

На правах рукописи

ЛУГИНИНА Александра Павловна

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ
СТРУКТУРЫ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ЦИСТЕИНИЛ-
ЛЕЙКОТРИЕНОВОГО РЕЦЕПТОРА 1 КЛАССА
GPCR**

Специальность 03.01.02 – Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Москва – 2019

Работа выполнена на кафедре биофизики федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)».

Научный руководитель: Черезов Вадим Геннадьевич, кандидат физико-математических наук, заведующий лабораторией «Структурной биологии рецепторов, сопряженных с G-белком», МФТИ.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»

Защита состоится «24» декабря 2019 года в 17.00 на заседании диссертационного совета ЛФИ.03.01.02.001 по адресу: 141701, Московская область, г. Долгопрудный, Институтский переулок, д.9.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Московского физико-технического института (национального исследовательского университета) <https://mipt.ru/education/post-graduate/soiskateli-fiziko-matematicheskie-nauki.php>

Работа представлена «14» октября 2019 г. в Аттестационную комиссию федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)» для рассмотрения советом по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук в соответствии с п. 3.1 ст. 4 Федерального закона «О науке и государственной научно - технической политике»

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Введение

Рецепторы, сопряженные с G-белком (GPCR), составляют важнейшее суперсемейство семиспиральных белков эукариот, состоящее у человека из более 800 представителей. Связываясь с лигандом, рецепторы передают внешний сигнал внутрь клетки [1]. Их роль в организме крайне разнообразна: от улавливания глазом фотонов света до регулирования иммунной системы, и её сложно переоценить. GPCR являются трудными объектами исследования, будучи трансмембранными белками, обладающими низкой стабильностью и уровнем экспрессии, и высокой конформационной подвижностью. Учитывая сложность работы с GPCR, актуальность темы в научном сообществе (более 1 миллиона результатов в Google scholar), а также тот факт, что данный класс белков является основной мишенью современной фармакологической индустрии [2], структурные исследования GPCR были удостоены Нобелевской премии по химии в 2012 году.

Благодаря интенсивным структурным и функциональным исследованиям последних десяти лет, современной науке известна основная модель активации GPCR: после связывания лиганда во внеклеточной половине рецептора происходит ряд перестроений трансмембранных спиралей, вызванных «переключением» консервативных аминокислотных мотивов [3]. Однако с появлением дополнительных пространственных структур в существующую парадигму вносится ряд уточнений, приводящий к появлению новых концепций понимания функционирования этой группы белков.

Ввиду огромного разнообразия лигандов, активирующих GPCR, ортостерический пакет связывания лиганда уникален для каждого рецептора, и зачастую невозможно точно смоделировать его форму без экспериментальных данных, поэтому структура каждого нового GPCR даёт ценную информацию о кармане связывания лиганда и служит подспорьем для дальнейших фармакологических разработок [4].

Решение пространственной структуры является нетривиальной экспериментальной задачей, требующей от команды исполнителей проекта огромного ресурсного вклада, а также современной

инфраструктурной оснащенности. Прорывными достижениями современной науки, сделавшими структурные исследования GPCR возможными, являются: совершенствование методов экспрессии [5] и стабилизации конформационных состояний точечными мутациями [6], разработка методики белковой микрокристаллографии с использованием синхротронного излучения [7], применение кристаллизации *in meso* [8], разработка белков-партнёров, улучшающих стабильность белка и формирующих кристаллические контакты [9], использование нанотел, стабилизирующих комплекс рецептора с G-белком [10], создание программных ресурсов для предсказания генетических конструкций [11,12], а также применение прогрессивных методик, таких как лазер на свободных электронах [13] и крио-электронная микроскопия [14]. Тем не менее, несмотря на все успехи современной науки, рецепторы, сопряженные с G-белком, остаются сложными мишенями для структурных биологов, и появление новых данных вызывает сильный интерес у научного сообщества. Методика определения структуры GPCR кристаллографическим методом включает в себя итерационную оптимизацию генетической конструкции, протоколов очистки и кристаллизации в липидной кубической фазе, а также высокотехнологичную рентгеновскую микрокристаллографию.

Актуальность темы исследования

Цистеинил-лейкотриеновые рецепторы 1 и 2 (CysLT₁₋₂R) принадлежат к суперсемейству GPCR и контролируют мышечное сокращение бронхов и воспалительные процессы в легких. Поэтому они рассматриваются в качестве основных мишеней при лечении астмы [15]. Согласно данным Центров по контролю и профилактике заболеваний США (Centers for Disease Control and Prevention – CDC), астма является крайне тяжелым хроническим заболеванием, широко распространенным среди детей, влияющим на качество жизни и продуктивность почти 10% населения нашего современного общества и может привести к смерти. По данным медико-демографических показателей министерства здравоохранения Российской Федерации, доступным на сайте mednet.ru, в 2016 году в нашей стране астма вызвала 1447 летальных исходов, а в 2017 году – 1351. Получение более

эффективных и безопасных противоастматических лекарственных препаратов является приоритетным направлением современной медицины.

Цели и задачи работы

Целью данной работы было получение и анализ пространственной структуры CysLT₁ рецептора человека. Для ее реализации стоял ряд задач. Первой задачей был инжиниринг генетической конструкции для экспрессии белка на цитоплазматической мембране клеток, используемых для рекомбинантного получения рецептора, обеспечивающей также стабильность и мономерность CysLT₁R после солюбилизации в мицеллах детергента. Второй задачей проекта являлась наработка целевого белка в клетках насекомых *Sf9* в достаточном для кристаллизации количестве. Следующим пунктом была оптимизация протоколов очистки CysLT₁R для получения миллиграммовых количеств чистого белкового препарата, обладающего достаточной стабильностью и монодисперсностью. Третьей задачей была кристаллизация рецептора в липидной кубической фазе (LCP). Для этого решалась подзадача улучшения диффузии белка в LCP. Дополнительно перед автором стояла задача налаживания общей инфраструктуры для выделения и кристаллизации GPCR в Центре исследований молекулярных механизмов старения и возрастных заболеваний МФТИ.

Научная новизна

В данной работе впервые получена пространственная структура CysLT₁ рецептора в комплексе с двумя антагонистами, которая открыла уникальные механизмы функционирования GPCR, не наблюдаемые ранее, а также впервые проанализирована структура промежуточного состояния, позволяющая проследить за путём входа липидного лиганда в связывающий карман через боковую сторону рецептора непосредственно из окружающей мембраны.

Для получения кристаллической структуры была разработана генетическая конструкция CysLT₁R с белком-партнёром, впервые проведено комплексное исследование данного белка *in vitro*, включающее в себя разработку и применение методологии экспрессии,

очистки и кристаллизации CysLT₁R. Был измерен эффект связывания лигандов и ионов натрия на стабильность рецептора и нескольких его точечных мутантов.

Дифракционные данные были получены при помощи синхротронного излучения для комплекса с пранлукастом и при помощи лазера на свободных электронах для комплекса с зафирлукастом. Недавно появившийся и бурно развивающийся метод серийной кристаллографии с использованием рентгеновских лазеров на свободных электронах является новым и перспективным подходом для белковой кристаллографии объектов, трудно поддающихся кристаллизации.

Теоретическая и практическая значимость

Две структуры CysLT₁R, определенные в данном исследовании, в комплексе с противоастматическими лекарственными препаратами, пранлукастом и зафирлукастом, раскрывают механизм проникновения лиганда в липидные рецепторы и являются важным примером пластичности рецептора при связывании двух химически различных антагонистов. Структуры предполагают новый механизм активации GPCR, при котором функциональный переключатель P-I-F находится в активной конформации, в то время как рецептор стабилизируется в неактивном состоянии с помощью жестко связанного иона натрия, координированного четырьмя остатками, включающими два остатка аспарагиновых кислот. Кроме того, на основе решенных структур предложен возможный механизм связывания для эндогенных агонистов – цистеинил-лейкотриенов. Таким образом, результаты этой работы представят огромный интерес для фундаментальной науки, а также должны послужить полезным инструментом для рационального дизайна лекарственных средств, мишенью которых является CysLT₁ рецептор.

Методология и методы исследования

В работе были использованы следующие методы и технологии:

- Генно-инженерные методы модификации белков: делеции и вставки фрагментов, введение точечных мутаций.
- Бакуловирусная экспрессия мембранных белков в клетках насекомых с применением метода проточной цитофлуориметрии для

анализа качества клеток и заражающего вируса, и выхода белка на поверхность клетки.

- Лизис клеток и выделение мембранной фракции путём гомогенизации в гипо- и гипертонических буферах, солюбилизация мембранных белков в мицеллах детергента, очистка рецептора методом металл-аффинной хроматографии, препаративная гель-фильтрация.

- Электрофорез, иммуноблоттинг, аналитическая гель-фильтрационная хроматография, исследование белковой стабильности методом измерения характерных температур плавления.

- Исследование диффузии белка в липидной кубической фазе методом восстановления флуоресценции после фотообесцвечивания. Кристаллизация в липидной кубической фазе методом *in meso*, анализ кристаллов методом флуоресцентной микроскопии.

- Микрофокусная кристаллография на синхротронных источниках и серийная фемтосекундная кристаллография с использованием лазеров на свободных электронах.

- Молекулярный докинг и молекулярно-динамические симуляции.

- Измерение передачи сигнала GPCR в клетках млекопитающих: вывод белка на цитоплазматическую поверхность, активация рецептора агонистом, ингибирование агониста антагонистом.

Положения, выносимые на защиту

1. Генетическая конструкция рецептора CysLT₁ с обрезанным С-концом, химерным белком-партнёром b562RIL в третьей внутриклеточной петле и N-концевыми пептидными фрагментами для бакуловирусной экспрессии, очистки и кристаллизации белка в липидной кубической фазе.

2. Экспериментальный подход, включающий в себя рекомбинантную наработку CysLT₁R в клеточной линии Sf9, выделение белка путём солюбилизации в мицеллы детергента и очистки методом металл-аффинной хроматографии, кристаллизацию рецептора методом *in meso*.

3. Пространственная структура CysLT₁R в комплексе с антагонистом пранлукастом, CysLT₁R-пран, с разрешением 2,7 Å,

полученная методом белковой микрокристаллографии с использованием синхротронного излучения.

4. Пространственная структура CysLT₁R в комплексе с антагонистом зафирлукастом, CysLT₁R-зафир, с разрешением 2,5 Å, полученная методом серийной фемтосекундной кристаллографии с использованием лазера на свободных электронах.

5. Показано наличие активного состояния у мотивов-переключателей при общей неактивной структуре рецептора, координация иона натрия четырьмя аминокислотными остатками, а также вхождение лиганда через трансмембранную область рецептора.

Степень достоверности и апробация результатов

При выполнении и написании работы автором был проведен анализ литературных данных ведущих мировых журналов по теме исследования. В процессе получения экспериментальных данных качество белкового препарата проверялось различными аналитическими методами. Сбор дифракционных данных осуществлялся на передовых и мощнейших рентгеновских установках во Франции и в США, а обработка результатов велась при помощи современного специализированного программного обеспечения. Анализ структуры проводился с учетом итогов функциональных тестов мутантных форм рецептора. Новые свойства, обнаруженные в рецепторе, не противоречат результатам мирового научного сообщества по исследованию данного класса рецепторов и не являются артефактом эксперимента. Данные экспериментов статистически выверены.

По итогам диссертационной работы опубликованы 4 статьи в рецензируемых журналах, индексируемых базами данных Web of Sciences, Scopus и РИНЦ, а также статья в журнале Science Advances, где исполнитель данной работы является первым автором. Основные результаты были представлены в виде 25 тезисов на международных конференциях, включающих устные доклады и стендовые презентации.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описывающего методологию по получению пространственной структуры GPCR рецепторов, а также результаты предыдущих

исследований цистеинил-лейкотриенового рецептора 1 человека, материалов и методов, результатов исследований и их обсуждения, заключения и выводов, а также списка использованной литературы. Диссертационная работа изложена на 137 страницах машинописного текста, содержит 31 рисунок и 5 таблиц. Список использованных литературных источников насчитывает 187 наименований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во «Введении» обоснована актуальность темы диссертационной работы, обозначены цели, задачи и методы исследования, отражены научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, описана апробация полученных результатов и объем работы.

Глава «Литературный обзор» состоит из двух частей, первая из которых описывает рецепторы, сопряженные с G-белком, их общую архитектуру, классификацию и механизм активации, а также методику их структурных исследований при помощи кристаллизации в липидной кубической фазе и рентгеноструктурного анализа. Во второй части описан цистеинил-лейкотриеновый рецептор 1, его экспрессия и функционирование в организме человека, участие в воспалительных процессах, а также антагонисты CysLT₁R, используемые в современной медицине.

В главе «Материалы и методы» дано описание материалов, оборудования, методов и экспериментальных процедур, использованных при выполнении диссертационной работы: молекулярного клонирования, наработки белка методом бакуловирусной экспрессии в клетках насекомых, экстракции мембранной фракции и солюбилизации белка мягкими детергентами, очистки при помощи металл-аффинной хроматографии, анализа качества белкового препарата методом аналитической гель-фильтрации и методом исследования термостабильности при помощи получения кривых плавления, кристаллизации методом *in meso*, получения и анализа дифракционных данных.

Глава «Результаты и обсуждение»

Генно-инженерные конструкции CysLT₁R

Для определения пространственной структуры CysLT₁R методом

рентгеноструктурного анализа производилась оптимизация генетической конструкции белка интереса. Данный процесс проходил итерационно, путём последовательного выполнения следующих этапов. Первым этапом была наработка рецептора в эукариотической системе экспрессии на цитоплазматической мембране, что было нужно для получения функционального белкового препарата и отсутствия необходимости рефолдинга при выделении. Вторым этапом было получение мономерного и стабильного белка, это требовалось для кристаллизации в липидной кубической фазе, проходящей при температуре 20-22°C в течение нескольких недель. Третьим пунктом был анализ диффузии рецептора в LCP и получение белковых кристаллов.

Параметрами для вариации генетической конструкции были: положение белка-партнёра, необходимого для экспрессии и стабилизации CysLT₁R, а также образования кристаллизационных контактов [9]; обрезание N- и C- концевых фрагментов белка, добавление точечных мутаций. Всего методом клонирования было собрано 43 конструкции, описанные в работе.

Большинство конструкций CysLT₁R показали хорошие параметры экспрессии, высокую монодисперсность и стабильность, что упростило оптимизацию протоколов наработки и очистки белка, но усложнило выбор стратегии оптимизации самой конструкции.

Для кристаллизации CysLT₁R были применены следующие модификации: термостабилизированный апоцитохром b562RIL (BRIL), вставленный в третью внутриклеточную петлю, между аминокислотами K222 и K223 через S- и SG- линкеры, обрезание C-конца после 8 спирали (K311), без дополнительных точечных мутаций (рисунок 1).

Данная конструкция была разработана на основе одного из ближайших гомологов рецептора, пуринового рецептора P2Y₁₂ [16], имеющего 21% идентичных аминокислот с CysLT₁R [11], несмотря на принципиальное различие в лигандах. Ген интереса встраивался в вектор *pFastBac1* для дальнейшей транспозиции в челночный вектор-бакмиду и получения рекомбинантного белка методом бакуловиральной экспрессии. Для наработки, очистки и детектирования рецептора использовались N-концевые пептидные последовательности: НА

(KTI¹ALSYIFCLVFA – сигнальный пептид для встраивания экспрессируемого белка в мембрану), Flag (DYKDDDD – для детектирования экспрессии антителами), 10×His для очистки на смоле, сайт TEV-протеазы (ENLYFQG) для отщепления вышеуказанных пептидов и дополнительной очистки (рисунок 1).

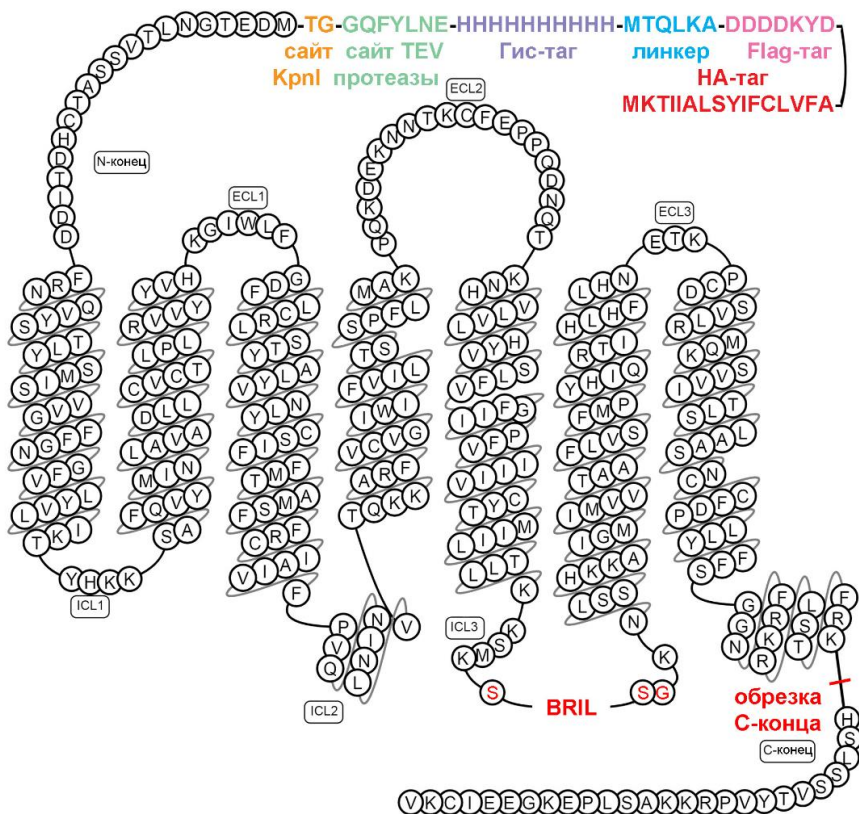


Рисунок 1. Схема кристаллизационной конструкции CysLT₁R, цветом показаны N-концевые пептидные фрагменты, место вставки BRIL, обрезка C-конца.

Оптимизация условий экспрессии

Для наработки целевого GPCR была выбрана эукариотическая система экспрессии в клетках насекомых *Spodoptera frugiperda*. Поверхностная экспрессия и титр вируса (количество вирусных частиц

в единице объема), а также количество и качество клеток измерялись методом проточной цитометрии.

Показателями для качества экспрессии служили: процент клеток, экспрессирующих белок на цитоплазматической мембране, процент живых клеток по завершении экспрессии, так как целостность мембран обеспечивала лучшее качество белка, а также объем биомассы после осаждения центрифугированием.

Параметрами для вариации служили: генетические конструкции, количество добавленного вируса, время экспрессии, выбор типа и объема колб и объема культуры в колбе, и различные добавки при экспрессии. Наибольшее влияние оказало добавление лиганда, позволившее увеличить процент поверхностной экспрессии в 2-3 раза. В результате белок нарабатывался в течение 50 часов, с добавлением 10 вирусных частиц на 1 клетку, с концентрацией лиганда зафирлукаста, равной 8 мкМ, в 1-литровых колбах в объеме 250-300 мл культуры.

После окончательной оптимизации протоколов поверхностная экспрессия CysLT₁R превышала 80%, половина клеток оставалась не лизированной вирусом, а с литра культуры получалось ~20 мл биомассы.

Оптимизация протокола очистки CysLT₁R

Метод очистки CysLT₁ рецептора заключался в следующих шагах: лизис клеток в гипотоническом буфере, последовательная отмывка мембран в гипертоническом буфере, солюбилизация при помощи мягких детергентов, и очистка методом металл-аффинной хроматографии. Работа при этом велась при 4°C [4,8].

При оптимизации протокола выделения решалось две проблемы. Первой проблемой было получение чистого препарата целевого белка. Для этого варьировались параметры центрифугирования при отмывании мембран, а также объемы буферов и смолы. Дополнительно белок обрабатывался ферментом TEV-протеазой, отрезающей N-концевые пептидные последовательности (рисунок 1), а также ферментом PNGaseF для удаления сахарных остатков N-гликозилирования, и очищался при помощи вычитающей хроматографии. В результате оптимизации протокола количество примесей не превышало 10%.

Второй проблемой было получение монодисперсного препарата, стабильного для дальнейшей кристаллизации. Степень агрегации определялась методом гель-фильтрационной аналитической хроматографии, а стабильность определялась кривыми плавления с красителем 7-диэтиламино-3-(4-малеимидофенил)-4-метилкумарином (CPM). В последнем методе измерялась температура плавления белка по увеличению флуоресценции красителя, связывающегося с остатками цистеина, экспонируемыми в раствор при денатурации рецептора. Кривая фитировалась сигмовидной функцией, и температура плавления определялась, как точка перегиба сигмоиды (рисунок 2) [17].

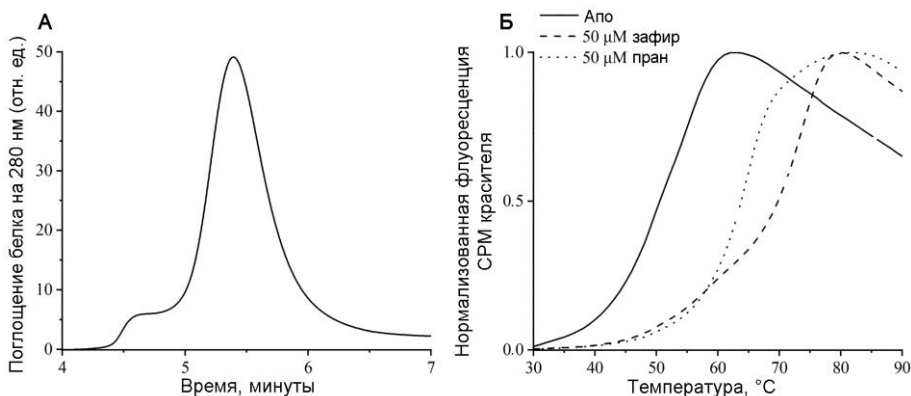


Рисунок 2. Анализ степени агрегации (А) и стабильности (Б) CysLT₁R после оптимизации протокола очистки. Показан стабилизирующий эффект лигандов, используемых при кристаллизации (Б).

Исследовалось влияние имидазола, концентрация соли и глицерина в буферах, варьировались системы мицелл с различными детергентами. Наибольший стабилизирующий эффект оказало увеличение концентрации NaCl, добавление антагонистов CysLT₁R при очистке, избавление от имидазола обессоливанием на препаративной гель-фильтрационной колонке. На степень монодисперсности влияла обработка TEV-протеазой.

В результате оптимизации мономерная фракция составляла более 90%, температура плавления превышала 70°C, а финальный выход составлял 0,4 мг очищенного белка с литра культуры.

Кристаллизация CysLT₁R

В данной работе применялся метод кристаллизации *in meso*, в котором белок смешивался с липидом до образования периодической, искривлённой, неразрывной конфигурации липидного бислоя – липидной кубической фазы, с водными каналами, заполняемыми преципитантом-осадителем. Белок, встроенный в LCP, диффундировал в мембраноподобном окружении до образования кристаллов.

Для подготовки к кристаллизации анализировалась диффузия рецептора в LCP методом восстановления флуоресценции после фотообесцвечивания [18]. Таким образом анализировалось влияние параметров очистки и кристаллизации на диффузию в LCP.

Для нахождения кристаллизационных условий и оптимизации кристаллов применялась следующая стратегия. На первом этапе при pH 5-8, с добавлением 30% полиэтиленгликоля ПЭГ400, варьировались соли из коммерческого кита HR2-245 (Hampton, США) в концентрациях 100 mM и 400 mM [18]. Затем, после обнаружения в одной из лунок кристаллов проводилась оптимизация концентрации соли выбранной лунки и ПЭГ400. Далее оптимизировался pH. После нахождения оптимума, к выбранным условиям добавлялись аддитивы из набора HR2-138 (Hampton, США). Дополнительно проверялась необходимость наличия лиганда в преципитанте, а также к преципитанту добавлялась смесь ингибиторов протеаз для избежания деградации белка.

Были получены кристаллы с 3 антагонистами: зафирлукастом, монтелукастом и пранлукастом. Кристаллы с зафирлукастом росли в фосфатных солях при высоких pH (7-8) и концентрации ПЭГ400 ~30%. Их предельно максимальный размер достигал несколько микрометров, кристаллы имели объемную кубическую форму и густо заполняли липидную фазу (рисунок 3А), типичный размер кристаллов составлял 5x2x2 мкм, поэтому дифракционные данные были получены *коллатораторами, описанными в работе*, на лазере на свободных электронах LCLS (Linac Coherent Light Source, США). Разрешение структуры составило 2,5 Å (рисунок 3Г).

Кристаллы с пранлукастом росли в нитратных солях в виде вытянутых разветвлённых иголок (рисунок 3Б). Наилучшая дифракция в 2,7 Å была получена у кристаллов, выращенных в течение 1,5-2

месяцев в нитрате лития при pH 6 с добавлением ~34% ПЭГ400 (рисунок 3Д). Типичный размер кристаллов составлял 250х15х15 мкм.

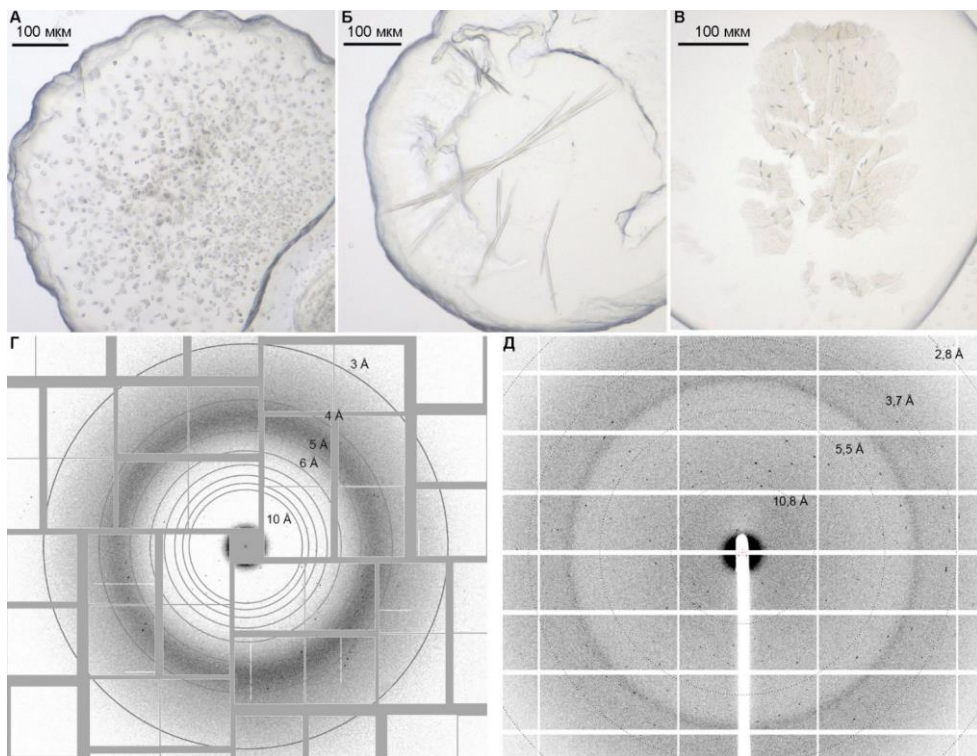


Рисунок 3. Кристаллы CysLT₁R, дифракционные данные. А-В: микрофотографии в видимом свете характерных кристаллов комплексов с зафирлукастом (А), пранлукастом (Б) и монтелукастом (В) в LCP. Дифракционные снимки для комплексов с зафирлукастом (Г) и пранлукастом (Д).

Кристаллы с монтелукастом росли в фосфатных солях с добавлением ~30% ПЭГ400 и при pH 7-7,5. кристаллы имели игольчатую форму, не превышавшую в длину 20 мкм (рисунок 3В), при этом не удалось достичь разрешения выше 4 Å и достаточного количества кристаллов для получения полного набора данных.

Анализ структуры CysLT₁R

Комплекс с пранлукастом закристаллизовался как мономер, в

моноклинной пространственной группе P2₁. Комплекс с зафирлукастом закристаллизовался, как параллельный димер, с интерфейсом взаимодействия между трансмембранными спиралями 4-6 (TM4-TM6), в триклинной пространственной группе P1.

Электронная плотность для комплекса с пранлукастом начинается с S11, а для комплекса с зафирлукастом – с D16, и заканчивается на G300 для обоих комплексов. В целом, обе структуры имеют одинаковый, канонический для GPCR, 7-спиральный фолдинг и сходные конформации. Оба комплекса были получены в неактивном состоянии с конформацией TM6, сходной с конформацией в других неактивных структурах, а также с ионом натрия, характерным для неактивного состояния [19].

Главными отличиями структур являются отклонения внеклеточного участка TM5 на 7 Å и подвижного участка внеклеточной петли 2 (ECL2) на 4 Å, вследствие различных способов связывания лигандов, а также конформации нескольких боковых цепей. Структуры были загружены в базу данных PDB (Protein Data Bank) под номерами 6RZ4 (CysLT₁R-пран) и 6RZ5 (CysLT₁R-зафир).

Особенностью, отличающей CysLT₁R от других рецепторов класса A, является **необычная комбинация функциональных мотивов** или «переключателей» из неактивного в активное состояние рецептора [20] (рисунок 4). Конформация R^{5.50}-I^{3.40}-F^{6.44} мотива и TM7 в CysLT₁R напоминают активное состояние, несмотря на связывание с антагонистом (здесь и далее в нумерации аминокислот первое число обозначает номер TM спирали, а второе – позицию на спирали; при этом номер 50 присваивается самой консервативной аминокислоте на данной спирали [21]). Такое поведение характерно для подкласса δ-ветви, включающего CysLT₁R рецептор, где механизм активации рецепторов отличается от известного механизма для класса A и ещё до конца не изучен [16,22]. Аргинин мотива D^{3.49}R^{3.50}Y^{3.51} ориентирован отлично как от активного, так и от неактивного состояний, а также его конформация различается между двумя структурами, а тирозин мотива D^{7.49}R^{7.50}XY^{7.53} ориентирован в сторону 8 спирали, чья плотность не разрешена в обеих структурах. Анализ полученных данных говорит об уникальной роли мотивов-переключателей в функционировании

CysLT₁ рецептора.

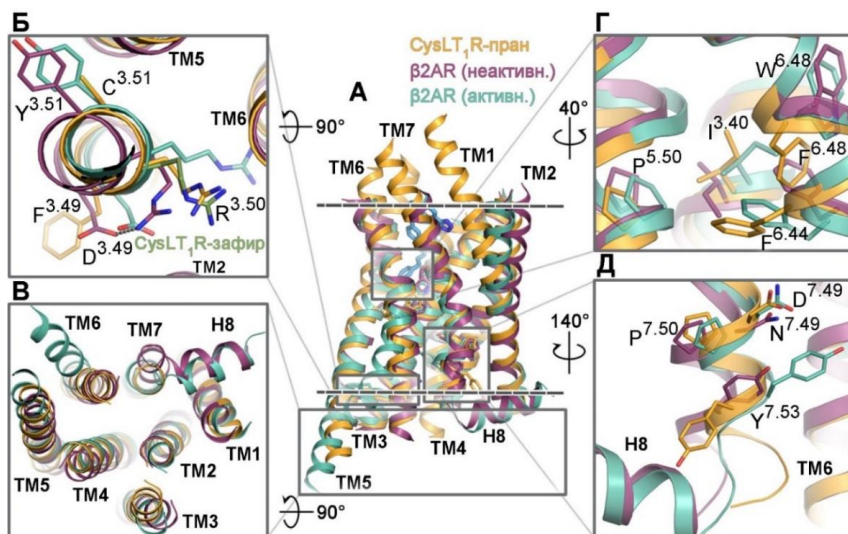


Рисунок 4. Функциональные мотивы CysLT₁R. Наложение CysLT₁R-пран (оранжевый) с β ₂ адренергическим рецептором в активном (бирюзовый, PDB ID 3SN6) и неактивном (фиолетовый, PDB ID 2RH1) состояниях. А: общий вид сбоку. Б: DRY мотив. R^{3.50} также показан для комплекса с зафирлукастом (салатовый). В: внутриклеточная область. Г: P-I-F-мотив. Д: NPxxY мотив.

Несмотря на то, что ион натрия играет ключевую роль в активации GPCR класса А и **сайт связывания натрия** является одним из самых консервативных мотивов этой группы рецепторов [19], Na⁺ был разрешён всего в нескольких структурах. Карман натрия CysLT₁R существенно отличается от наблюдаемых ранее. Расположение иона на 1,5 Å сдвинуто в сторону цитоплазмы, что характерно для GPCR δ -ветви. Уникальность сайта в CysLT₁R заключается в том, что он напрямую координируется четырьмя аминокислотными остатками, в то время как чаще всего – двумя и изредка – тремя аминокислотами. Было показано специфичное связывание Na⁺ CysLT₁ рецептором путём измерения эффекта стабилизации белка ионом, и измерена EC₅₀ стабилизации, равная 39±11 mM (рисунок 5). Таким образом, полученные данные установили несомненную важность роли натрия в

функционировании CysLT₁R.

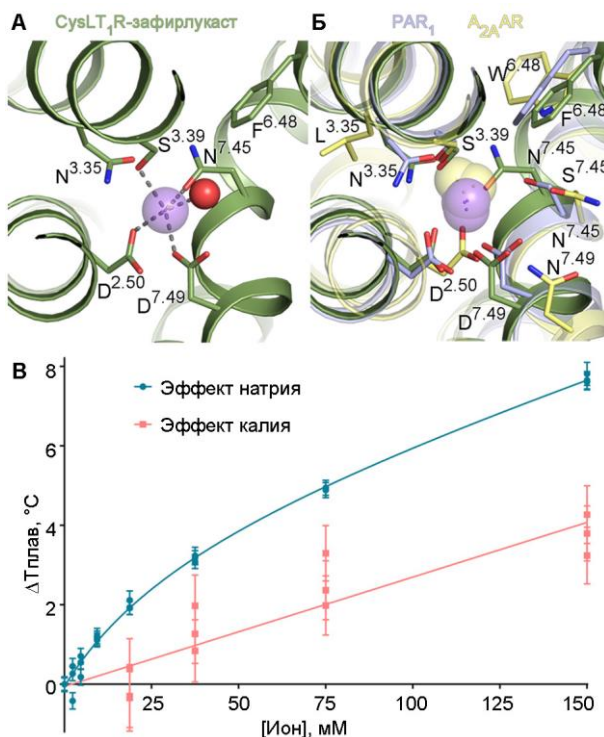


Рисунок 5. Сайт связывания Na⁺. А: комплекс CysLT₁R-зафир; показаны связи Na⁺ (фиолетовая сфера) с боковыми цепями координирующих аминокислот, а также молекула воды (красная сфера). Б: наложение структур CysLT₁R, PAR₁ (фиолетовый, PDB ID 3VW7) и A_{2A}AR (желтый, PDB ID 4EIY). Na⁺ показаны фиолетовым для белков δ-ветви (CysLT₁R, PAR₁, PAR₂ – PDB ID 5NDD) и желтым для рецепторов класса α- и γ-ветвей (A_{2A}AR, β₁AR (индейка) – PDB ID 4BVN, DOR – PDB ID 4N6H). В: Связывание CysLT₁R с Na⁺ и K⁺. Зависимость температуры плавления белка от концентрации ионов для Апо формы кристаллизационной конструкции.

Лиганды зафирлукаст и пранлукаст существенно различны по их химической структуре и, несмотря на схожесть позиций связывания, проявляют существенную вариацию контактов внутри пакета. **Карман**

связывания лиганда для обеих структур, CysLT₁R-зафир и CysLT₁R-пран, тянется от внеклеточной петли 2 через весь рецептор до расхождения между ТМ4 и 5, глубоко уходя в трансмембранный каркас. Часть кармана, обращенная вглубь белка, выстлана полярными и заряженными остатками, взаимодействующими с лигандами (рисунок 6).

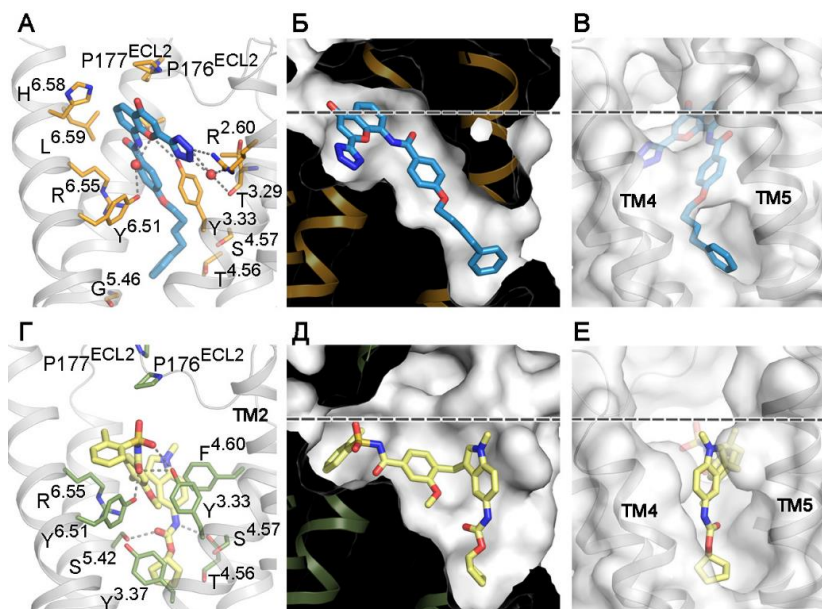


Рисунок 6. Лиганд-связывающий карман CysLT₁. А-В – комплекс с пранлукастом, Г-Е – с зафирлукастом. А, Г: Контакты белка с лигандами; Б, Д: форма кармана комплексов, В, Е: область входа лигандов через липидный бислой.

В комплексе CysLT₁R-пран протяженная фенил-бутильная цепь лиганда полностью заключена внутри 7-ТМ каркаса, и лишь небольшое отверстие открывается между Т154^{4.56} и V192^{5.41} в сторону липидного бислоя. В комплексе CysLT₁R-зафир происходит существенное смещение (~7 Å) внеклеточного конца ТМ5 и, как следствие, перестроение ECL2, что приводит к раскрытию трансмембранного каркаса, которое стабилизируется связыванием зафирлукаста.

Для липидных рецепторов боковой вход лигандов через

мембрану является основной рабочей гипотезой, в отличие от традиционного входа из внеклеточного пространства, с отгибанием второй внеклеточной петли [23]. Для комплекса CysLT₁R-зафир был напрямую обнаружен отгиб TM5, обеспечивающий латеральный заход антагониста, и было впервые экспериментально зафиксировано открытое состояние кармана (рисунок 6).

В «Заключении» диссертационной работы представлены основные выводы.

ОСНОВНЫЕ ВЫВОДЫ РАБОТЫ

1. Проанализирована методология структурных исследований рецепторов, сопряженных с G-белком, а также современные успехи в исследовании цистеинил-лейкотриенового рецептора 1 человека.
2. Проведён анализ генетических конструкций CysLT₁R с вариацией длин N- и C- концов белка, точечных мутаций, а также позиции белков-партнёров на N-конце и в третьей внутриклеточной петле в целях получения стабильного, монодисперсного белка, пригодного для кристаллизации методом *in meso*.
3. Оптимизирован протокол экспрессии CysLT₁R при помощи бакуловирусной системы экспрессии в эукариотической клеточной линии Sf9.
4. Разработан протокол очистки белка, результатом которого было получение CysLT₁R в количестве 0,4 миллиграмма с литра культуры, с количеством примесей менее 10%, степенью агрегации менее 10% и температурой плавления выше 70°C.
5. Подобраны условия кристаллизации и получены кристаллы для комплексов CysLT₁R-зафир, CysLT₁R-пран, CysLT₁R-мон.
6. Получены дифракционные данные CysLT₁ рецептора с антагонистами, зафирлукастом и пранлукастом, с разрешением 2,5 и 2,7 Å, соответственно.
7. Проведён анализ структур: определены основные контакты, обеспечивающие связывание лиганда, а также выявлен его латеральный заход в карман. Обнаружен необычный механизм активации рецептора, заключающийся в активной конформации некоторых мотивов-переключателей рецептора, стабилизированного в неактивном

состоянии, а также в жесткой координации Na^+ напрямую четырьмя аминокислотными остатками.

Личный вклад соискателя состоит в выполнении экспериментальных и теоретических исследований в создании генетической конструкции, экспрессии, очистке, кристаллизации CysLT₁R, получении дифракционных данных, анализе результатов функциональных тестов и молекулярного моделирования, а также исследовании пространственной структуры рецептора.

Благодарности

Автор работы искренне благодарна всем коллегам и соавторам, в особенности Мишину А., Гусач А., Марьину Е., Попову П., Сэррэ Ф., Устиновой С., Горделию В., Катричу В. и Борщевскому В., а также научному руководителю, Черезову Вадиму Геннадьевичу.

Основные результаты диссертационной работы изложены в следующих публикациях:

Статьи по теме диссертации:

- 1) Lyukmanova EN, Shenkarev ZO, Shulepko MA, Mineev KS, D'Hoedt D, Kasheverov IE, Filkin SY, Krivolapova AP, Janickova H, Dolezal V, Dolgikh DA, Arseniev AS, Bertrand D, Tsetlin VI, Kirpichnikov MP. NMR structure and action on nicotinic acetylcholine receptors of water-soluble domain of human LYNX1. *J Biol Chem.* (2011); 286(12):10618-27. doi: 10.1074/jbc.M110.189100.
- 2) A. V. Mishin, A. P. Luginina, A. P. Potapenko, V. I. Borshchevskiy, V. Katritch, E. Edelweiss, I. S. Okhrimenko, V. I. Gordeliy, and V. G. Cherezov. Expression and Purification of an Engineered Human Endothelin Receptor B in a Monomeric Form A. *Doklady Biochemistry and Biophysics.* (2016), 467(1):157-61. DOI: 10.1134/S1607672916020216
- 3) A. Mishin, A. Gusach, A. Luginina, E. Marin, V. Borshchevskiy & V. Cherezov, An outlook on using serial femtosecond crystallography in drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery.* (2019), 14:933-945. DOI: 10.1080/17460441.2019.1626822
- 4) A. Luginina, A. Gusach, E. Marin, A. Mishin, R. Brouillette, P. Popov, A. Shiriaeva, É. Besserer-Offroy, J.-M. Longpré, E. Lyapina, A. Ishchenko, N. Patel, V. Polovinkin, N. Safronova, A. Bogorodskiy, E.

Edelweiss, H. Hu, U. Weierstall, W. Liu, A. Batyuk, V. Gordeliy, G. W. Han, P. Sarret, V. Katritch, V. Borshchevskiy, and V. Cherezov. Structure-Based Mechanism of Cysteinyl Leukotriene Receptor Inhibition by Antiasthmatic Drugs. *Science Advances*. (2019), 5:eaax2518. DOI: 10.1126/sciadv.aax2518

Тезисы и сборники трудов международных конференций по теме диссертации:

- 1) Expression, purification and functional analyses of human CysLT1 and GPR17 proteins, A. Luginina, Mishin A., A. Gusach, V. Cherezov, V. Borshchevskiy; FEBS Congress 2014, Париж, Франция, 2014.
- 2) Expression and purification of the human endothelin receptor B for structural studies. A. Mishin, A. Luginina, A. Potapenko, A. Gusach, V. Borshchevskiy, V. Cherezov, V. Gordeliy; FEBS Congress 2014, Париж, Франция, 2014.
- 3) Structural Studies of Cysteinyl Leukotriene G Protein Coupled Receptors. Gusach A., Luginina A., Mishin A., Vartanian N., Cherezov V.; The 3rd Shanghai GPCR forum, Сучжоу, Китай, 2015.
- 4) Pre-crystallization preparation of human endothelin receptor type B. Mishin A., Astashkin R., Vartanyan N., Luginina A., Gusach A., Ishchenko A., Popov P., Polovinkin V., Bogorodskiy A., Ergasheva M., Shevtsov M., Edelweiss E., Borshchevskiy V., Gordeliy V., Katritch V., Cherezov V.; Biomembranes 2016, Долгопрудный, Россия, 2016.
- 5) Role of G Protein-Coupled Receptors in the Molecular Mechanisms of Aging. Mishin A., Luginina A., Shevtsov M., Gusach A., Astashkin R., Vartanyan N., Ergasheva M., Okhrimenko I., Ilyinsky N., Kuzmichev P., Popov P., Borshchevskiy V., Gordeliy V., Cherezov V.; INTERNATIONAL CONFERENCE «BIOMEDICAL INNOVATION FOR HEALTHY LONGEVITY», Санкт-Петербург, Россия, 2016.
- 6) Human CysLT1 expression, purification, crystallization. A.P. Luginina, A.Yu. Gusach, A.V. Mishin, N.A. Vartanyan, R.O. Astashkin, A.O. Bogorodskiy, M.M. Ergasheva, V.I. Borshchevskiy, V. Cherezov. III International Conference on Small Angle Neutron Scattering dedicated to the 80th anniversary of Yu.M. Ostanevich, Joint Institute for Nuclear Research, Дубна, Россия, 2016.

- 7) Gusach A., Luginina A., Mishin A., Ishchenko A., Popov P., Borshchevskiy V., Gordeliy V., Katritch V., Cherezov V. Expression, purification and stability assays of human cysteinyl leukotriene receptor type 2, Biomembranes 2016, Долгопрудный, Россия, 2016.
- 8) Genetic engineering, expression and purification of human GPR17 (GPCR) constructs. Vartanyan N., Luginina A., Gusach A., Mishin A., Ergasheva M., Cherezov V.; Biomembranes 2016, Долгопрудный, Россия, 2016.
- 9) Expression and Purification of a human ETB receptor bound to selective antagonists; AV Mishin, AP Luginina, RO Astashkin, AYU Gusach, VI Borshchevskiy, VI Gordeliy, V. Katritch, VG Cherezov; GLISTEN SYMPOSIUM, Порто, Португалия, 2017.
- 10) Study of structure and binding kinetics of human adenosine A2A receptor with novel ligands, A. Burdakova, E. Lyapina, N. Safronova, A. Gusach, A. Luginina, M. Semelina, R. Astashkin, M. Shevtsov, A. Mishin; FEBS Congress 2017, Иерусалим, Израиль, 2017.
- 11) , Crystallization trials of human endothelin receptor B. E. Lyapina, N. Safronova, A. Burdakova, A. Gusach, A. Luginina, M. Semelina, R. Astashkin, M. Shevtsov, A. Mishin, V. Cherezov; FEBS Congress 2017, Иерусалим, Израиль, 2017.
- 12) Receptors involved in immune response. A. Luginina, 5th Annual iHuman Forum; ShanghaiTech; Шанхай; Китай, 2017. Награда за лучший доклад.
- 13) Microscale thermophoresis as a ligand binding assay for GPCRs; Mishin A.V., Luginina A.P., Gusach A.Yu., Marin E., Safronova N.A., Lyapina E, Semelina M.M., Shevtsov M.B., Gordeliy V.I., Borshchevskiy V., Cherezov V.; 5th Annual iHuman Forum; ShanghaiTech; Шанхай; Китай, 2017.
- 14) Application of microscale thermophoresis to GPCRs. A.Mishin, A. Gusach, P. Khorn, A. Luginina, M. Shevtsov, V. Borshchevskiy, V. Cherezov.; 26th Protein Structure Determination in Industry conference, Париж, Франция, 2017.
- 15) Role of sodium allosteric binding site in GPCR function. A. Luginina, A. Gusach, A. Mishin, E. Marin, E. Lyapina, P. Popov, V.

Borshchevskiy, V. Katritch, V. Cherezov; Chemistry, structure and functions of biomolecules. Минск, Беларусь, 2018.

16) Structural studies of G-protein coupled receptors in Moscow Institute of Physics and Technology, A. Gusach, A. Luginina, A. Mishin, V. Borshchevskiy, E. Marin, M. Shevtsov, A. Stepko, N. Safronova, E. Lyapina, P. Popov, V. Gordeliy, V. Cherezov; Chemistry, structure and functions of biomolecules. Минск, Беларусь, 2018.

17) Effects of mono- and divalent cations on GPCR stability, Luginina AP, Gusach AY, Mishin AV, Marin EV, Popov PA, Lyapina EA, Katritch VY, Borshchevskiy VI, Cherezov V; Biomembranes 2018, Долгопрудный, Россия, 2018.

18) Optimization of G protein-coupled receptor expression for functional studies. Gusach A, Luginina A, Lyapina E, Shevtsov M, Safronova N, Khorn P, Borshchevskiy V, Mishin A, Cherezov V; Biomembranes 2018, Долгопрудный, Россия, 2018.

19) Successful GPCR structure determination using PAL XFEL 47 Marin E, Gusach A, Luginina A, Kovalev K, Liu W, Weierstall U, Hyun Nam K, Cho Y, Mishin A, Borshchevskiy V, Cherezov V; Biomembranes 2018, Долгопрудный, Россия, 2018.

20) G-protein coupled receptors engineering for structural analysis. A. Luginina, A. Gusach, V. Borshchevskiy, A. Mishin; RICCEM 2019, Москва, Россия.

21) Cryo electron microscopy of G-protein coupled receptors complexes for drug discovery approaches. A. Gusach, A. Luginina, V. Borshchevskiy, A. Mishin; RICCEM 2019, Москва, Россия.

22) Modern membrane mimetic systems for Cryo-EM based structural analysis. E. Kolesnikov, P. Khorn, A. Gusach, A. Luginina, A. Mishin; RICCEM 2019, Москва, Россия.

23) Mass Spectrometry approach for GPCR ligand screening. A. Gusach, O. Sukhacheva, P. Khorn, A. Luginina, A. Leonova, E. Lyapina, G. Khusainov, V. Borshchevskiy, A. Mishin, V. Cherezov; FEBS Congress 2019, Краков, Польша, 2019.

24) Structural insights into human CysLTR1 GPCR receptor. A. Luginina, A. Gusach, E. Marin, A. Mishin, P. Popov, V. Borshchevskiy and

V. Cherezov. FEBS advance course on Biochemistry of Membrane Proteins, Будапешт, Венгрия, 2019. Награда за лучший стендовый доклад.

25) Structural basis of ligand selectivity and disease-related mutations in human Cysteinyl Leukotriene Receptors revealed by X-ray crystallography. A. Gusach, A. Luginina, E. Marin, R.L. Brouillette, É. Besserer-Offroy, J.M. Longpré, P. Popov, G.W. Han, V. Katritch, V. Borshchevskiy, P. Sarret, A. Mishin, V. Cherezov. GPCR retreat 2019, Бромон, Канада, 2019.

Список цитируемой литературы

[1] Dorsam RT, Gutkind JS. G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat. Rev. Cancer*. 2007;7:79–94.

[2] Filmore D. It's a GPCR world. *Mod. Drug Discov*. 2004;7:24–27.

[3] Filipek S. Molecular switches in GPCRs. *Curr. Opin. Struct. Biol*. 2019;55:114–120.

[4] Stevens RC, Cherezov V, Katritch V, et al. The GPCR Network: a large-scale collaboration to determine human GPCR structure and function. *Nat. Rev. Drug Discov*. 2013;12:25–34.

[5] Hanson MA, Brooun A, Baker KA, et al. Profiling of membrane protein variants in a baculovirus system by coupling cell-surface detection with small-scale parallel expression. *Protein Expr. Purif*. 2007;56:85–92.

[6] Segala E, Guo D, Cheng RKY, et al. Controlling the Dissociation of Ligands from the Adenosine A2A Receptor through Modulation of Salt Bridge Strength. *J. Med. Chem*. 2016;59:6470–6479.

[7] Cusack S, Belrhali H, Bram A, et al. Small is beautiful: protein micro-crystallography. *Nat. Struct. Biol*. 1998;5:634–637.

[8] Cherezov V, Rosenbaum DM, Hanson MA, et al. High-Resolution Crystal Structure of an Engineered Human b2-Adrenergic G Protein-Coupled Receptor. *Science*. 2007;318:1258–1265.

[9] Chun E, Thompson AA, Liu W, et al. Fusion Partner Toolchest for the Stabilization and Crystallization of G Protein-Coupled Receptors. *Structure*. 2012;20:967–976.

[10] Rasmussen SGF, Choi H-J, Fung JJ, et al. Structure of a nanobody-stabilized active state of the β_2 adrenoceptor. *Nature*. 2011;469:175–180.

[11] Pándy-Szekeres G, Munk C, Tsonkov TM, et al. GPCRdb in 2018: adding GPCR structure models and ligands. *Nucleic Acids Res*.

2018;46:440–446.

[12] Popov P, Peng Y, Shen L, et al. Computational design of thermostabilizing point mutations for G protein-coupled receptors. *Elife*. 2018;7:1–22.

[13] Zhang H, Unal H, Gati C, et al. Structure of the Angiotensin Receptor Revealed by Serial Femtosecond Crystallography. *Cell*. 2015;161:833–844.

[14] Liang Y-L, Khoshouei M, Radjainia M, et al. Phase-plate cryo-EM structure of a class B GPCR–G-protein complex. *Nature*. 2017;546:118–123.

[15] Back M, Dahlen S-E, Drazen JM, et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXIV: Leukotriene Receptor Nomenclature, Distribution, and Pathophysiological Functions. *Pharmacol. Rev.* 2011;63:539–584.

[16] Zhang J, Zhang K, Gao Z, et al. Agonist-bound structure of the human P2Y₁₂ receptor. *Nature*. 2014;509:119–122.

[17] Alexandrov AI, Mileni M, Chien EYT, et al. Microscale Fluorescent Thermal Stability Assay for Membrane Proteins. *Structure*. 2008;16:351–359.

[18] Xu F, Liu W, Hanson MA, et al. Development of an Automated High Throughput LCP-FRAP Assay to Guide Membrane Protein Crystallization in Lipid Mesophases. *Cryst. Growth Des.* 2011;11:1193–1201.

[19] Katritch V, Fenalti G, Abola EE, et al. Allosteric sodium in class A GPCR signaling. *Trends Biochem. Sci.* 2014;39:233–244.

[20] Katritch V, Cherezov V, Stevens RC. Structure-Function of the G Protein–Coupled Receptor Superfamily. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2013;53:531–556.

[21] Ballesteros JA, Weinstein 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;25:366–428.

[22] Zhang D, Gao Z-G, Zhang K, et al. Two disparate ligand-binding sites in the human P2Y₁ receptor. *Nature*. 2015;520:317–321.

[23] Woolley MJ, Conner AC. Understanding the common themes and diverse roles of the second extracellular loop (ECL2) of the GPCR superfamily. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2017;449:3–11.