

Оптимизация рекомбинантной экспрессии доменов каркасного белка стресс-гранул G3BP1

Научный руководитель – Фонин Александр Владимирович

Жук М.Д.¹, Реушев В.А.², Давлетшина М.С.³, Озун А.С.⁴

1 - Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия, *E-mail: maksimjuk616@gmail.com*; 2 - Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия, *E-mail: vareushev@gmail.com*; 3 - Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия, *E-mail: 2006vfiernrf2006@gmail.com*; 4 - Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия, *E-mail: alinaozun197@gmail.com*

Стресс-гранулы представляют собой динамические цитоплазматические компартменты, формирующиеся в ответ на стрессовые воздействия, такие как окислительный стресс, тепловой шок или вирусная инфекция. Они играют ключевую роль в регуляции трансляционного контроля, секвестрируя мРНК и белки трансляционного аппарата, что способствует клеточному выживанию [3]. Актуальность исследований стресс-гранул обусловлена их ролью в патогенезе множества заболеваний, в том числе нейродегенеративных, таких как боковой амиотрофический склероз (БАС) и лобно-височная деменция (ЛВД). Дисфункция стресс-гранул при этих заболеваниях приводит к патологической агрегации белков, таких как TDP-43 и FUS. Изучение механизмов формирования и распада стресс-гранул может стать ключом к разработке новых терапевтических стратегий [2].

Каркасным белком стресс-гранул служит G3BP1 (Ras-GTPase-activating protein SH3 domain-binding protein 1), который отвечает за сборку и разборку стресс-гранул посредством фазового разделения типа жидкость-жидкость (liquid-liquid phase separation, LLPS) [1]. G3BP1 состоит из ряда доменов, наиболее интересны из которых NTF2 (димеризационный) и RRM (РНК-связывающий). Большая часть белка вне этих доменов состоит из неупорядоченных областей, что усложняет исследования белка [4].

Изучение функциональных ролей отдельных доменов белка G3BP1 необходимо для выяснения их специфического вклада в процессы разделения на фазы типа жидкость-жидкость и молекулярных взаимодействий с партнёрами. Однако экспрессия эукариотических белков, а тем более их отдельных доменов в прокариотических системах (*E. coli*) зачастую сопряжена со сложностями. Низкая растворимость неупорядоченных доменов, агрегация из-за отсутствия посттрансляционных модификаций, токсичность для продуцента и деградация, требующая денатурирующего рефолдинга, что снижает выход и функциональность. Эти проблемы ограничивают структурные и биохимические исследования.

Для оптимизации экспрессии доменов G3BP1 использовали плазмиду pET30a в штаммах Rosetta (DE3), STAR (BL21) и C41 (DE3). Культуры выращивали в средах M9, LB и 2YT. Индукция IPTG проводилась после 3–4 ч инкубации при 37°C (OD600 ~0.6–0.8), за которой следовала постинкубация 4–5 при 37°C, 14 ч при +18°C или +30°C. Многосторонний подход к оптимизации экспрессии позволил существенно повысить выход белка.

В результате удалось увеличить экспрессию доменов G3BP1 (в 2–3 раз по сравнению с изначальными условиями), обеспечив достаточное количество белка для хроматографической очистки и дальнейшего исследования.

Работа выполнена на базе Института цитологии РАН и поддержана грантом РФФ 23-45-00041.

Источники и литература

- 1) Antifeeva I. A. et al. Liquid–liquid phase separation as an organizing principle of intracellular space: overview of the evolution of the cell compartmentalization concept // Cellular and Molecular Life Sciences. – 2022. Т. 79. No. 5. С. 251.
- 2) Chen L., Liu B. Relationships between stress granules, oxidative stress, and neurodegenerative diseases // Oxidative medicine and cellular longevity. – 2017. Т. 2017. No. 1. С. 1809592.
- 3) Kang W. et al. Research progress on the structure and function of G3BP // Frontiers in Immunology. – 2021. Т. 12. С. 718548.
- 4) Ivanov P., Kedersha N., Anderson P. Stress granules and processing bodies in translational control // Cold Spring Harbor perspectives in biology. – 2019. Т. 11. No. 5. С. a032813.