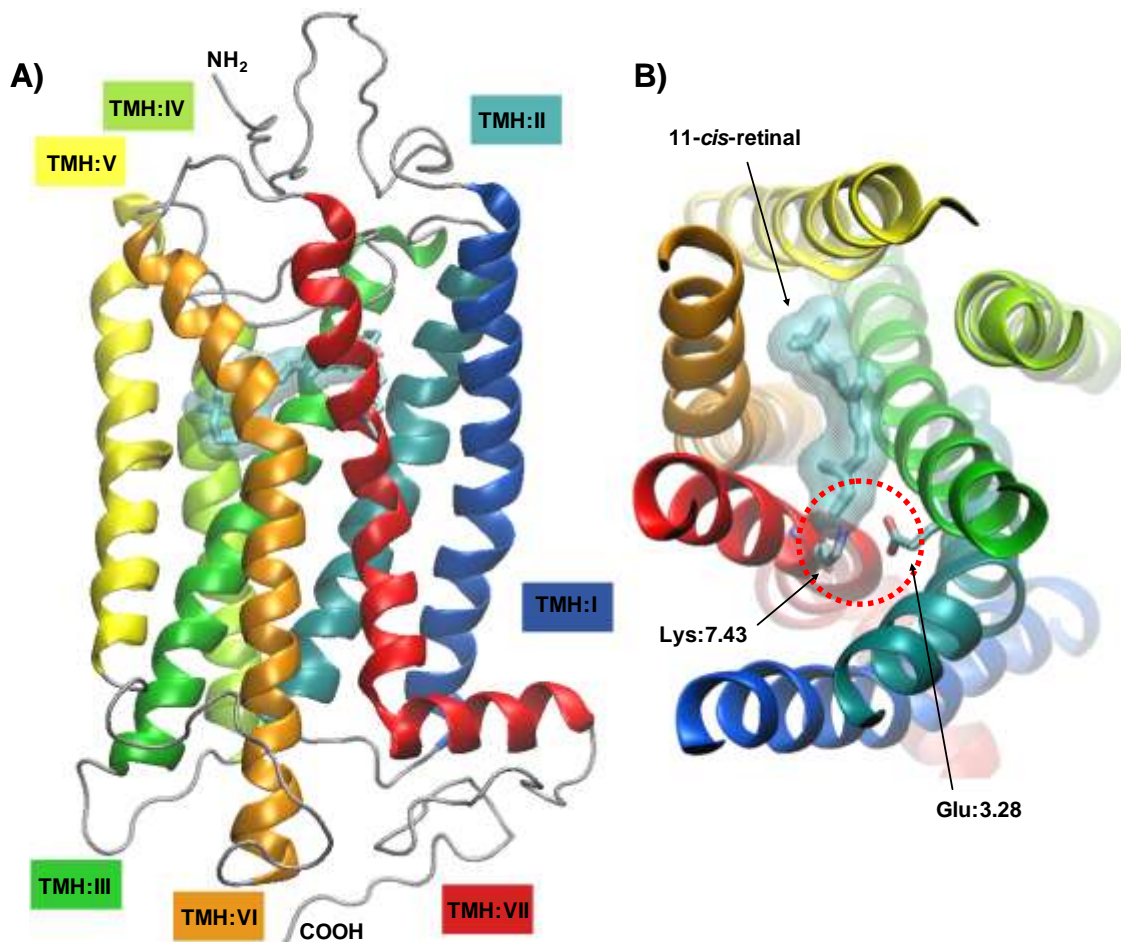
krystaliczne jedynie czterech receptorów GPCR (rodopsyny, receptora A<sub>2A</sub> adenozynowego oraz receptorów  $\beta_1$  i  $\beta_2$  adrenergicznych) [8, 10, 11, 16, 18, 26], z których najlepiej zbadanym (struktury: PDB: ID: 1F88, 1HZX, 1L9H, 1GZM, 1U19, 2J4Y, 2I37, 3CAP, 3DQB, 2Z73, 2ZIIY) [8, 16, 17, 26, 105, 118-123] jest białko fotoreceptorowe – rodopsyna, dlatego jej struktura i modyfikacje zostaną przedstawione najdokładniej. [9, 21, 49, 124-131]

#### 1.4.1. Rodopsyna

Rodopsyna jest białkiem fotoreceptorowym zlokalizowanym w komórkach pręcikowych siatkówki oka. Receptor ten bierze udział w kaskadach sygnalizacyjnych umożliwiających przekształcenie sygnału świetlnego w impuls nerwowy [9]. Absorpcja pojedynczego fotonu jest wystarczająca do przejścia receptora w stan aktywny, co umożliwia związanie i aktywację białka G (transducyny) po wewnętrznej stronie błony komórkowej [125]. Aktywna podjednostka G $\alpha$  aktywuje fosfodiesterazę [132, 133], enzym hydrolizujący cykliczny GMP (cGMP) do GMP, co zmniejsza stężenie cGMP. Zmiana stężenia cGMP skutkuje czasowym zamknięciem kanałów potasowych powodując depolaryzację błony i przepływ prądu do synapsy i dalej do mózgu. Przekazany sygnał ulega istotnemu wzmocnieniu. Dzieje się tak gdyż pojedyncza molekula rodopsyny może aktywować ok. 500 cząsteczek białka G.

Rodopsyna zbudowana jest z części białkowej opsyiny oraz grupy prostetycznej 11-*cis*-retinalu (pochodnej witaminy A) (Rys. 6.). Kowalencyjnie związany ligand znajduje się w kieszeni hydrofobowej, otoczonej przez helisy (TMH:II do TMH:VII), którą przykrywa druga pętla cytoplazmatyczna (EL:II). Połączenie pomiędzy grupą aldehydową 11-*cis*-retinalu oraz łańcuchem bocznym Lys:7.43 tworzy uprotonowana zasada Schiffa [134]. Absorpcja kwantu światła przez 11-*cis*-retinal skutkuje jego izomeracją i przejściem w całkowicie-*trans*-retinal [9]. Zmiana w strukturze przestrzennej tego liganda prowadzi do zmian konformacyjnych całego receptora oraz jego aktywacji [135].

Rodopsyna jest białkiem o masie 40 kDa (kilodaltonów), składającym się z 348 aminokwasów (AA). Rodopsyna, podobnie jak inne receptory GPCR, posiada charakterystyczny motyw siedmiu  $\alpha$ -helis przechodzących przez dwuwarstwę lipidową. Ich długość wynosi odpowiednio od 19 AA do 34 AA. Najkrótsza helisa VIII położona jest równoległe do dwuwarstwy lipidowej, po stronie cytoplazmatycznej [8].



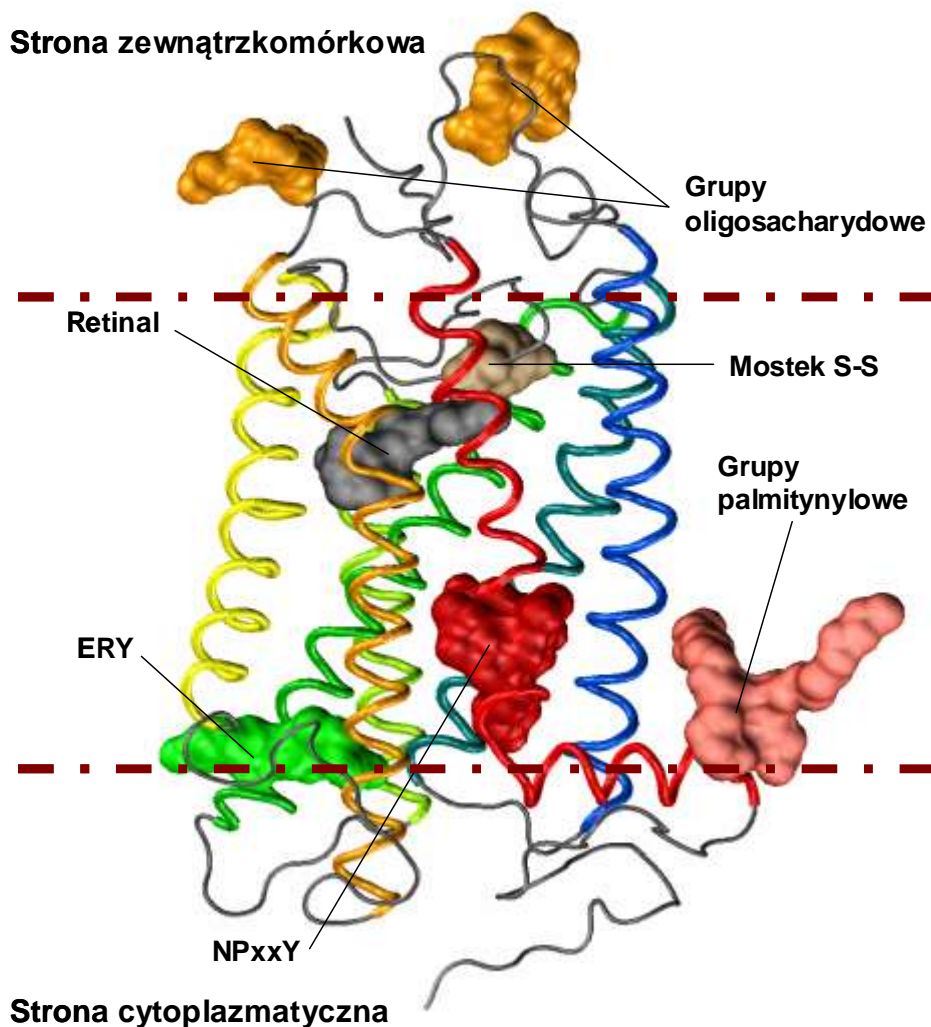
Rys. 6. A) Struktura krystaliczna rodopsyny (PDB ID: 1U19). Helisy transmembranowe od TMH:I do TMH:VII zostały oznaczone kolorami odpowiednio od niebieskiego do czerwonego. B) Widok od strony zewnątrzkomórkowej na miejsce wiążące retinal. Czerwony, przerywany okrąg wskazuje na miejsce wiązania retinalu (wiązanie kowalencyjne za pomocą zasady Schiffa do lizyny Lys7.43) oraz na kwas glutaminowy, Glu3.28, będący przeciwnem dla protonowanej zasady Schiffa.

N-koniec rodopsyny zbudowany jest z 33 AA i jest dosyć sztywny bowiem jego konformację stabilizuje  $\beta$ -karta utworzona przez reszty Thr:4-Glu:5 oraz Tyr:10-Val:11 [128]. Dwie reszty asparaginowe zlokalizowane na pozycji 2 oraz 15 (Asn:2 oraz Asn:15) są miejscami glikozylacji receptora. Helisy transbłonowe rodopsyny posiadają nieregularną budowę oraz są odchyłone od pionowej osi białka [8]. Zgięcia helis powstają głównie na skutek występujących w sekwencji reszt: prolin oraz glicyn. Największe zgięcia w TMH:VI oraz TMH:VII spowodowane są przez obecność dobrze zachowanych w sekwencji reszt Pro:6.50 oraz Pro:7.50. W helisach TMH:II oraz TMH:V występują odstępstwa od  $\alpha$ -helikalnej struktury drugorzędowej na skutek obecności dodatkowych aminokwasów, odpowiednio: Gly:2.56 oraz Phe:5.47, tworzących w miejscu występowania fragmenty  $\pi$ -helisy. Również w rejonie zgięcia TMH:VII, fragment

łańcucha białkowego przyjmuje nietypową konformację helisy  $3_{10}$ . Pętle łączące helisy są relatywnie krótkie z wyjątkiem EL:II oraz IL:II. Najdłuższa pętla rodopsyny (EL:II), zlokalizowana pomiędzy helisami TMH:IV oraz TMH:V, szczelnie przykrywa miejsce wiązania retinalu zapobiegając prawdopodobnie samoistnej aktywacji rodopsyny, co jest niezwykle istotne dla procesu widzenia [136]. Fragmenty pętli łączącej TMH:IV oraz TMH:V: Ile:179 do Glu:181 oraz Ser:186 do Ile:189, tworzą strukturę  $\beta$ -kartki [128]. Za stabilizację pętli EL:II odpowiada dodatkowo wiązanie disulfidowe tworzone pomiędzy Cys:3.25 z helisy TMH:III oraz Cys:187 z pętli EL:II. Najdłuższą pętlą znajdującą się po stronie wewnątrzkomórkowej jest IL:II, łącząca TMH:IV oraz TMH:V. Porównanie wszystkich dostępnych struktur krystalicznych rodopsyny, zdeponowanych w bazie PDB, pozwala przypuszczać, iż fragment ten nie przyjmuje jednoznacznie określonej, stabilnej konformacji. Duże wartości czynnika temperaturowego dla tego odcinka łańcucha peptydowego również sugerują jego wysoką mobilność. Domena tworząca C-koniec receptora, od Asn:310 do Ala:348, nie jest dobrze upakowana. Między obecnymi tam aminokwasami nie występują żadne oddziaływania usztywniające ten fragment łańcucha białkowego. Krótka helisa H:VIII, znajdująca się na powierzchni błony, jest stabilizowana dzięki palmitylacji Cys:323 i Cys:324 [122]. Długie palmitylowe łańcuchy, obecne na końcu tej helisy, są trwale zakotwiczone w błonie komórkowej.

W sekwencji rodopsyny występują charakterystyczne motywy dobrze zachowane w procesie ewolucji także w innych typach receptorów GPCR z rodziny A (Rys. 7.) [9, 49, 137]. Po stronie cytoplazmatycznej helisy TMH:III, znajduje się mikrodomena D(E)RY (a szczególnie środkowa, najbardziej zachowana w ewolucji reszta Arg:3.50), która tworzy połączenie pomiędzy helisami TMH:III i TMH:VI [137] poprzez utworzenie mostka solnego pomiędzy resztami Arg:3.50 oraz Glu:6.30. Podczas aktywacji receptora mostek ten ulega zerwaniu a część cytoplazmatyczna helisy TMH:VI ulega przemieszczeniu, tworząc w ten sposób miejsce na związanie białka G. Innym motywem o istotnym znaczeniu jest mikrodomena NPxxY obecna na helisie VII, która łączy helisy TMH:VII i H:VIII. Ten fragment łańcucha białkowego, również bierze udział w procesie aktywacji receptora prowadzącej do tworzenia kompleksu z białkiem G [49, 125]. Wzajemne położenie siedmiu helis transbłonowych rodopsyny stabilizowane jest dodatkowo przez oddziaływania hydrofobowe, jonowe, a także liczne wiązania wodorowe [9]. Badania krystalograficzne ujawniły także obecność cząsteczek wody w strukturze rodopsyny, które

także uczestniczą w sieci wiązań wodorowych we wnętrzu receptora [121] i pośredniczą w procesie aktywacji.



Rys. 7. Mikrodomeny obecne w krystalicznej strukturze rodopsyny (PDB ID: 1U19) [122]. Helisy transmembranowe od TNH:I do TMH:VII (oraz H:VIII) zostały oznaczone kolorami od niebieskiego do czerwonego. Przerywane linie obrazują położenie granic błony komórkowej.

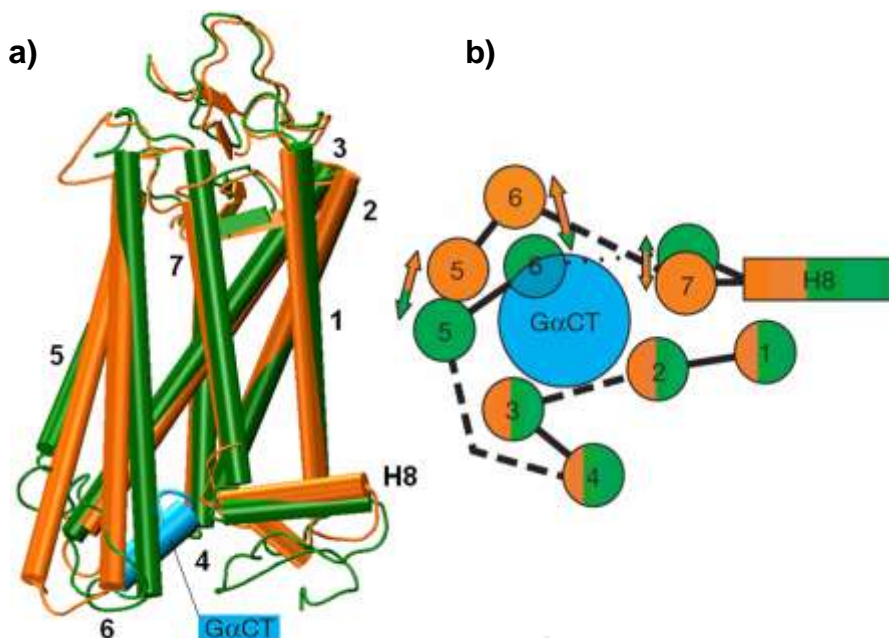
#### 1.4.2. Opsyna w stanie aktywnym

Dzięki postępom w metodach krystalograficznych, a w szczególności technice mikroogniskowania, w 2008 roku udało się skryzalizować opsynę (rodopsyna bez retinalu) [16] oraz uzyskać strukturę kompleksu opsyny z C-kończącą częścią podjednostki  $\alpha$  białka G ( $G\alpha CT$ ) [17]. Część podjednostki  $\alpha$  białka G wnika w głąb rodopsyny i uczestniczy bezpośrednio w przeniesieniu sygnału z aktywnego receptora na białko G.

Absorpcja kwantu światła, powodująca izomeryzację retinalu, prowadzi do zmian konformacyjnych w strukturze rodopsyny. Receptor przechodzi przez szereg stanów

pośrednich (częściowo aktywnych), osiągając ostatecznie formę całkowicie aktywną (zwaną metarodopsyną II) [138], zdolną do wiązania białka G. Podczas tego procesu, zasada Schiffa ulega hydrolizie, co umożliwia oddysocjowanie całkowicie-*trans*-retinalu z miejsca wiązania w rodopsynie. Następnie, z udziałem izomerazy, uwolniony ligand zostaje przekształcony z powrotem do formy 11-*cis*. Cząsteczka opsyny wiąże się z 11-*cis*-retinalem, co inicjuje kolejny cykl aktywacyjny [139]. Aby jednak aktywna rodopsyna lub opsyna nie powodowała stałej aktywacji białek G, a w konsekwencji całej komórki pręcikowej, istnieje mechanizm wygaszania receptora. W pierwszej kolejności aktywna rodopsyna jest fosforylowana przez kinazę rodopsynową, a następnie do takiej rodopsyny przyłącza się arestyna. Ponieważ rodopsyna ulega oligomeryzacji sądzi się, że arestyna tworzy kompleks z dimerem rodopsyny [140, 141].

Opsyna jest niestabilna konformacyjnie i może istnieć zarówno w formie aktywnej jak i nieaktywnej (tzw. stan podstawowy). Wykazano, iż niska wartość pH oraz obecność G $\alpha$ CT (krótkich łańcuchów peptydowych, identycznych z C-końcową częścią podjednostki  $\alpha$  białka G), dodatkowo stabilizują stan aktywny opsyny [142].



**Rys. 8. a)** Nalozenie struktury rodopsyny w stanie podstawowym (kolor zielony, PDB ID: 1U19) [122] oraz opsyny w stanie aktywnym (kolor pomarańczowy, PDB ID: 3DQB) [17]. Kolorem niebieskim oznaczono G $\alpha$ CT (peptyd identyczny z C-końcową częścią podjednostki  $\alpha$  białka G). Cyfry od 1 do 7 oznaczają TMH:I do TMH:VII. **b)** Schemat przedstawiający różnice w strukturze rodopsyny oraz w strukturze opsyny w kompleksie z G $\alpha$ CT, widok od strony cytoplazmatycznej. Rysunek wykonany na podstawie pracy [17].

Porównując dwie struktury charakterystyczne dla stanu podstawowego rodopsyny (PDB ID: 1U19) [122] oraz formy aktywnej białka (PDB ID: 3DQB) [17], zaobserwować

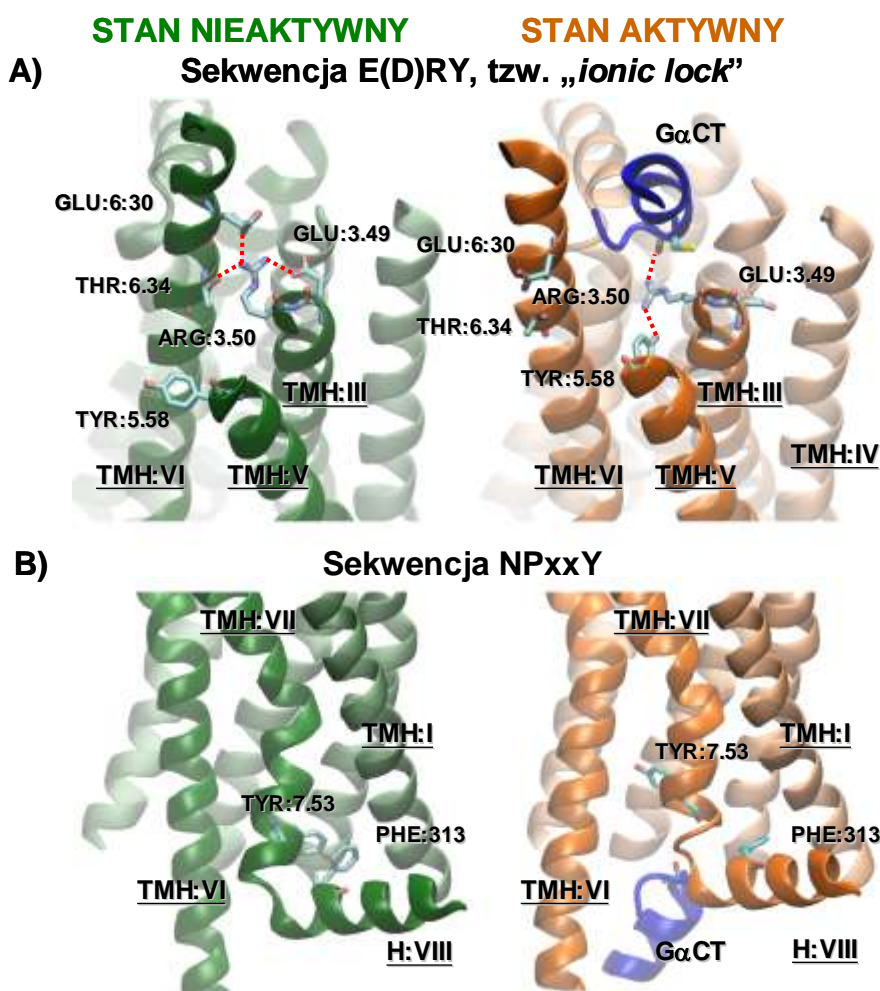
można duże zmiany w położeniu helis: TMH:V do TMH:VII. Natomiast struktura „rdzenia białka”, tworzona przez helisy: TMH:I do TMH:IV oraz położenie pętli zewnątrzkomórkowych EL:I do EL:III wraz z domeną N-końcową, są prawie niezmienniona (Rys. 8.).

W strukturze opsyny część cytoplazmatyczna TMH:VI jest odchyłona o 7 Å na zewnątrz białka [17]. Miejscem zgięcia helisy jest reszta TRP:6.48, której położenie w nieaktywnej strukturze rodopsyny jest stabilizowane przez związany 11-*cis*-retinal. W strukturze opsyny widocznym zmianom podlega również helisa TMH:V. Jest ona przesunięta w kierunku TMH:VI oraz wydłużona o trzy skręty helisy. Skutkuje to znacznym skróceniem pętli IL:III po stronie cytoplazmatycznej błony. Również połowa TMH:VII, zlokalizowana po wewnątrzkomórkowej stronie błony, jest przesunięta do środka receptora, co zmienia konformację części łańcucha łączącego ją z helisą VIII położoną prostopadle do błony. Różnice w lokalizacji poszczególnych helis wpływają na strukturę trzech pętli: IL:I do IL:III. Prowadzi to do zmiany kształtu powierzchni cytoplazmatycznej receptora w formie aktywnej, która jest interfejsem biorącym udział w wiązaniu białka G (transducyny).

Przeprowadzenie rodopsyny ze stanu nieaktywnego do formy aktywnej (metarodopsyny II) wymaga zerwania oddziaływań wewnątrzcząsteczkowych odpowiedzialnych za stabilizację stanu podstawowego receptora. Kluczowe zmiany zachodzą wówczas w miejscu występowania dobrze zachowanych ewolucyjnie u wszystkich receptorów GPCR z rodziny A, motywów: E(D)RY, NPxxY (Rys. 9.), w miejscu wiązania retinalu, jak i również w położeniu części cytoplazmatycznej helis: TMH:IV do TMH:VII [49, 135, 138, 143, 144].

Sieć oddziaływań jonowych (tzw. *ang.* „*ionic lock*”) tworzona przez Arg:3.50 i Glu:3.49 z motywu E(D)RY (obecnego na TMH:III) oraz oddziałujące z nimi Glu:6.30 i Thr:6.34 z TMH:VI, stabilizuje wzajemne położenie dwóch helis [122]. Połączenie to zostaje jednak zerwane podczas aktywacji receptora na skutek ruchu TMH:VI. Zmiana położenia części cytoplazmatycznej TMH:V w stronę TMH:VII prowadzi do powstania wnęki po stronie wewnątrzkomórkowej opsyny, pozwalającej na wiązanie G $\alpha$ CT. Łańcuch boczny Arg:3.50 tworząc wiązanie wodorowe z Tyr:5.58, zmienia swoją orientację w kierunku wnętrza receptora. Pozwala to na bezpośrednie oddziaływanie naładowanego łańcucha bocznego Arg:3.50, z grupą karbonylową cysteiny obecnej na C-końcu wiązanej podjednostki G $\alpha$ CT. Dodatkowo, za stabilizację formy aktywnej receptora, jak i również

powstałej wnęki, odpowiada Tyr:7.53 obecna w motywie NPxxY [17]. Pierścień Tyr:7.53 (która w stanie nieaktywnym oddziałuje z Phe:313 z helisy ósmej) skierowany do środka receptora, zapobiega zmianie położenia TMH:VI (Rys. 9.).



Rys. 9. Różnice w ustawieniu dwu przełączników molekularnych w cząsteczce rodopsyny w stanie nieaktywnym (PDB ID: 1U19) [122] i w stanie aktywnym (PDB ID: 3DQB) [17]. A) Zmiana położenia Glu:3.49, ARG:3.50 z motywu E(D)RY, czerwona przerywana linia symbolizuje wiązania wodorowe. B) Zmiana położenia Tyr:7.53 z motywu NPxxY.

### 1.4.3. Receptor $\beta_1$ oraz $\beta_2$ adrenergiczny

Receptory adrenergiczne, podobnie jak rodopsyna, należą do rodziny A receptorów GPCR. Receptory te zlokalizowane są w dużej liczbie tkanek i narządów człowieka, między innymi w centralnym układzie nerwowym, wątrobie, trzustce, nerkach, płytkach krwi i w oku [145]. Typowymi endogennymi ligandami tych białek są hormony, takie jak adrenalina (epinefryna) oraz noradrenalina (norepinefryna). Receptory adrenergiczne biorą udział w kaskadach sygnalizacyjnych: regulujących poziom ciśnienia tętniczego,



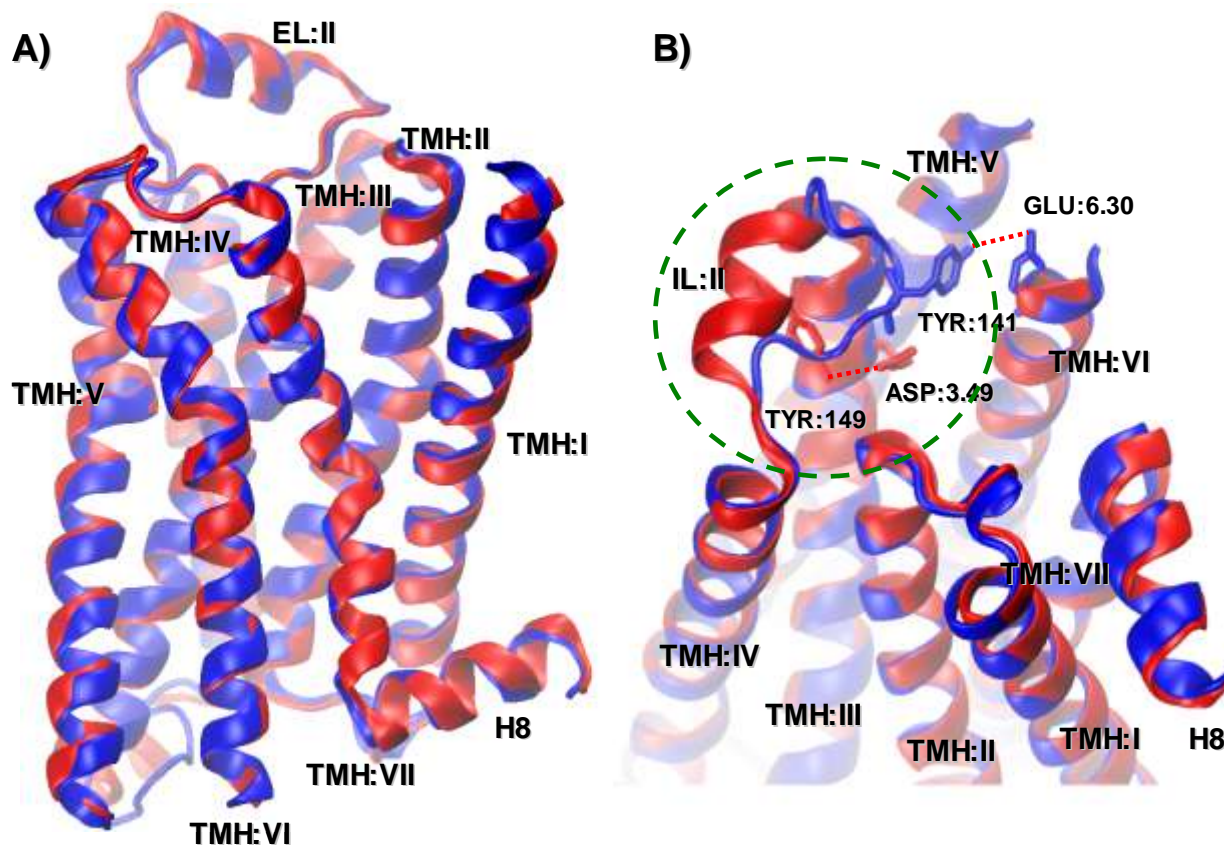
odpowiadających za częstość skurczów serca, wpływających na funkcje oddechowe oraz mobilizację organizmu do obrony [145]. Receptory adrenergiczne dzielimy na dwa typy  $\alpha$  i  $\beta$ . Ponadto w każdej z rodzin, występuje kilka podtypów danego receptora, które różnią się między sobą lokalizacją w organizmie, selektywnością w wiązaniu ligandów, a także sposobem przekazywania sygnału przez białka G [146].

Obecnie znamy struktury krystaliczne dwóch receptorów adrenergicznych:  $\beta_1$ AR (*ang.  $\beta_1$  adrenergic receptor*, PDB ID: 2VT4) [11] oraz  $\beta_2$ AR (*ang.  $\beta_2$  adrenergic receptor*, PDB ID: 2RH1, 2R4R i 2R4S) [10, 19, 20]. Ze względu na trudności związane z krystalizacją białek błonowych [117] zastosowano różne metody do otrzymania kryształów wspomnianych receptorów. W celu otrzymania struktury  $\beta_1$ AR (PDB ID: 2VT4) [11] wprowadzono odpowiednie mutacje kierunkowe w łańcuchu polipeptydowym zwiększające stabilność receptora w detergencie [147]. Do konstrukcji kryształów  $\beta_2$ AR zastosowano metodę polegającą na stworzeniu hybrydy receptora z innymi białkami. W pierwszym przypadku była to hybryda receptora z fragmentem FAB ( $\beta_2$ AR-Fab5) przeciwciała monoklonalnego Mab5 [20], a w drugim hybryda z lizozymem T4 ( $\beta_2$ AR-T4L) [10]. W obydwu przypadkach miejscem dołączenia białka stabilizującego strukturę receptora była pozostałość po odciętej, bardzo długiej, pętli cytoplazmatycznej IL:III. Druga metoda pozwoliła na określenie pełniejszej struktury  $\beta_2$ AR z lepszą rozdzielczością, równą 2.4 Å (PDB ID: 2RH1) [10]. Niestety, w obu strukturach krystalicznych N- i C-koniec białka są niewidoczne.

Struktury obu receptorów  $\beta_1$ AR oraz  $\beta_2$ AR są do siebie podobne. Położenie helis transmembranowych oraz pętli jest niemal identyczne. Jedyna znacząca różnica widoczna jest w ułożeniu IL:II (Rys. 10.). W strukturze  $\beta_1$ AR pętla ta tworzy krótką helisę zorientowaną prostopadle w stosunku do płaszczyzny błony. Prawdopodobnie pętla ta jest istotnym elementem biorącym udział w procesie aktywacji receptorów adrenergicznych, ponieważ obecna tam reszta Tyr:149 tworzy wiązanie wodorowe z resztą Asp:3.49, pochodzącą z motywu E(D)RY [11]. Natomiast reszta tyrozyny (Tyr:141) na odpowiadającej pozycji w strukturze receptora  $\beta_2$ AR, oddziałuje z Glu:6.30 (Rys. 10.). W obu przypadkach mostek solny pomiędzy helisami III i VI (*ang. „ionic lock”*) jest przerwany, ale nie powoduje to jednak powstania w pełni aktywnej struktury receptora.

Dwa podtypy receptorów adrenergicznych skryształizowano w kompleksach z antagonistą (cyjanopindolol w  $\beta_1$ AR) i agonistą inwersyjnym (karazolol w  $\beta_2$ AR), tak więc struktura receptora nie powinna wykazywać śladów aktywacji. Tym niemniej *ang. „ionic*

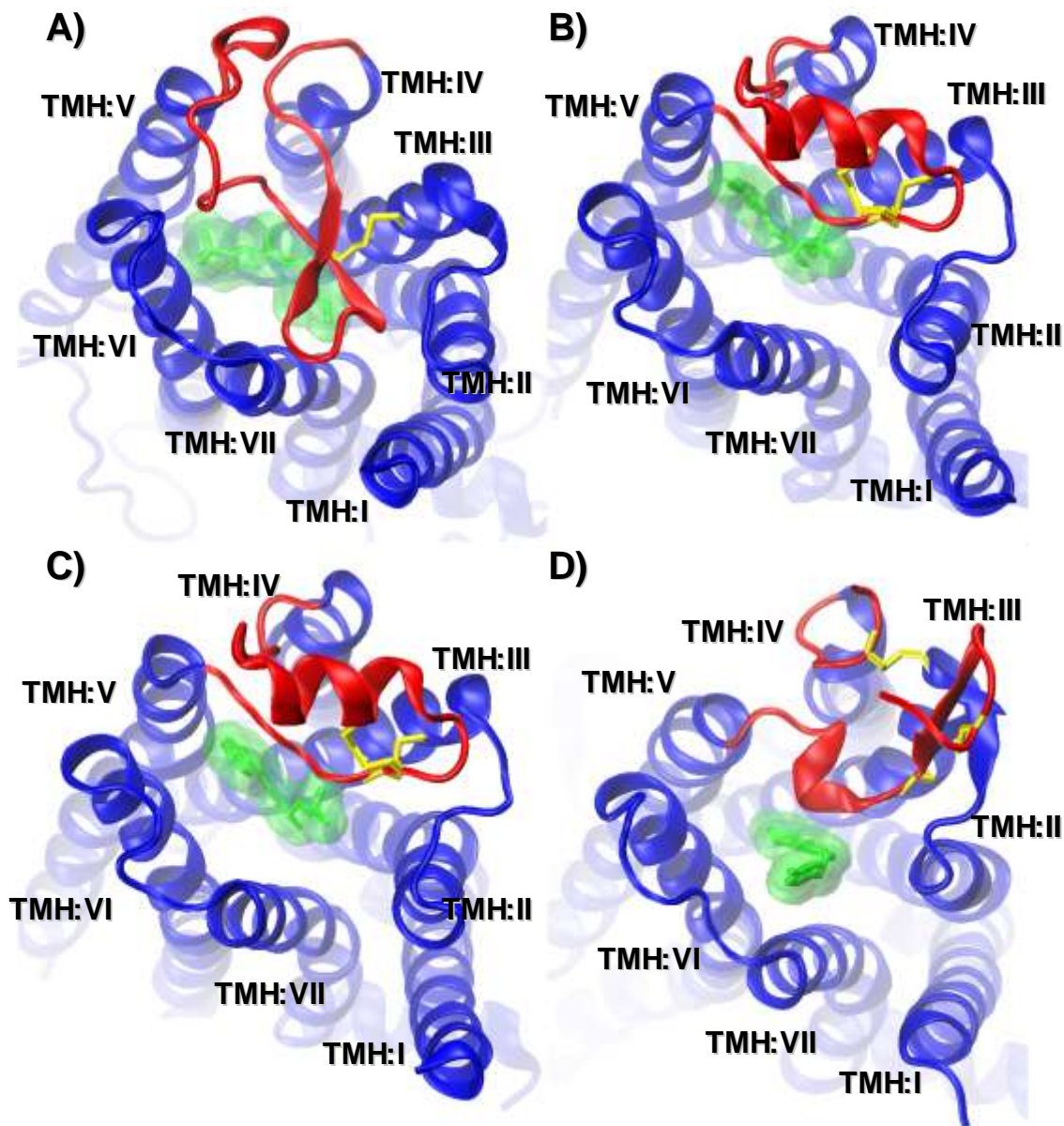
*lock*” jest w stanie otwartym, co może sugerować iż receptory te mogą być w stanie częściowo aktywnym, a same otwarcie „zamka jonowego” może nie być wystarczającym warunkiem do przejścia receptora w stan całkowicie aktywny [19]. Istnieje też druga hipoteza, że taka struktura z otwartym „zamkiem jonowym” może służyć do przekazywania sygnału nie przez białko G, ale przez arestynę [148], bowiem reszta tyrozyny z pętli IL:II, wiążąc się do helis TMH:III lub TMH:VI, blokuje miejsce wiązania białka G.



Rys. 10. A) Nalożenie struktur krystalicznych receptorów:  $\beta_1$ AR (PDB ID: 2VT4, kolor czerwony) oraz  $\beta_2$ AR (PDB ID: 2RH1, kolor niebieski). B) Porównanie ułożenia drugiej pętli wewnątrzkomórkowej (IL:II), miejsce występowania pętli oznaczono zieloną przerywaną linią. Czerwone przerywane linie symbolizują wiązania wodorowe.

Pomimo tego, iż receptory adrenergiczne i rodopsyna należą do tej samej rodziny A, występują w nich pewne różnice strukturalne. W receptorach adrenergicznych helisa TMH:I jest prosta, co skutkuje jej odchyleniem od reszty receptora po stronie zewnątrzkomórkowej. Spowodowane jest to brakiem reszty Pro:1.48 obecnej w strukturze rodopsyny. TMH:IV jest odsunięta od miejsca wiązania liganda, natomiast TMH:V, po stronie zewnątrzkomórkowej, jest nieznacznie przemieszczona do środka receptora. W strukturach krystalicznych receptorów adrenergicznych część cytozolowa TMH:VI jest

również nieznacznie odchylona na zewnątrz receptora w porównaniu do struktury rodopsyny, natomiast część cytozolowa TMH:V przesunięta jest w kierunku TMH:VI.



Rys. 11. Lokalizacja oraz kształt drugiej pętli cytoplazmatycznej (EL:II) łączącej helisy czwartą i piątą (kolor czerwony) w strukturach krystalicznych receptorów: A) rodopsyny, B)  $\beta_1$ AR, C)  $\beta_2$ AR oraz D) receptora  $A_{2A}$  adenosynowego. Kolor zielony oznacza lokalizację wiązanych ligandów w prezentowanych receptorach. Wiązania disulfidowe oznaczono kolorem żółtym. Widok od strony zewnątrzkomórkowej.

Znaczące różnice można również zaobserwować w ułożeniu pętli po obu stronach receptorów  $\beta_1$ AR,  $\beta_2$ AR i rodopsyny. W receptorach adrenergicznych najdłuższa pętla EL:II, przykrywająca miejsce wiązania, przyjmuje strukturę  $\alpha$ -helikalną, w odróżnieniu od  $\beta$ -kartki obecnej w strukturze rodopsyny (Rys. 11.). Oprócz analogicznego wiązania

disulfidowego występującego w rodopsynie pomiędzy Cys:3.25 z TMH:III oraz Cys:187, za stabilizację krótkiej  $\alpha$ -helisy odpowiedzialny jest dodatkowy mostek disulfidowy obecny między resztami cystein na pozycjach 192 i 198 w  $\beta_1$ AR, oraz na pozycjach 184 i 190 w  $\beta_2$ AR (Rys. 11.).

Ligandy widoczne w strukturach receptorów  $\beta_1$ AR,  $\beta_2$ AR, zajmują niemalże identyczną pozycję we wnęce otoczonej przez TMH:II do TMH:VII. Położenie długiej pętli EL:II powyżej helisy TMH:III umożliwia łatwy dostęp ligandów dyfuzyjnych do miejsca wiążącego w strukturach dwóch receptorów adrenergicznych.

#### 1.4.4. Receptor $A_{2A}$ adenozynowy

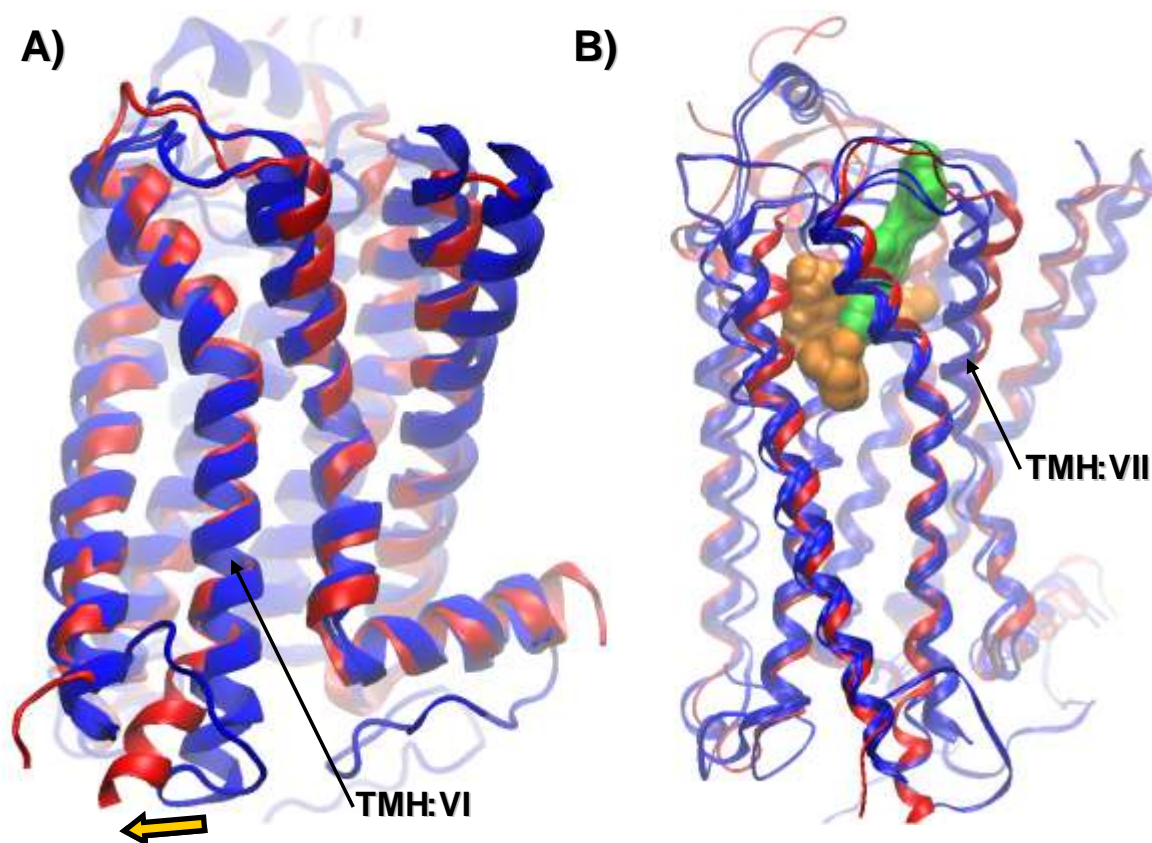
Receptory adenozynowe, podobnie jak receptory adrenergiczne oraz rodopsyna, należą do najliczniejszej rodziny A receptorów GPCR. Istnieją cztery typy receptorów adenozynowych:  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  oraz  $A_3$  [149, 150]. Każdy z tych czterech receptorów zlokalizowany jest w centralnym układzie nerwowym [151, 152]. W odpowiedzi na związanie adenozyny receptory te kontrolują odczuwanie bólu [153], regulują przepływ krwi przez mózg [154], wpływają na sen [155], a także na funkcje oddechowe [156].

W roku 2008 skrytalizowano receptor  $A_{2A}$  adenozynowy i wyznaczono jego strukturę (PDB ID: 3EML) w rozdzielczości 2.6 Å [18]. W procesie krytalizacji białka wykorzystano metodę, zastosowaną już wcześniej do otrzymania struktury receptora  $\beta_2$ AR [10], polegającą na stworzeniu hybrydy receptora z lizozymem T4 [157]. Przedstawiona struktura zawierała receptor ze związanym antagonistą ZM241385 [158].

Ułożenie przestrzenne helis transbłonowych receptora  $A_{2A}$  adenozynowego jest bardzo podobne do wcześniej opisanych struktur receptorów GPCR. W porównaniu do struktury rodopsyny i struktur receptorów  $\beta_1$ AR oraz  $\beta_2$ AR, helisa TMH:VI jest nieznacznie odchylna na zewnątrz receptora w jej części cytoplazmatycznej (Rys. 12.).

Receptor  $A_{2A}$  adenozynowy posiada trzy cechy znacznie odróżniające go od pozostałych struktur receptorów [18]. Po pierwsze, organizacja trzech pętli zewnątrzkomórkowych, od EL:I do EL:III, znacznie odbiega od tych widzianych w strukturach receptorów adrenergicznych oraz w strukturze rodopsyny. Zwłaszcza pętla EL:II nie przyjmuje wyraźnie zdefiniowanej struktury drugorzędowej  $\alpha$ -helisy czy  $\beta$ -kartki (Rys. 11.). Jej konformacja jest stabilizowana przez trzy wiązania disulfidowe, obecne pomiędzy parami cystein: Cys:77 i Cys:166, Cys:77 i Cys:159 oraz Cys:74 i Cys:146 (Rys. 11.). Dodatkowe, czwarte wiązanie disulfidowe jest obecne w trzeciej pętli

zewnątrzkomórkowej, pomiędzy Cys:259 a Cys:262, co powoduje widoczne zakrzywienie łańcucha białkowego w tym obszarze.



Rys. 12. a) Nalozenie struktur receptora A<sub>2A</sub> adenozynowego (kolor czerwony) oraz struktur receptorów β<sub>1</sub>AR i β<sub>2</sub>AR oraz rodopsyny (kolor niebieski). Żółta strzałka wskazuje na przesunięty na zewnątrz białka fragment TMH:VI receptora A<sub>2A</sub> adenozynowego po jego stronie cytozolowej. B) Położenie ligandów w miejscu wiążącym receptorów. Kolor pomarańczowy oznacza położenie ligandów receptorów β<sub>1</sub>AR (cyjanopindololu), β<sub>2</sub>AR (karazololu) oraz rodopsyny (retinalu). Kolor zielony odpowiada położeniu związanego liganda receptora A<sub>2A</sub> adenozynowego (ZM241385).

Po drugie, wiązany antagonist (ZM241385) jest inaczej ulokowany w miejscu wiążącym w porównaniu do miejsc wiązania ligandów w strukturach receptorów adrenergicznych i w strukturze rodopsyny, bowiem ligand ten zorientowany jest prostopadle w stosunku do płaszczyzny błony. Antagonista położony jest wzdłuż helisy TMH:VII, oddziałując jednocześnie z fragmentami EL:II oraz EL:III (Rys. 12.).

Trzecią cechą charakterystyczną tylko dla receptora A<sub>2A</sub> adenozynowego jest lokalizacja wnęki występującej pomiędzy helisami transbłonowymi, która na skutek zmian w położeniu helis (a szczególnie TMH:III) jest przesunięta w stronę TMH:VI i TMH:VII. W wyniku tego wiązany ligand ma ograniczony dostęp do TMH:III oraz TMH:V (Rys. 11.).

W strukturze receptora A<sub>2A</sub> adenozynowego druga pętla cytoplazmatyczna przyjmuje strukturę drugorzędową  $\alpha$ -helikalną [18], wykazując duże podobieństwo do struktury receptora  $\beta_1$ AR. Tyr:112 obecna w pętli IL:II tworzy wiązanie wodorowe z asparaginą (Asp:3.49), będącą częścią dobrze zachowanego motywu E(D)RY. Formowanie  $\alpha$ -helisy w obszarze drugiej pętli cytoplazmatycznej w strukturach receptorów A<sub>2A</sub> adenozynowego oraz  $\beta_1$  adrenergicznego może świadczyć o istotnej roli tego motywu strukturalnego w procesie aktywacji. Obydwa receptory posiadają wysoką aktywność podstawową, tj. możliwość przejścia do formy aktywnej bez obecności związanego agonisty. W odróżnieniu od nich, rodopsyna, nie wykazująca aktywności podstawowej, oraz receptor  $\beta_2$  adrenergiczny, posiadający relatywnie niską aktywność podstawową, nie tworzą struktury  $\alpha$ -helikalnej w obszarze drugiej pętli cytoplazmatycznej

## Literatura

1. Pierce, K.L., R.T. Premont, and R.J. Lefkowitz, *Seven-transmembrane receptors*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(9): p. 639-50.
2. George, S.R., B.F. O'Dowd, and S.P. Lee, *G-protein-coupled receptor oligomerization and its potential for drug discovery*. Nat Rev Drug Discov, 2002. **1**(10): p. 808-20.
3. Horn, F., et al., *GPCRDB information system for G protein-coupled receptors*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(1): p. 294-7.
4. Foord, S.M., et al., *International Union of Pharmacology. XLVI. G protein-coupled receptor list*. Pharmacol Rev, 2005. **57**(2): p. 279-88.
5. Attwood, T.K. and J.B. Findlay, *Fingerprinting G-protein-coupled receptors*. Protein Eng, 1994. **7**(2): p. 195-203.
6. Schioth, H.B. and R. Fredriksson, *The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective*. Gen Comp Endocrinol, 2005. **142**(1-2): p. 94-101.
7. Kristiansen, K., *Molecular mechanisms of ligand binding, signaling, and regulation within the superfamily of G-protein-coupled receptors: molecular modeling and mutagenesis approaches to receptor structure and function*. Pharmacol Ther, 2004. **103**(1): p. 21-80.
8. Palczewski, K., et al., *Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor*. Science, 2000. **289**(5480): p. 739-45.
9. Filipek, S., et al., *G protein-coupled receptor rhodopsin: a prospectus*. Annu Rev Physiol, 2003. **65**: p. 851-79.
10. Cherezov, V., et al., *High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor*. Science, 2007. **318**(5854): p. 1258-65.
11. Warne, T., et al., *Structure of a beta(1)-adrenergic G-protein-coupled receptor*. Nature, 2008.

12. Taira, C.A., et al., *Therapeutic implications of beta-adrenergic receptor pharmacodynamic properties*. *Curr Clin Pharmacol*, 2008. **3**(3): p. 174-84.
13. Trescot, A.M., et al., *Opioid pharmacology*. *Pain Physician*, 2008. **11**(2 Suppl): p. S133-53.
14. Corbett, A.D., et al., *75 years of opioid research: the exciting but vain quest for the Holy Grail*. *Br J Pharmacol*, 2006. **147** Suppl 1: p. S153-62.
15. Davis, M.P., S.B. LeGrand, and R. Lagman, *Look before leaping: combined opioids may not be the rave*. *Support Care Cancer*, 2005. **13**(10): p. 769-74.
16. Park, J.H., et al., *Crystal structure of the ligand-free G-protein-coupled receptor opsin*. *Nature*, 2008. **454**(7201): p. 183-7.
17. Scheerer, P., et al., *Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation*. *Nature*, 2008. **455**(7212): p. 497-502.
18. Jaakola, V.P., et al., *The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist*. *Science*, 2008. **322**(5905): p. 1211-7.
19. Rosenbaum, D.M., et al., *GPCR engineering yields high-resolution structural insights into beta2-adrenergic receptor function*. *Science*, 2007. **318**(5854): p. 1266-73.
20. Rasmussen, S.G., et al., *Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor*. *Nature*, 2007. **450**(7168): p. 383-7.
21. Mirzadegan, T., et al., *Sequence analyses of G-protein-coupled receptors: similarities to rhodopsin*. *Biochemistry*, 2003. **42**(10): p. 2759-2767.
22. Pin, J.P., T. Galvez, and L. Prezeau, *Evolution, structure, and activation mechanism of family 3/C G-protein-coupled receptors*. *Pharmacol Ther*, 2003. **98**(3): p. 325-54.
23. Felder, C.B., et al., *The Venus flytrap of periplasmic binding proteins: an ancient protein module present in multiple drug receptors*. *AAPS PharmSci*, 1999. **1**(2): p. E2.
24. Gether, U., *Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors*. *Endocr Rev*, 2000. **21**(1): p. 90-113.
25. Bohn, L.M., et al., *Mu-opioid receptor desensitization by beta-arrestin-2 determines morphine tolerance but not dependence*. *Nature*, 2000. **408**(6813): p. 720-3.
26. Salom, D., et al., *Crystal structure of a photoactivated deprotonated intermediate of rhodopsin*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(44): p. 16123-8.
27. Kobilka, B.K. and X. Deupi, *Conformational complexity of G-protein-coupled receptors*. *Trends Pharmacol Sci*, 2007. **28**(8): p. 397-406.
28. Spijker, P., et al., *Dynamic behavior of fully solvated beta2-adrenergic receptor, embedded in the membrane with bound agonist or antagonist*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(13): p. 4882-7.
29. Watanabe, Y.S., Y. Fukunishi, and H. Nakamura, *Modelling of third cytoplasmic loop of bovine rhodopsin by multicanonical molecular dynamics*. *J Mol Graph Model*, 2004. **23**(1): p. 59-68.
30. Savarese, T.M. and C.M. Fraser, *In vitro mutagenesis and the search for structure-function relationships among G protein-coupled receptors*. *Biochem J*, 1992. **283** (Pt 1): p. 1-19.
31. Hedin, K.E., K. Duerson, and D.E. Clapham, *Specificity of receptor-G protein interactions: searching for the structure behind the signal*. *Cell Signal*, 1993. **5**(5): p. 505-18.
32. Strader, C.D., et al., *Structure and function of G protein-coupled receptors*. *Annu Rev Biochem*, 1994. **63**: p. 101-32.

33. Wess, J., *G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition*. *Faseb J*, 1997. **11**(5): p. 346-54.
34. Zhang, Z., et al., *How a G protein binds a membrane*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(32): p. 33937-45.
35. Oldham, W.M. and H.E. Hamm, *Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008. **9**(1): p. 60-71.
36. Oldham, W.M. and H.E. Hamm, *How do receptors activate G proteins?* *Adv Protein Chem*, 2007. **74**: p. 67-93.
37. Kenakin, T., *Efficacy at G-protein-coupled receptors*. *Nat Rev Drug Discov*, 2002. **1**(2): p. 103-10.
38. Swaminath, G., et al., *Probing the beta2 adrenoceptor binding site with catechol reveals differences in binding and activation by agonists and partial agonists*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(23): p. 22165-71.
39. Swaminath, G., et al., *Sequential binding of agonists to the beta2 adrenoceptor. Kinetic evidence for intermediate conformational states*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(1): p. 686-91.
40. Kobilka, B., *Agonist binding: a multistep process*. *Mol Pharmacol*, 2004. **65**(5): p. 1060-2.
41. Ghanouni, P., et al., *Functionally different agonists induce distinct conformations in the G protein coupling domain of the beta 2 adrenergic receptor*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(27): p. 24433-6.
42. Mahalingam, M., et al., *Two protonation switches control rhodopsin activation in membranes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(46): p. 17795-800.
43. Bhattacharya, S., S.E. Hall, and N. Vaidehi, *Agonist-induced conformational changes in bovine rhodopsin: insight into activation of G-protein-coupled receptors*. *J Mol Biol*, 2008. **382**(2): p. 539-55.
44. Bhattacharya, S., et al., *Ligand-stabilized conformational states of human beta(2) adrenergic receptor: insight into G-protein-coupled receptor activation*. *Biophys J*, 2008. **94**(6): p. 2027-42.
45. Singh, R., et al., *Activation of the cannabinoid CB1 receptor may involve a W648/F336 rotamer toggle switch*. *J Pept Res*, 2002. **60**(6): p. 357-70.
46. Shi, L., et al., *Beta2 adrenergic receptor activation. Modulation of the proline kink in transmembrane 6 by a rotamer toggle switch*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(43): p. 40989-96.
47. Kim, J.M., et al., *Structural origins of constitutive activation in rhodopsin: Role of the K296/E113 salt bridge*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(34): p. 12508-13.
48. Porter, J.E., J. Hwa, and D.M. Perez, *Activation of the alpha1b-adrenergic receptor is initiated by disruption of an interhelical salt bridge constraint*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(45): p. 28318-23.
49. Fritze, O., et al., *Role of the conserved NPxxY(x)5,6F motif in the rhodopsin ground state and during activation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(5): p. 2290-5.
50. Frauenfelder, H., S.G. Sligar, and P.G. Wolynes, *The energy landscapes and motions of proteins*. *Science*, 1991. **254**(5038): p. 1598-603.
51. Nie, J. and D.L. Lewis, *Structural domains of the CB1 cannabinoid receptor that contribute to constitutive activity and G-protein sequestration*. *J Neurosci*, 2001. **21**(22): p. 8758-64.
52. Kudo, M., et al., *Transmembrane regions V and VI of the human luteinizing hormone receptor are required for constitutive activation by a mutation in the third intracellular loop*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(37): p. 22470-8.



53. Nikiforovich, G.V., et al., *Molecular mechanisms of constitutive activity: mutations at position 111 of the angiotensin AT1 receptor*. J Pept Res, 2005. **66**(5): p. 236-48.
54. Han, M., S.O. Smith, and T.P. Sakmar, *Constitutive activation of opsin by mutation of methionine 257 on transmembrane helix 6*. Biochemistry, 1998. **37**(22): p. 8253-61.
55. Egan, C., K. Herrick-Davis, and M. Teitler, *Creation of a constitutively activated state of the 5-HT2A receptor by site-directed mutagenesis: revelation of inverse agonist activity of antagonists*. Ann N Y Acad Sci, 1998. **861**: p. 136-9.
56. Alewijnse, A.E., et al., *The effect of mutations in the DRY motif on the constitutive activity and structural instability of the histamine H(2) receptor*. Mol Pharmacol, 2000. **57**(5): p. 890-8.
57. Huang, P., et al., *Functional role of a conserved motif in TM6 of the rat mu opioid receptor: constitutively active and inactive receptors result from substitutions of Thr6.34(279) with Lys and Asp*. Biochemistry, 2001. **40**(45): p. 13501-9.
58. Gao, Y., et al., *Generation of a constitutively active mutant of human GPR48/LGR4, a G-protein-coupled receptor*. Hokkaido Igaku Zasshi, 2006. **81**(2): p. 101-5, 107, 109.
59. Mukherjee, R.S., et al., *Point mutations in either subunit of the GABAB receptor confer constitutive activity to the heterodimer*. Mol Pharmacol, 2006. **70**(4): p. 1406-13.
60. Ghanouni, P., et al., *Agonist-induced conformational changes in the G-protein-coupling domain of the beta 2 adrenergic receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(11): p. 5997-6002.
61. Brownstein, M.J., *A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(12): p. 5391-3.
62. Pert, C.B. and S.H. Snyder, *Opiate receptor: demonstration in nervous tissue*. Science, 1973. **179**(77): p. 1011-4.
63. Simon, E.J., J.M. Hiller, and I. Edelman, *Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic (3H) Etorphine to rat-brain homogenate*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1973. **70**(7): p. 1947-9.
64. Terenius, L., *Stereospecific interaction between narcotic analgesics and a synaptic plasma membrane fraction of rat cerebral cortex*. Acta Pharmacol Toxicol (Copenh), 1973. **32**(3): p. 317-20.
65. Lord, J.A., et al., *Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors*. Nature, 1977. **267**(5611): p. 495-9.
66. Kosterlitz, H.W., S.J. Paterson, and L.E. Robson, *Characterization of the kappa-subtype of the opiate receptor in the guinea-pig brain*. Br J Pharmacol, 1981. **73**(4): p. 939-49.
67. Yasuda, K., et al., *Cloning and functional comparison of kappa and delta opioid receptors from mouse brain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(14): p. 6736-40.
68. Raynor, K., et al., *Characterization of the cloned human mu opioid receptor*. J Pharmacol Exp Ther, 1995. **272**(1): p. 423-8.
69. Raynor, K., et al., *Pharmacological characterization of the cloned kappa-, delta-, and mu-opioid receptors*. Mol Pharmacol, 1994. **45**(2): p. 330-4.
70. Lai, J., et al., *Pharmacological characterization of the cloned kappa opioid receptor as a kappa 1b subtype*. Neuroreport, 1994. **5**(16): p. 2161-4.
71. Ammer, H. and R. Schulz, *Stable expression and functional characterization of the cloned rat mu-opioid receptor in human epidermoid carcinoma (A431) cells*. Zentralbl Veterinarmed A, 1996. **43**(4): p. 193-200.

72. Evans, C.J., et al., *Cloning of a delta opioid receptor by functional expression*. Science, 1992. **258**(5090): p. 1952-5.
73. Kieffer, B.L., et al., *The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(24): p. 12048-52.
74. Przewlocki, R. and B. Przewlocka, *Opioids in chronic pain*. Eur J Pharmacol, 2001. **429**(1-3): p. 79-91.
75. Chen, X., et al., *Altered gating of opiate receptor-modulated K<sup>+</sup> channels on amygdala neurons of morphine-dependent rats*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(26): p. 14692-6.
76. Mihara, S. and R.A. North, *Opioids increase potassium conductance in submucous neurones of guinea-pig caecum by activating delta-receptors*. Br J Pharmacol, 1986. **88**(2): p. 315-22.
77. Muller, W., S. Hallermann, and D. Swandulla, *Opioidergic modulation of voltage-activated K<sup>+</sup> currents in magnocellular neurons of the supraoptic nucleus in rat*. J Neurophysiol, 1999. **81**(4): p. 1617-25.
78. Margolis, E.B., et al., *Kappa-opioid agonists directly inhibit midbrain dopaminergic neurons*. J Neurosci, 2003. **23**(31): p. 9981-6.
79. Raith, K. and G. Hochhaus, *Drugs used in the treatment of opioid tolerance and physical dependence: a review*. Int J Clin Pharmacol Ther, 2004. **42**(4): p. 191-203.
80. Zhang, Y., et al., *Effect of the endogenous kappa opioid agonist dynorphin A(1-17) on cocaine-evoked increases in striatal dopamine levels and cocaine-induced place preference in C57BL/6J mice*. Psychopharmacology (Berl), 2004. **172**(4): p. 422-9.
81. Dhawan, B.N., et al., *International Union of Pharmacology. XII. Classification of opioid receptors*. Pharmacol Rev, 1996. **48**(4): p. 567-92.
82. Meunier, J.C., et al., *Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor*. Nature, 1995. **377**(6549): p. 532-5.
83. Henderson, G. and A.T. McKnight, *The orphan opioid receptor and its endogenous ligand--nociceptin/orphanin FQ*. Trends Pharmacol Sci, 1997. **18**(8): p. 293-300.
84. Reinscheid, R.K., et al., *Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor*. Science, 1995. **270**(5237): p. 792-4.
85. Gupta, A., F.M. Decaillot, and L.A. Devi, *Targeting opioid receptor heterodimers: Strategies for screening and drug development*. AAPS Journal, 2006. **8**(1): p. E153-E159.
86. Jordan, B.A. and L.A. Devi, *G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function*. Nature, 1999. **399**(6737): p. 697-700.
87. Lunzer, M.M. and P.S. Portoghese, *Selectivity of delta- and kappa-opioid ligands depends on the route of central administration in mice*. J Pharmacol Exp Ther, 2007. **322**(1): p. 166-71.
88. Chaturvedi, K., et al., *Structure and regulation of opioid receptors*. Biopolymers, 2000. **55**(4): p. 334-46.
89. Law, P.Y. and H.H. Loh, *Regulation of opioid receptor activities*. J Pharmacol Exp Ther, 1999. **289**(2): p. 607-24.
90. Chavkin, C., J.P. McLaughlin, and J.P. Cerver, *Regulation of opioid receptor function by chronic agonist exposure: constitutive activity and desensitization*. Mol Pharmacol, 2001. **60**(1): p. 20-5.
91. Li, J.G., et al., *ASP147 in the third transmembrane helix of the rat mu opioid receptor forms ion-pairing with morphine and naltrexone*. Life Sci, 1999. **65**(2): p. 175-85.

92. Befort, K., et al., *Constitutive activation of the delta opioid receptor by mutations in transmembrane domains III and VII*. J Biol Chem, 1999. **274**(26): p. 18574-81.
93. Meng, F., et al., *Creating a functional opioid alkaloid binding site in the orphanin FQ receptor through site-directed mutagenesis*. Mol Pharmacol, 1998. **53**(4): p. 772-7.
94. Bot, G., et al., *Mutagenesis of a single amino acid in the rat mu-opioid receptor discriminates ligand binding*. J Neurochem, 1998. **70**(1): p. 358-65.
95. Bot, G., et al., *Mutagenesis of the mouse delta opioid receptor converts (-)-buprenorphine from a partial agonist to an antagonist*. J Pharmacol Exp Ther, 1998. **284**(1): p. 283-90.
96. Spivak, C.E., et al., *Naloxone activation of mu-opioid receptors mutated at a histidine residue lining the opioid binding cavity*. Mol Pharmacol, 1997. **52**(6): p. 983-92.
97. Mansour, A., et al., *Key residues defining the mu-opioid receptor binding pocket: a site-directed mutagenesis study*. J Neurochem, 1997. **68**(1): p. 344-53.
98. Befort, K., et al., *Role of aromatic transmembrane residues of the delta-opioid receptor in ligand recognition*. J Biol Chem, 1996. **271**(17): p. 10161-8.
99. Befort, K., et al., *The conserved aspartate residue in the third putative transmembrane domain of the delta-opioid receptor is not the anionic counterpart for cationic opiate binding but is a constituent of the receptor binding site*. Mol Pharmacol, 1996. **49**(2): p. 216-23.
100. Surratt, C.K., et al., *-mu opiate receptor. Charged transmembrane domain amino acids are critical for agonist recognition and intrinsic activity*. J Biol Chem, 1994. **269**(32): p. 20548-53.
101. Ballesteros JA and W. H., *Integrated methods for the construction of three-dimensional models and computational probing of structure-function relations in G protein-coupled receptors*. Methods Neurosci, 1995. **25**: p. 366-428.
102. Fowler, C.B., et al., *Refinement of a homology model of the mu-opioid receptor using distance constraints from intrinsic and engineered zinc-binding sites*. Biochemistry, 2004. **43**(27): p. 8700-10.
103. Childers, S.R., et al., *Opiate receptor binding affected differentially by opiates and opioid peptides*. Eur J Pharmacol, 1979. **55**(1): p. 11-8.
104. Cox, B.M., *Endogenous opioid peptides: a guide to structures and terminology*. Life Sci, 1982. **31**(16-17): p. 1645-58.
105. Okada, Y., et al., *Endomorphins and related opioid peptides*. Vitam Horm, 2002. **65**: p. 257-79.
106. Ling, N., R. Burgus, and R. Guillemin, *Isolation, primary structure, and synthesis of alpha-endorphin and gamma-endorphin, two peptides of hypothalamic-hypophysial origin with morphinomimetic activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1976. **73**(11): p. 3942-6.
107. Chang, A.C., M. Cochet, and S.N. Cohen, *Structural organization of human genomic DNA encoding the pro-opiomelanocortin peptide*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980. **77**(8): p. 4890-4.
108. Noda, M., et al., *Isolation and structural organization of the human preproenkephalin gene*. Nature, 1982. **297**(5865): p. 431-4.
109. Schwyzler, R., *ACTH: a short introductory review*. Ann N Y Acad Sci, 1977. **297**: p. 3-26.
110. Chavkin, C. and A. Goldstein, *Specific receptor for the opioid peptide dynorphin: structure--activity relationships*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(10): p. 6543-7.

111. Takemori, A.E. and P.S. Portoghese, *Selective naltrexone-derived opioid receptor antagonists*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1992. **32**: p. 239-69.
112. Portoghese, P.S., et al., *A highly selective delta 1-opioid receptor antagonist: 7-benzylidenenaltrexone*. *Eur J Pharmacol*, 1992. **218**(1): p. 195-6.
113. Takemori, A.E., et al., *Agonist and antagonist activities of ligands derived from naltrexone and oxymorphone*. *Life Sci*, 1992. **50**(20): p. 1491-5.
114. Portoghese, P.S., M. Sultana, and A.E. Takemori, *Design of peptidomimetic delta opioid receptor antagonists using the message-address concept*. *J Med Chem*, 1990. **33**(6): p. 1714-20.
115. Caffrey, M., *Membrane protein crystallization*. *J Struct Biol*, 2003. **142**(1): p. 108-32.
116. Hunte, C. and H. Michel, *Crystallisation of membrane proteins mediated by antibody fragments*. *Curr Opin Struct Biol*, 2002. **12**(4): p. 503-8.
117. Gether, U., et al., *Structural instability of a constitutively active G protein-coupled receptor. Agonist-independent activation due to conformational flexibility*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(5): p. 2587-90.
118. Standfuss, J., et al., *Crystal structure of a thermally stable rhodopsin mutant*. *J Mol Biol*, 2007. **372**(5): p. 1179-88.
119. Murakami, M. and T. Kouyama, *Crystal structure of squid rhodopsin*. *Nature*, 2008. **453**(7193): p. 363-7.
120. Shimamura, T., et al., *Crystal structure of squid rhodopsin with intracellularly extended cytoplasmic region*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(26): p. 17753-6.
121. Okada, T., et al., *Functional role of internal water molecules in rhodopsin revealed by X-ray crystallography*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(9): p. 5982-7.
122. Okada, T., et al., *The retinal conformation and its environment in rhodopsin in light of a new 2.2 Å crystal structure*. *J Mol Biol*, 2004. **342**(2): p. 571-83.
123. Li, J., et al., *Structure of bovine rhodopsin in a trigonal crystal form*. *J Mol Biol*, 2004. **343**(5): p. 1409-38.
124. Fotiadis, D., et al., *Atomic-force microscopy: Rhodopsin dimers in native disc membranes*. *Nature*, 2003. **421**(6919): p. 127-8.
125. Filipek, S., et al., *A concept for G protein activation by G protein-coupled receptor dimers: the transducin/rhodopsin interface*. *Photochem Photobiol Sci*, 2004. **3**(6): p. 628-38.
126. Fotiadis, D., et al., *The G protein-coupled receptor rhodopsin in the native membrane*. *FEBS Lett*, 2004. **564**(3): p. 281-8.
127. Suda, K., et al., *The supramolecular structure of the GPCR rhodopsin in solution and native disc membranes*. *Mol Membr Biol*, 2004. **21**(6): p. 435-46.
128. Filipek, S., et al., *The crystallographic model of rhodopsin and its use in studies of other G protein-coupled receptors*. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 2003. **32**: p. 375-97.
129. Liang, Y., et al., *Organization of the G protein-coupled receptors rhodopsin and opsin in native membranes*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(24): p. 21655-62.
130. Filipek, S., *Organization of rhodopsin molecules in native membranes of rod cells--an old theoretical model compared to new experimental data*. *J Mol Model*, 2005. **11**(4-5): p. 385-91.
131. Park, P.S., et al., *Stabilizing effect of Zn<sup>2+</sup> in native bovine rhodopsin*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(15): p. 11377-85.
132. Okada, T. and K. Palczewski, *Crystal structure of rhodopsin: implications for vision and beyond*. *Curr Opin Struct Biol*, 2001. **11**(4): p. 420-6.

133. Jang, G.F., et al., *Mechanism of rhodopsin activation as examined with ring-constrained retinal analogs and the crystal structure of the ground state protein*. J Biol Chem, 2001. **276**(28): p. 26148-53.
134. Janz, J.M. and D.L. Farrens, *Role of the retinal hydrogen bond network in rhodopsin Schiff base stability and hydrolysis*. J Biol Chem, 2004. **279**(53): p. 55886-94.
135. Grobner, G., et al., *Observations of light-induced structural changes of retinal within rhodopsin*. Nature, 2000. **405**(6788): p. 810-3.
136. Bourne, H.R. and E.C. Meng, *Structure. Rhodopsin sees the light*. Science, 2000. **289**(5480): p. 733-4.
137. Rovati, G.E., V. Capra, and R.R. Neubig, *The highly conserved DRY motif of class A G protein-coupled receptors: beyond the ground state*. Mol Pharmacol, 2007. **71**(4): p. 959-64.
138. Knierim, B., et al., *Sequence of late molecular events in the activation of rhodopsin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(51): p. 20290-5.
139. Okada, T., et al., *Activation of rhodopsin: new insights from structural and biochemical studies*. Trends Biochem Sci, 2001. **26**(5): p. 318-24.
140. Modzelewska, A., et al., *Arrestin interaction with rhodopsin: conceptual models*. Cell Biochem Biophys, 2006. **46**(1): p. 1-15.
141. Liang, Y., et al., *Rhodopsin signaling and organization in heterozygote rhodopsin knockout mice*. J Biol Chem, 2004. **279**(46): p. 48189-96.
142. Vogel, R. and F. Siebert, *Conformations of the active and inactive states of opsin*. J Biol Chem, 2001. **276**(42): p. 38487-93.
143. Sheikh, S.P., et al., *Rhodopsin activation blocked by metal-ion-binding sites linking transmembrane helices C and F*. Nature, 1996. **383**(6598): p. 347-50.
144. Farrens, D.L., et al., *Requirement of rigid-body motion of transmembrane helices for light activation of rhodopsin*. Science, 1996. **274**(5288): p. 768-70.
145. Small, K.M., D.W. McGraw, and S.B. Liggett, *Pharmacology and physiology of human adrenergic receptor polymorphisms*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2003. **43**: p. 381-411.
146. Milligan, G., P. Svoboda, and C.M. Brown, *Why are there so many adrenoceptor subtypes?* Biochem Pharmacol, 1994. **48**(6): p. 1059-71.
147. Serrano-Vega, M.J., et al., *Conformational thermostabilization of the beta1-adrenergic receptor in a detergent-resistant form*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(3): p. 877-82.
148. Audet, M. and M. Bouvier, *Insights into signaling from the beta2-adrenergic receptor structure*. Nat Chem Biol, 2008. **4**(7): p. 397-403.
149. Fredholm, B.B., et al., *Actions of adenosine at its receptors in the CNS: insights from knockouts and drugs*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2005. **45**: p. 385-412.
150. Fredholm, B.B., et al., *International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors*. Pharmacol Rev, 2001. **53**(4): p. 527-52.
151. Jacobson, K.A. and Z.G. Gao, *Adenosine receptors as therapeutic targets*. Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(3): p. 247-64.
152. Dunwiddie, T.V. and S.A. Masino, *The role and regulation of adenosine in the central nervous system*. Annu Rev Neurosci, 2001. **24**: p. 31-55.
153. Sawynok, J. and X.J. Liu, *Adenosine in the spinal cord and periphery: release and regulation of pain*. Prog Neurobiol, 2003. **69**(5): p. 313-40.
154. Shi, Y., et al., *Interaction of mechanisms involving epoxyeicosatrienoic acids, adenosine receptors, and metabotropic glutamate receptors in neurovascular*

- coupling in rat whisker barrel cortex*. J Cereb Blood Flow Metab, 2008. **28**(1): p. 111-25.
155. Basheer, R., et al., *Adenosine and sleep-wake regulation*. Prog Neurobiol, 2004. **73**(6): p. 379-96.
156. Lahiri, S., et al., *Purines, the carotid body and respiration*. Respir Physiol Neurobiol, 2007. **157**(1): p. 123-9.
157. Engel, C.K., L. Chen, and G.G. Prive, *Insertion of carrier proteins into hydrophilic loops of the Escherichia coli lactose permease*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1564**(1): p. 38-46.
158. Ongini, E., et al., *Comparison of CGS 15943, ZM 241385 and SCH 58261 as antagonists at human adenosine receptors*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1999. **359**(1): p. 7-10.