

Оптимизация нейрпептидного GPCR для задач структурной биологии

Научный руководитель – Мишин Алексей Викторович

Трещева Мария Дмитриевна

Студент (бакалавр)

Московский физико-технический институт, Москва, Россия

E-mail: treshcheva.md@phystech.edu

Рецепторы, сопряженные с G-белком (G protein-coupled receptors, GPCRs), представляют собой большое семейство мембранных белков. Они являются важными фармакологическими мишенями в современной медицине. Нейрпептидные рецепторы являются частью этого класса. Они вовлечены в патогенез таких состояний, как мигрень, тревожность, нарушения сна и т. д. [3]. Это делает решение трехмерной структуры нейрпептидных рецепторов ключевой задачей структурной биологии, необходимой для поиска таргетных стратегий терапии.

Целью данного исследования является получение трехмерной структуры нейрпептидного GPCR методом криоэлектронной микроскопии. Для повышения уровня поверхностной экспрессии и получения гомогенного образца использовались следующие подходы: 1) внесение стабилизирующих мутаций, предсказанных инструментом CompoMUG (Computational Predictions Of Mutations in GPCRs) [4]; 2) введение N-концевых последовательностей: сайтов N-гликозилирования мускаринового ацетилхолинового рецептора M4 [1] и β 2-адренорецептора [2]; 3) использование системы NanoBiT, основанной на фрагментации люциферазы: LgBiT (на C-конце рецептора) и HiBiT (на β -субъединице G-белка; 4) варьирование G-белков при сборке комплекса: химерные белки mini-G α s и Gqis.

Генетические конструкции получены посредством безлигазного клонирования. Получение целевых белков осуществлялось с использованием бакуловирусной системы экспрессии. Рекомбинантные бакмиды созданы методом сайт-направленной транспозиции.

Анализ поверхностной экспрессии показал, что мутация F2.52L повышает уровень экспрессии рецептора по сравнению с диким типом в присутствии антагониста. Получены и охарактеризованы конструкции с мутациями F2.52L и N2.63I, а также комплекс рецептора с mini-G α s. Для всех вариантов отмечено увеличение выхода белка. Дополнительно выделены и охарактеризованы конструкции с N-концевыми последовательностями, а также комплекс GPCR-LgBiT, G β -HiBiT-G γ и Gqis.

Работа выполнена при поддержке государственного задания, проект № FSMG-2024-0012 по теме «Мембранные белки как ключевые мишени и инструменты современной фармакологии и медицины».

Источники и литература

- 1) Хорн П.А. [и др.]. Рациональная разработка лекарств, направленных на рецепторы, сопряженные с g-белком: взгляд со стороны структурной биологии // Биохимия. 2024. Т. 89. №4. С. 705-725.
- 2) Barak, Larry S. [et al.]. Pharmacological Characterization of Membrane-Expressed Human Trace Amine-Associated Receptor 1 (TAAR1) by a Bioluminescence Resonance Energy Transfer cAMP Biosensor // Mol. Pharmacol. 2008. V. 74 (3). P. 585 - 594
- 3) Hoyer, D. and Bartfai, T. Neuropeptides and Neuropeptide Receptors: Drug Targets, and Peptide and Non-Peptide Ligands: a Tribute to Prof. Dieter Seebach // Chem. Biodivers. 2012. V. 9. P. 2367-2387.

- 4) Popov Petr [et al.]. Computational design of thermostabilizing point mutations for G protein-coupled receptors // eLife. 2018. V. 7:e34729.