

DOI: 10.13376/j.cbls/2015058

文章编号: 1004-0374(2015)04-0445-08

G蛋白偶联受体的结构与功能研究进展

程建昕, 唐 赟*

(华东理工大学药学院上海市新药设计重点实验室, 上海 200237)

摘要: G 蛋白偶联受体 (GPCR) 是一类具有七个跨膜螺旋结构的超家族, 参与机体内许多重要的生物学信号转导过程, 其功能异常将引起一系列疾病的发生, 因而是一类十分重要的药物作用靶标。近几年来, 研究人员在 GPCR 的三维结构测定方面取得了一系列重要的研究进展, 这些突破性成就不仅将 GPCR 家族各亚型及成员的基本结构特征清晰地呈现给人们, 也促使人们对它们的功能展开了新一轮广泛而深入的探索。这为基于结构的药物设计, 如具有功能选择性的变构调节剂等新型配体的设计, 提供了大量重要的信息。现对最近两年在 GPCR 结构和功能研究方面所取得的重要进展进行综述, 并对基于 GPCR 结构的药物设计及进一步研究进行了展望。

关键词: G 蛋白偶联受体; 药物作用靶标; 药物设计; 功能选择性; 变构调节剂

中图分类号: Q753; R977.6 **文献标志码:** A

Research advances in structures and functions of G protein-coupled receptors

CHENG Jian-Xin, TANG Yun*

(Shanghai Key Laboratory of New Drug Design, School of Pharmacy,
East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: G protein-coupled receptors (GPCR) are a family of proteins containing seven transmembrane helices, which participate in response to a wide range of intracellular signaling transduction. Because the dysfunction of GPCR will cause a series of disorders or diseases, they are extremely important drug targets. In recent years, a series of big advances in the determination of three-dimensional structures of GPCR has been made. These breakthroughs not only allow to clearly understand the basic structural characteristics of each GPCR subtype and individual members, but also prompt to launch a new round of broad and in-depth exploration on GPCR functions. All above-mentioned progresses greatly facilitate drug design based on GPCR structures, such as the design of new types of ligands with functional selectivity like allosteric modulators. In this review, we mainly summarized important advances achieved in aspects of GPCR structures and functions in recent two years. GPCR structure-based drug design and further research prospects were also reviewed.

Key words: G protein-coupled receptors; drug target; drug design; functional selectivity; allosteric modulator

1 GPCR概述

G 蛋白偶联受体 (GPCR) 是一类具有 7 个跨膜螺旋 (7TM) 的膜蛋白, 是细胞信号转导的起点。据估计, 该类蛋白在人体有超过 800 个成员^[1], 是很庞大的一个家族, 其影响涉及心血管疾病、神经系统疾病、代谢性疾病、癌症等多种类型疾病。在已确认的约 500 个药物靶标中^[2], 绝大多数属于 GPCR 家族成员, 因而 GPCR 是最大的药物作用靶

标家族。正是由于 GPCR 的作用广泛而巨大, 从其被发现开始就一直是人们的研究热点。近年来, 基于信号转导通路的 GPCR 新靶标确认^[3-4]及偏向 (biased) 信号转导机制^[5]等方面的研究更是进展快速。

GPCR 的低丰度、难纯化结晶等膜蛋白特性,

收稿日期: 2014-10-24; 修回日期: 2014-12-05

基金项目: 中央高校基本科研业务费(WY1113007)

*通信作者: E-mail: ytang234@ecust.edu.cn

给 X 射线技术的应用带来了诸多不便。2000 年, Palczewski 等^[6]测定的牛视紫红质晶体结构是最早被解析的 G 蛋白偶联受体, 它的出现刷新了用脂立方技术 (lipidic cubic phases) 得到细菌视紫红质晶体结构^[7]所带给人们的那份喜悦。略有遗憾的是, Palczewski 等在解析技术方面并未再取得突破。直到 2007 年, Cherezov 等^[8]通过插入溶菌酶和抗体等一系列新手段改进了 GPCR 的结晶技术, 从而开创了 GPCR 结构生物学研究的新局面。因此, Kobilka 和 Lefkowitz 分享了 2012 年诺贝尔化学奖。当然, 他们的获奖不仅仅是因为在 GPCR 结晶技术上的突破, 更是因为他们发现了 GPCR 以及后续长时间潜心研究所取得的系列成就。近几年来, 在 GPCR 结构和功能研究方面, 研究人员相继取得了丰硕成果, 数量之多, 分量之大, 前所未有^[9-11]。

当前, 在 GPCR 的配体发现中, 具有功能选择性 (functional selectivity) 的偏向性配体 (biased ligand) 和变构调节剂 (allosteric modulator) 是比较热门的方向, 这些新型配体的结合位点有别于传统的跨膜结合口袋, 针对这些配体进行研究将有助于突破作用于传统结合部位的正位配体 (orthosteric ligand), 以及人们对 GPCR 作用机制认识的局限性^[12-15]。为了增加配体选择性或亲和力, 人们已经开发了新的策略, 如设计单次跨膜配体 (bitopic ligand) 等新型配体^[16-18]。另外, 非 A 类 GPCR 在结构测定方面都有一些突破, 针对这些靶标进行药物设计也具有很好的前景^[19]。本课题组密切关注 GPCR 结构与功能研究方面所取得的各种重要进展, 本文主要针对最近两年在这些方面的重要成果进行综述, 并对基于 GPCR 结构的药物设计及进一步研究进行了展望。

2 GPCR 结构研究进展

截至 2013 年, GPCR 的晶体结构已经覆盖 A、B 和卷曲型三类^[20], 像阿片受体各亚型已经实现了全覆盖^[20]。2014 年, 研究人员再次取得突破, 获得了 C 类 GRM1 和 GRM5 蛋白的晶体结构^[21-22]。这样一共获得了十几个小亚类的晶体结构 (图 1), 透过这些晶体结构可以清晰分辨它们的共同特征及各成员的独特形态等^[1,23]。一些激活态的晶体结构和相应的生物物理学研究呈现了 GPCR 在激活机制方面一些关键共性, 包括螺旋的剧烈运动、保守区侧链微开关和在 Na^+ 水簇中有潜在的重排等。不同的配体介导细胞内侧不同的构象变化, 结构独特的配体所触发的优势构象可有助于解释偏差信号

象和功能反应。

通过高分辨率的晶体结构研究, GPCR 中由 Na 离子介导的变构调节口袋被清晰地展示出来, 这对相应受体及整个 GPCR 的作用机制研究无疑是一重大发现。Na 离子介导的变构调节口袋最早是由 Liu 等^[24]在 2012 年用 BRIL 蛋白突破了高分辨率结晶技术后对 A2A 的结构测定中得到的, 目前这一工作已被引用 100 多次, 可见其意义重大。2014 年, Fenalti 等^[25]从 δ 阿片受体的高分辨率晶体结构中也解析了这一变构调节口袋, 并通过点突变实验对其作用机制进行了深入的探索, 进一步揭示了一些与偏向信号转导相关的残基信息。

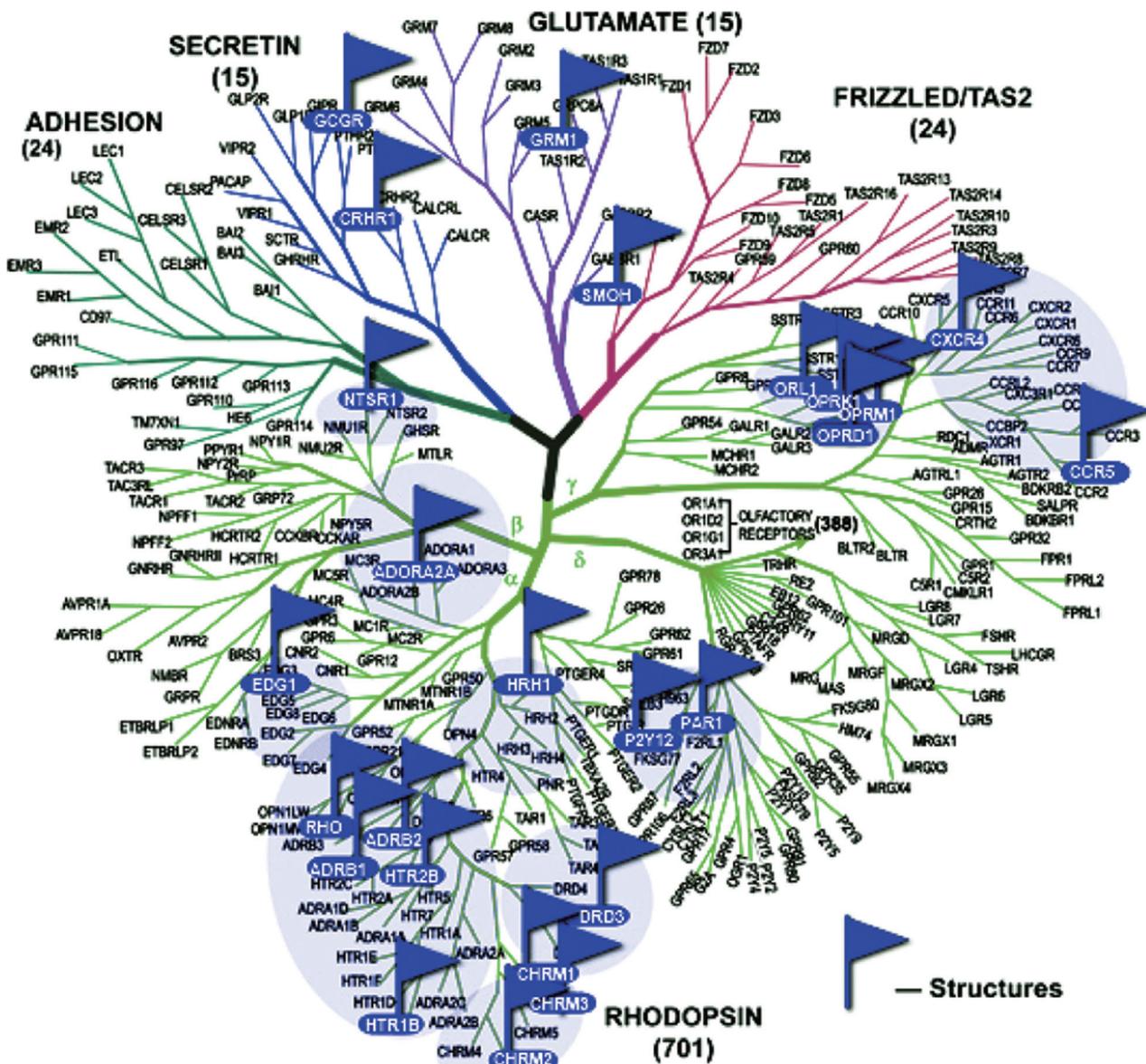
5-羟色胺受体与学习、情绪和睡眠有关, 是肥胖、抑郁和偏头痛药物的靶标。针对 5-羟色胺受体的晶体结构解析, 科学家在脂肪凝胶中制备该受体的结晶^[27-28]。他们利用新型注射系统, 使凝胶进入 LCLS (linac coherent light source) X 射线脉冲的路径, 以收集蛋白质的结构信息。这一方法解决了 GPCR 研究中的最大障碍: 传统 X 射线研究使用同步加速器, 需要较大的结晶体, 而 GPCR 很难达到这样的尺寸。由于 LCLS 比最强力的同步加速器还明亮百万倍, 还支持超快的成像, 研究人员可以通过这一技术分析微小结晶并立即收集数据。LCLS 成像时射线还来不及造成伤害, 因此, 样品不需要进行冰冻, 可以在更天然的状态下检测。用同步加速器研究, 往往要耗费很长时间才能获得难生晶蛋白质的大晶体。之后, 还需要几个月的时间来优化结晶, 收集足够的结构数据。而 LCLS 技术能解析更小的结晶, 可以在几天的时间内完成结构分析。

中国科学院上海药物研究所吴蓓丽研究员课题组在 GPCR 晶体解析方面也做出了重要贡献, 先后于 2010 年和 2013 年测定了 CXCR4 和 CCR5 的三维晶体结构^[29-30], 这些结构为深入理解 HIV-1 病毒感染人体细胞的分子机制, 以及这两种受体与其天然配体的相互作用模式提供了新的线索, 并有助于新型抗 HIV-1 病毒感染药物的研发。2014 年, 该课题组再次亮剑, 短期内先后报道了抗血栓药物靶标 P2Y₁₂ 受体的两种不同状态的晶体结构^[31-32], 这又是对抗血栓药物作用机制研究方面做出的重要贡献。

3 GPCR 功能研究进展

3.1 GPCR 的激活态、多聚体等构象存在状态研究

目前, 研究人员已经报道了单独 GPCR 激活态的晶体结构不少于 4 个、GPCR 与 G 蛋白结合的信



GPCR家族进化树的构建是基于7个跨膜结构域不同层次的同源性。GPCR成员可分以下几类：视紫红质类(A类)、分泌素和黏素类(B类)、代谢型谷氨酸类(C类)，以及卷曲型/TAS2类。视紫红质类又分为4个亚组： α 组、 β 组、 γ 组和 δ 组。视紫红质类 δ 组中的嗅觉受体包括388个受体(这里只显示了4种亚型)，是GPCR中规模最独特的集群。蓝旗代表已获得晶体结构的成员。

图1 GPCR家族进化树、分类及已获得晶体结构的成员^[26]

号转导构象不少于1个及与 $G\alpha$ 亚基相结合的活化构象多个等，这些构象已经揭示了一些与GPCR激活密切相关的信息^[23]。当然，对于GPCR复杂的信号转导通路来说，这些构象还是远远不够的。

分子动力学方法已经展现了其在蛋白质动态性质考察方面的各种优势，面对越来越多的高分辨率晶体结构，人们已经不满足于较长时间的动力学模拟。最近，为了得到 $\beta 2$ -肾上腺素受体($\beta 2AR$)在“开”和“关”两个状态切换中的所有中间状态来指导科学家开发更有效的药物，斯坦福大学和谷歌公司研

究人员共同运用马尔科夫状态模型(MSMs)原理开发了原子水平模拟受体三维结构变化的方法，首次利用谷歌云计算平台分析大数据，仿真了 $\beta 2AR$ 从“开”到“关”毫秒内所有中间态的结构变化^[33]。其中，MSMs方法已经应用于RNA聚合酶等体系的长时间动力学模拟^[34]。

多聚体是GPCR的一种广泛存在形式，人们也在运用动力学手段来展开机制探索^[35]。其中，MARTINI力场便是一个针对GPCR多聚体模拟而设计的力场，通过建立MARTINI粗粒度(CG)模型

来代表多聚大分子, 然后通过有差别动力学参数来模拟多聚体界面及相互作用体系的动态变化。

3.2 GPCR的信号转导通路研究

前面已经介绍了 GPCR 靶标的重要性, 说到底其重要性还是体现在信号转导通路上, 也就是说, GPCR 信号通路是目前细胞内最重要的信号通路。目前的研究认为, GPCR 介导及调控生理功能主要经由两条途径: G 蛋白途径和 β -Arrestin 途径^[36]。传统的 GPCR 激动剂与受体结合后, 激活 G 蛋白信号途径, 包括钙离子等第二信使系统、腺苷酸环化酶 (adenyl cyclase, AC)、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPK) 等。针对 G 蛋白介导的信号通路研究目前依旧是重要方向。之前, GPCR 信号通路的检测通常采用定量的方法, 新成果显示通过引入 GPCR 信号通路中的第二信使染料, 结合成像技术可以获得很多细胞表型方面的数据。第二信使的释放是比较快速的过程, 因此, 需要结合使用自动加样器。采用成角度的加样头后, 可以有效避免对贴壁细胞的损伤。另外, 通过监控 CO_2/O_2 变化可以实现对细胞的实时检测, 配合 Gen5 软件中的动力学检测模式, 人们便可以更好地检测第二信使水平变化。

而 β -Arrestin 途径则主要由 β -Arrestin 偏向性配体激活。近来的研究发现, β -Arrestin 不仅可阻断 G 蛋白的信号转导, 还在 GPCR 的脱敏、内化、复敏以及细胞增殖反应和基因转录中起重要作用^[37]。最早的偏向激动现象 (biased agonism) 是在毒蕈碱样胆碱受体激动剂的实验过程中发现的^[38-39], 虽然这类配体也表现为激动剂的效应, 与其 G 蛋白信号强度不平行。一种代号为 AF102B 的激动剂, 虽能增加 Gq 蛋白偶联的磷脂酸 C 的浓度, 但并未导致 Gs 蛋白偶联的 cAMP 浓度发生变化。近些年, 这种 β -Arrestin 偏向性配体也被大量报道^[40]。

因为 β -Arrestin 蛋白的柔性比较大, 尤其是激活态的, 针对其进行的晶体结构解析同样是一项很有意义的工作。从 2001 年第一个 β -Arrestin 蛋白被测定后^[41], 陆续又有 7 个结构被报道^[11], 其中 β -Arrestin-2 (Arrestin-3) 仅有 1 个^[42], 其他均为 β -Arrestin-1。在这些晶体结构中, 最引人注目的无疑是 2013 年 Shukla 等^[43]报道的激活态的 β -Arrestin-1 晶体结构。他们采用抗原结合片段 (Fab30) 稳定 β -Arrestin 构象柔性的方法, 解析了与人源 V2 加压素受体结合的激活态的 β -Arrestin-1, 并通过定点荧光光谱法对激活构象进行了验证。通过与失活状态

的 β -Arrestin 比较发现, N 末端和 C 末端相对彼此有旋转, 套索区 (ariat loop) 有大的位移, 还发现了在 β -Arrestin 蛋白上有一个大的作用界面等。所有这些发现都是对 GPCR 信号通路研究的有力推动。

3.3 其他方面的研究进展

GPCR 其他方面的研究进展也是进步神速, 如多聚体的研究、各种配体受体作用模式的研究、GPCR 激酶杂泛性研究, 以及其他方面作用机制的研究等。而且, 这些方面的进展与结构生物学方面的新发现密不可分, 如阿片受体等的晶体结构便是以多聚体为基本结晶对象而获得的^[44-45], 这些晶体结构展示了多聚体之间的相互作用界面等信息。当前在全世界聚焦的形势下, 相信 GPCR 这些方面的研究进展会更多、更快。

4 基于 GPCR 结构的药物设计

GPCR 在体内是以多重构象形式^[46]存在的, 与不同配体结合也是以不同形态来实现。在这些构象中, 主导信号转导的信号构象 (signaling conformation) 是 GPCR 蛋白实现下游功能的关键。因此, 基于这样的一些基本理念, 人们在药物设计方面并没有拘泥于传统已发现的配体, 而是在不断探索发现新型配体, 如偏向性配体和变构调节剂等^[15,47]。不难想象, 人们已经在各种筛选方面做了大量工作, 而且大量潜在的有效策略等待被测试。

4.1 偏向性配体的设计

偏向性配体是随着 GPCR 各方面的发展而被渐渐重视的概念, 它有别于传统意义上简单的激动剂、拮抗剂和反向激动剂的划分, 与作用于传统结合口袋的正位配基相对应。偏向性配体的作用部位有别于传统结合位点, 作用效果上有功能选择性。目前偏向性配体主要为偏向激动剂, 它们的生物学效应对药物设计有重要价值。过去几年已有一些偏向激动剂进入临床阶段, 如靶向血管紧张素受体 1A (AT1AR) 的 TRV120027^[15]。2013 年, Zhou 等^[48]报道了通过新的生物筛选方法得到的两类新化合物 (图 2 A/B), 这些化合物优先偏向激活 G 蛋白通路的同时, 还对 β -Arrestin-2 通路有微弱的聚集作用, 并激活下游 ERK1/2 信号通路。而已经发现的 κ OR 的另一偏向激动剂 6'-GNTI^[49]却没有激活下游 ERK1/2 信号通路的功能。

4.2 变构调节剂的设计

晶体结构已经展示了一些内源性的变构调节剂, 包括离子、脂质、胆固醇, 甚至多肽等。近年来,

很多人已经意识到与传统的正位激动剂或拮抗剂相比, 靶向 GPCR 的变构调节剂具有其潜在的优势, 如变构调节剂在受体亚型选择性等方面比正位配基表现要好, 因此, 设计新的变构调节剂来获得更好的治疗效果有很好的前景。在药物开发中, 目前已有 Cinacalcet 和 Maraviroc 两个药物上市^[47]。早前关于变构调节剂的作用部位已有报道, 一般位于胞外区^[51]。下面一个例子便是这方面的一个新的研究进展。2013年, Burford 等^[50]通过生物高通量筛选策略发现了两个变构调节剂(图2 C/D), 其中一个是正性变构调节剂(PAM), 另一个是沉默变构调节剂(SAM), 这对新型阿片受体镇痛药研发来说无疑是一个很有意义的进展。

4.3 单次跨膜配体的设计

与其他类 GPCR 不同, A 类中还存在着一类新型的单次跨膜配体, 在靠近正位结合位点区域, 它们可以有两个同时作用于正位结合位点和变构位点的药效基团^[16], 如 MCN-A-343 可选择性作用于毒蕈碱 M2 受体, R22 (方案 4) 选择性作用于多巴胺 D3 受体, 以及 77-LH-28-1 作用于毒蕈碱 M1 受体, 这样设计的一个理由是它们的变构结合位点在受体亚型之间是不保守的, 同时结合便增强了它们的选择性^[16-18]。此外, 多价配体(“dualsteric”或“multivalent”ligand)设计理念也得到较好的运用。

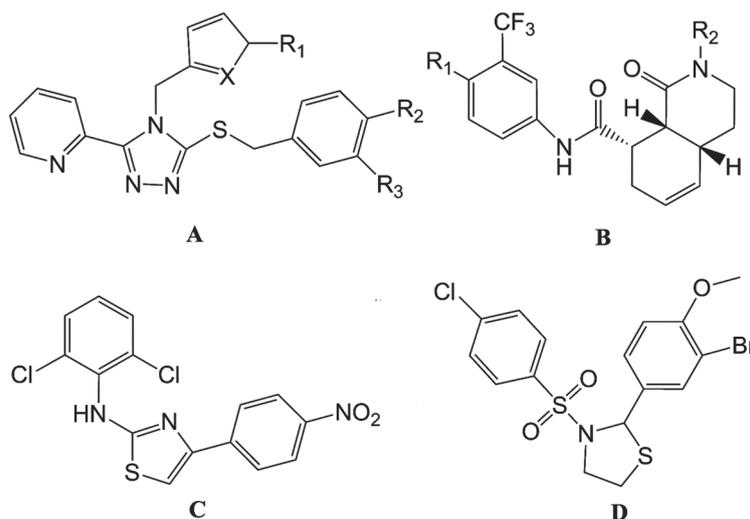
5 展望

近几年 GPCR 结构和功能研究已经取得了长足

进展, 科学家并没有满足于已取得的成果, 而是正在将 GPCR 研究推向更深层。GPCR 激活动力学是由多个构象状态之间复杂的平衡决定的^[46,52], 变构调节剂的存在和偏向信号的功能应答便证实了这一点。要完整理解这些现象, 需探测不同构象之间的平衡, 这就超越了测定最低受体能量状态的晶体学方法的能力, 需要各种生物物理方法, 如核磁法、荧光光谱法和质谱法等, 及计算化学方法, 如分子动力学等的大力参与。这就需要研究人员不断改进技术手段进行创造性劳动, 显然接下来会有更多的重大突破被报道。

5.1 GPCR信号转导通路研究的地位将更加突出

前面已经介绍了 β -Arrestin 蛋白在机体内的重要作用。调控蛋白 β -Arrestin 可与细胞表面受体形成复合物, 人们已经猜测其作用机理为两步骤机制^[53]。发表在 2014 年 6 月 22 日 *Nature* 杂志上的研究论文揭示出了这个两步骤机制^[54]。首先, β -Arrestin 的 N 末端通过高亲和力的电荷-电荷相互作用快速而广范地作用于磷酸化的受体 C 末端, 然后是指环区(finger loop)插入受体核心区来形成纵向排列。 β -Arrestin 的作用过程相当于给 GPCR 信号戴上帽子, 从而阻断信号转导而脱敏。研究人员在获得可直接进行结构显像的材料后, 利用电子显微镜揭示出了这一信号装置中单个分子彼此之间的组织构建方式。将数以千计的单幅图像组合到一起生成了更好的有关这一分子结构的图像。他们通过交联分析和质谱法检测进一步阐明, 这一复合物



三唑类化合物(A)和异喹啉酮类化合物(B)是最近报道的两类 κ OR偏向激动剂。两个变构调节剂分别为正性变构调节剂(C)和沉默变构调节剂(D)。

图2 新型 κ OR偏向激动剂和新型 μ OR变构调节剂^[48,50]

的结构对于了解这些受体丧失反应,从而阻止异常信号的机制具有极其重要的意义。

因为 $G\alpha$ 亚基 C 末端 ($G\alpha$ CT) 和 4 种 Arrestin 蛋白有一段共同的区域——(E/D)x(I/L)xxxGL, Szczeppek 等^[55] 在 2014 年也报道了两个有趣的晶体结构,分别为原型视紫红质与 $G\alpha$ CT 和 ArrFL-1 (原型视紫红质 Arrestin 指环区的类似物) 相互作用的复合物。尽管 $G\alpha$ CT 和 ArrFL-1 极其相似,通过比较还是发现在它们能与受体相互作用的界面上, $G\alpha$ CT 有更大的疏水区,这可能与 G 蛋白和 Arrestin 蛋白各自的作用机制密切相关。由于 GPCR 信号转导通路的重要性,接下来应该会有更多利用 X-射线晶体学获得 GPCR 与其有关作用蛋白所形成复合物的更多细节的工作,然后在实验中利用这些原子细节来设计出一些新药物,从而更好地服务于 GPCR 的生命科学和人类健康事业。

同时,也应该看到 β -Arrestin 蛋白介导的信号通路仅是 GPCR 介导信号转导的一方面,尽管这类蛋白带给人们很多期待,但人们仍需把精力集中在更精确的 G 蛋白信号响应机制研究上来。最近发表在 *J Biol Chem* 杂志上的一篇文章便提供了很好的研究思路^[56]。该课题组通过对非诺特罗的类似物 (R,R')-4'-aminofenoterol 进行信号通路研究,发现这个化合物可以激活野生型 β 2-AR 引起 Gs 信号,但同时可以激活 β 2-AR-Y308F 突变体引起 Gs 与 Gi 双重信号。计算机模拟以及对一系列非诺特罗衍生物的心肌生物学测试表明,配体中的 4'-O 或 4'-N 与 β 2-AR-Y308 酚羟基之间的特异性氢键决定了 β 2-AR-Gs 偏向性信号^[56]。针对复杂的细胞信号转导研究正是需要这样大量的来自不同配体和不同残基的基础信息支持。同时,科学家的每一次进展突破都离不开新技术的开发和新思路的运用,所以这也对人们提出了新的挑战。

5.2 GPCR 结构生物学和药物发现方面的研究将依旧火热

GPCR Network 是专门为结晶及测定 GPCR 成员的晶体结构而成立的,该组织目前已经完成了初期计划,获得各个大类别成员的晶体结构。随着计划的推进,相信该组织会有越来越多的重大成果展现给世界。他们有一揽子晶体结构解析计划,如打算下一个五年测定 100 多个 GPCR 蛋白等,所以接下来将会有越来越充足的晶体结构可供利用。同时,GPCR 类蛋白的有效解析需要借助极其高端的新技术。2014 年, Thorsen 等^[57] 报道的工作便是用改进

型的 T4L 获得了更高分辨率而非孪晶的 M3 毒蕈碱受体三维结构。再如, LCLS 仍是一种成本昂贵的技术,所以开发新的较廉价较简便的方法也是 GPCR 结构生物学发展的一个趋势。这样在结构生物学方面, GPCR 的研究将会进入一个结构充足、多样而解析方法越来越简易的时代。

同时,也应该看到 NMR 技术在结构生物学中的应用也被寄予厚望。近些年,通过将电子的自旋极化传输到核,动态核极化 (DNP) 的魔角旋转 SSNMR 技术已成功应用于细菌视紫红质 7TM 光驱动质子泵的中间状态研究^[58-59]。DNP 增强了灵敏度,使得视网膜构象的 K、L 和 M 三个状态在 SSNMR 中首次实现了表征。引入 DNP 以及 SSNMR 技术的其他方面进展,诸如通过 Cu-EDTA 掺杂^[60]的方法缩短自旋纵向弛豫时间等,可望在未来促使通过 NMR 方法测定 GPCR 成员完整的三维结构,以及确定失活态与激活态之间的 GPCR 的动态开关等,从而为蛋白质运动的复杂级联和激活过程的重排特征提供进一步的机理解释。此外,这些方法的进步也有可能促进基于 NMR 的高通量筛选和随后基于结构优化的靶向 GPCR 的先导化合物的发现^[61]。

人们已经围绕偏向性配体和变构调节剂展开新的技术研发。值得一提的是,2014 年接连报道了三个变构调节剂与其 GPCR 靶标的复合物结构,进一步明确了该类配体完全不同于正位配基的结合口袋,这对深入研究变构调节剂的作用机理很有意义^[21-22,62]。接下来肯定会有越来越多的各类配体,尤其新型配体的复合物被报道。由于不同配体会介导不同而复杂的信号转导途径,通过这些新型配体的设计,人们不仅可以得到新药物,而且可以进一步促进 GPCR 类蛋白信号转导通路的研究。相信在这些新技术、新理念不断试验的基础上,人们会不断深化对 GPCR 信号转导机理及相关致病机理的认识。相信通过各类配体,尤其新型配体的设计,会造就一个全新的靶向 GPCR 的新药研发时代。

[参 考 文 献]

- [1] Lagerstrom MC, Schioth HB. Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 2008, 7(4): 339-57
- [2] Overington JP, Al-Lazikani B, Hopkins AL. How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov*, 2006, 5(12): 993-6
- [3] Lappano R, Maggolini M. G protein-coupled receptors:

- novel targets for drug discovery in cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 2011, 10(1): 47-60
- [4] Allen JA, Roth BL. Strategies to discover unexpected targets for drugs active at G protein-coupled receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2011, 51: 117-44
- [5] Reiter E, Ahn S, Shukla AK, et al. Molecular mechanism of β -arrestin-biased agonism at seven-transmembrane receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2012, 52: 179-97
- [6] Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, et al. Crystal structure of rhodopsin: a G protein-coupled receptor. *Science*, 2000, 289(5480): 739-45
- [7] Takeda K, Sato H, Hino T, et al. A novel three-dimensional crystal of bacteriorhodopsin obtained by successive fusion of the vesicular assemblies. *J Mol Biol*, 1998, 283(2): 463-74
- [8] Cherezov V, Rosenbaum DM, Hanson MA, et al. High-resolution crystal structure of an engineered human β_2 -adrenergic G protein-coupled receptor. *Science*, 2007, 318(5854): 1258-65
- [9] Tautermann CS. GPCR structures in drug design, emerging opportunities with new structures. *Bioorg Med Chem Lett*, 2014, 24(17): 4073-9
- [10] Topiol S, Sabio M. X-ray structure breakthroughs in the GPCR transmembrane region. *Biochem Pharmacol*, 2009, 78(1): 11-20
- [11] RCSB[EB/OL]. <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>
- [12] Khoury E, Clement S, Laporte SA. Allosteric and biased g protein-coupled receptor signaling regulation: potentials for new therapeutics. *Front Endocrinol: Lausanne*, 2014, 5: 1-8
- [13] Kenakin T, Christopoulos A. Signalling bias in new drug discovery: detection, quantification and therapeutic impact. *Nat Rev Drug Discov*, 2013, 12(3): 205-16
- [14] Luttrell LM. Minireview: more than just a hammer: ligand "bias" and pharmaceutical discovery. *Mol Endocrinol*, 2014, 28(3): 281-94
- [15] Wisler JW, Xiao K, Thomsen AR, et al. Recent developments in biased agonism. *Curr Opin Cell Biol*, 2014, 27: 18-24
- [16] Congreve M, Langmead CJ, Mason JS, et al. Progress in structure based drug design for G protein-coupled receptors. *J Med Chem*, 2011, 54(13): 4283-311
- [17] Lane JR, Sexton PM, Christopoulos A. Bridging the gap: bitopic ligands of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 2013, 34(1): 59-66
- [18] Valant C, Robert Lane J, Sexton PM, et al. The best of both worlds? Bitopic orthosteric/allosteric ligands of g protein-coupled receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2012, 52: 153-78
- [19] Bortolato A, Dore AS, Hollenstein K, et al. Structure of Class B GPCRs: new horizons for drug discovery. *Br J Pharmacol*, 2014, 171(13): 3132-45
- [20] Flight MH. Drug discovery: structure-led design. *Nature*, 2013, 502(7471): S50-2
- [21] Dore AS, Okrasa K, Patel JC, et al. Structure of class C GPCR metabotropic glutamate receptor 5 transmembrane domain. *Nature*, 2014, 511(7511): 557-62
- [22] Wu H, Wang C, Gregory KJ, et al. Structure of a class C GPCR metabotropic glutamate receptor 1 bound to an allosteric modulator. *Science*, 2014, 344(6179): 58-64
- [23] Katritch V, Cherezov V, Stevens RC. Structure-function of the G protein-coupled receptor superfamily. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2013, 53: 531-56
- [24] Liu W, Chun E, Thompson AA, et al. Structural basis for allosteric regulation of GPCRs by sodium ions. *Science*, 2012, 337(6091): 232-6
- [25] Fenalti G, Giguere PM, Katritch V, et al. Molecular control of δ -opioid receptor signalling. *Nature*, 2014, 506(7487): 191-6
- [26] GPCR Network[EB/OL]. <http://gpcr.scripps.edu/>
- [27] Wacker D, Wang C, Katritch V, et al. Structural features for functional selectivity at serotonin receptors. *Science*, 2013, 340(6132): 615-9
- [28] Wang C, Jiang Y, Ma J, et al. Structural basis for molecular recognition at serotonin receptors. *Science*, 2013, 340(6132): 610-4
- [29] Wu B, Chien EY, Mol CD, et al. Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science*, 2010, 330(6007): 1066-71
- [30] Tan Q, Zhu Y, Li J, et al. Structure of the CCR5 chemokine receptor-HIV entry inhibitor maraviroc complex. *Science*, 2013, 341(6152): 1387-90
- [31] Zhang J, Zhang K, Gao ZG, et al. Agonist-bound structure of the human P2Y12 receptor. *Nature*, 2014, 509(7498): 119-22
- [32] Zhang K, Zhang J, Gao ZG, et al. Structure of the human P2Y12 receptor in complex with an antithrombotic drug. *Nature*, 2014, 509(7498): 115-8
- [33] Kohlhoff KJ, Shukla D, Lawrenz M, et al. Cloud-based simulations on Google Exacycle reveal ligand modulation of GPCR activation pathways. *Nat Chem*, 2014, 6(1): 15-21
- [34] Da LT, Sheong FK, Silva DA, et al. Application of Markov State Models to simulate long timescale dynamics of biological macromolecules. *Adv Exp Med Biol*, 2014, 805: 29-66
- [35] Johnston JM, Filizola M. Beyond standard molecular dynamics: investigating the molecular mechanisms of G protein-coupled receptors with enhanced molecular dynamics methods. *Adv Exp Med Biol*, 2014, 796: 95-125
- [36] Shenoy SK, Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane receptor signaling through β -arrestin. *Sci STKE*, 2005, 2005(308): cm10
- [37] Violin JD, Lefkowitz RJ. β -arrestin-biased ligands at seven-transmembrane receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 2007, 28(8): 416-22
- [38] Fisher A, Heldman E, Gurwitz D, et al. Selective signaling via unique M1 muscarinic agonists. *Ann N Y Acad Sci*, 1993, 695: 300-3
- [39] Gurwitz D, Haring R, Heldman E, et al. Discrete activation of transduction pathways associated with acetylcholine m1 receptor by several muscarinic ligands. *Eur J Pharmacol*, 1994, 267(1): 21-31
- [40] Whalen EJ, Rajagopal S, Lefkowitz RJ. Therapeutic

- potential of β -arrestin- and G protein-biased agonists. *Trends Mol Med*, 2011, 17(3): 126-39
- [41] Han M, Gurevich VV, Vishnivetskiy SA, et al. Crystal structure of β -arrestin at 1.9 Å: possible mechanism of receptor binding and membrane translocation. *Structure*, 2001, 9(9): 869-80
- [42] Zhan X, Gimenez LE, Gurevich VV, et al. Crystal structure of arrestin-3 reveals the basis of the difference in receptor binding between two non-visual subtypes. *J Mol Biol*, 2011, 406(3): 467-78
- [43] Shukla AK, Manglik A, Kruse AC, et al. Structure of active β -arrestin-1 bound to a G-protein-coupled receptor phosphopeptide. *Nature*, 2013, 497(7447): 137-41
- [44] Manglik A, Kruse AC, Kobilka TS, et al. Crystal structure of the micro-opioid receptor bound to a morphinan antagonist. *Nature*, 2012, 485(7398): 321-26
- [45] Wu H, Wacker D, Mileni M, et al. Structure of the human κ -opioid receptor in complex with JDTic. *Nature*, 2012, 485(7398): 327-32
- [46] Yao XJ, Velez Ruiz G, Whorton MR, et al. The effect of ligand efficacy on the formation and stability of a GPCR-G protein complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(23): 9501-6
- [47] Nickols HH, Conn PJ. Development of allosteric modulators of GPCRs for treatment of CNS disorders. *Neurobiol Disease*, 2014, 61(0): 55-71
- [48] Zhou L, Lovell KM, Frankowski KJ, et al. Development of functionally selective, small molecule agonists at κ opioid receptors. *J Biol Chem*, 2013, 288(51): 36703-16
- [49] Schmid CL, Streicher JM, Groer CE, et al. Functional selectivity of 6'-guanidinonaltrindole (6'-GNTI) at κ -opioid receptors in striatal neurons. *J Biol Chem*, 2013, 288(31): 22387-98
- [50] Burford NT, Clark MJ, Wehrman TS, et al. Discovery of positive allosteric modulators and silent allosteric modulators of the μ -opioid receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(26): 10830-5
- [51] May LT, Leach K, Sexton PM, et al. Allosteric modulation of G protein-coupled receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2007, 47: 1-51
- [52] Deupi X, Kobilka BK. Energy landscapes as a tool to integrate GPCR structure, dynamics, and function. *Physiology: Bethesda*, 2010, 25(5): 293-303
- [53] Gurevich VV, Gurevich EV. The molecular acrobatics of arrestin activation. *Trends Pharmacol Sci*, 2004, 25(2): 105-11
- [54] Shukla AK, Westfield GH, Xiao K, et al. Visualization of arrestin recruitment by a G-protein-coupled receptor. *Nature*, 2014, 512(7513): 218-22
- [55] Szczepek M, Beyrière F, Hofmann KP, et al. Crystal structure of a common GPCR-binding interface for G protein and arrestin. *Nat Commun*, 2014, 5: 4801
- [56] Woo AY, Jozwiak K, Toll L, et al. Tyrosine 308 is necessary for ligand-directed Gs protein-biased signaling of β 2-adrenoceptor. *J Biol Chem*, 2014, 289(28): 19351-63
- [57] Thorsen TS, Matt R, Weis WI, et al. Modified T4 lysozyme fusion proteins facilitate G protein-coupled receptor crystallogenesis. *Structure*, 2014, 22(11): 1657-64
- [58] Etzkorn M, Seidel K, Li L, et al. Complex formation and light activation in membrane-embedded sensory rhodopsin II as seen by solid-state NMR spectroscopy. *Structure*, 2010, 18(3): 293-300
- [59] Bajaj VS, Mak-Jurkauskas ML, Belenky M, et al. Functional and shunt states of bacteriorhodopsin resolved by 250 GHz dynamic nuclear polarization-enhanced solid-state NMR. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(23): 9244-9
- [60] Wickramasinghe NP, Kotecha M, Samoson A, et al. Sensitivity enhancement in ^{13}C solid-state NMR of protein microcrystals by use of paramagnetic metal ions for optimizing ^1H T_1 relaxation. *J Magn Reson*, 2007, 184(2): 350-6
- [61] Boomsma W, Tian P, Frellesen J, et al. Equilibrium simulations of proteins using molecular fragment replacement and NMR chemical shifts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(38): 13852-7
- [62] Srivastava A, Yano J, Hirozane Y, et al. High-resolution structure of the human GPR40 receptor bound to allosteric agonist TAK-875. *Nature*, 2014, 513(7516): 124-7