

На правах рукописи

Гусач Анастасия Юрьевна

**СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО
ЦИСТЕИНИЛ-ЛЕЙКОТРИЕНОвого РЕЦЕПТОРА
ВТОРОГО ТИПА ДЛЯ СОЗДАНИЯ НОВЫХ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ**

Специальность **03.01.02** – Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Москва – 2020

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, Московского физико-технического института.

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

Защита состоится «21» марта 2020 года в 14:00 на заседании диссертационного совета ЛФИ.03.01.02.002 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 «13» января 2020 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

Создание лекарств часто ассоциируется с состязанием больших игроков – фармацевтических компаний, располагающих огромными ресурсами и закрытыми технологиями. Это подкрепляется данными о миллиардных затратах на выведение на рынок препаратов, неизбежных при современных требованиях к их безопасности и стандартах клинических испытаний. При этом история большинства лекарств обычно начинается с экспериментов ученых в лабораториях, с эмпирических наблюдений, построения и валидации моделей болезней. Как и в начале 20 века в примере с Флемингом и пенициллином, до сих пор большинство идей для новых препаратов приходят из академической среды.

Идентификация мишени будущего лекарства и установление механизма действия кандидатов в лекарства – наименее финансово затратные шаги в долгом процессе [1]. Тем не менее, часто именно они определяют успех кандидата на более поздних стадиях [1]. Только малая доля кандидатов проходит все стадии, и цена ошибки растет на каждом этапе. К тому же даже при относительно небольшой стоимости валидации одной мишени, умножение этой стоимости на их количество может вызвать у компаний большие затраты на стадиях исследования и разработки. Любые способы сокращения этих затрат имеют огромное практическое значение, к примеру, обращение к опубликованным результатам научных групп о белках-мишенях и использование новых научных методов для поиска малых молекул и их скрининга.

Рентгеновская кристаллография белков, возникшая в 20 веке, – один из таких методов, появившийся на стыке физики и биологии. Развитие биологических методик клонирования, экспрессии белков и кристаллизации позволило получать кристаллы достаточного размера, а развитие физики ускорителей, технических характеристик детекторов и методов доставки образцов – снимать данные дифракции и строить модели биологических молекул [2].

С появлением возможности использовать структурную информацию о мишенях для поиска новых кандидатов в лекарства методами докинга и виртуального скрининга, многие фармацевтические компании стали отдавать предпочтение компьютерным методам поиска кандидатов в лекарства на первых этапах драг-дизайна [3,4]. Это существенно сокращает затраты на лабораторные эксперименты и расширяет количество веществ, доступных для рассмотрения.

Для более точного виртуального скрининга как раз и нужны структуры высокого разрешения, получаемые методом рентгеновской дифракции. За более чем полувековую историю белковой кристаллографии разработано большое количество методов кристаллизации и получены структуры очень многих белков, особенно это касается водорастворимых ферментов, сигнальных, структурных белков. Мембранные же белки, особенно клеточные рецепторы, долгое время были и остаются самыми сложными мишенями для кристаллизации в силу их низкой стабильности, конформационной подвижности и амфифильной природы [5].

Самым большим семейством мембранных белков в организме человека являются рецепторы, сопряженные с G-белком (англ. G protein-coupled receptor, GPCR) [6]. Активируясь внешними сигнальными молекулами, такими как различные гормоны, феромоны, липиды, нейромедиаторы и другие, они передают информацию о событиях связывания внутрь клетки путем активации сигнальных каскадов реакций. Сбои в работе сигнальных систем GPCR приводят к многочисленным патологиям [7].

Из-за своей исключительной роли в организме, а также способности малых молекул влиять на вызванный ими клеточный ответ, GPCR оказались очень удачными кандидатами в мишени для терапии. Почти 40% всех лекарств направлены на представителей этого класса рецепторов [7]. Тем более долгожданными были их структуры высокого разрешения для использования в качестве основы виртуального скрининга кандидатов в лекарства. Но даже после публикации в 2000 году первой структуры бычьего родопсина [8], значительный технический прогресс потребовался для разработки методов стабилизации и кристаллизации GPCR. Использование партнерных белков-драйверов кристаллизации и липидной кубической фазы в качестве носителя для кристаллизации было прорывом во всей области и вылилось в структуру β 2-адренергического рецептора в 2007 году [9]. Каждый последующий год количество структур росло и сейчас их уже насчитывается более 300, представляющих около 70 уникальных рецепторов (<https://gpcri.org/structure/statistics>).

Актуальность получения структурной информации для человеческого CysLT₂ рецептора для создания новых антагонистов

На середину 2019 года структуры высокого разрешения получены менее, чем для 10% от всех человеческих GPCR, и все еще не удается построить достоверную модель лиганд-связывающего кармана для каждого нового из них по гомологии, поэтому задача нахождения новых структур этого класса рецепторов была и остается очень актуальной [10].

На начальном этапе структурных исследований GPCR внимание ученых было сфокусировано на хорошо изученных фармакологами мишенях с большим количеством уже существующих лигандов и лекарств. Затем фокус стал смещаться в сторону малоизученных рецепторов с перспективами создания новых синтетических лигандов. Особенно актуальны структуры недавно открытых рецепторов, для которых показана их роль в болезнях, но не существует лекарств, ориентированных на них [11].

Одним из таких рецепторов является цистеинил-лейкотриеновый рецептор второго типа (CysLT₂R), впервые клонированный в 2000 году [12]. CysLT₂R вместе с ближайшим гомологом CysLT₁R отвечают за взаимодействие с цистеиниловыми лейкотриенами LTC₄, LTD₄ и LTE₄ – липидными медиаторами воспаления, производными арахидоновой кислоты [13].

CysLT₁R имеет несколько селективных антагонистов — зафирлукаст, пранлукаст и монтелукаст, которые были одобрены в качестве антиастматических препаратов [14]. Однако оказывается, что часть пациентов не реагирует на эту терапию [15]. У двух подтипов рецепторов наблюдаются различные профили экспрессии, распределение в тканях и чувствительность к эндогенным лигандам [16,17]. Вместе с этим гетеродимеризация и перекрестная регуляция, а также распространенность ассоциированных с астмой полиморфизмов в CysLT₂R предполагают различную роль для каждого из подтипов CysLTR в физиологии и патологии [18–20]. На основании модели астмы у животных, вызванной воздействием LTC₄, было предложено, что CysLT₂R-селективные или двойные CysLT₁R/CysLT₂R антагонисты могут улучшить лечение тяжелых случаев астмы [21]. Кроме того, избирательное ингибирование CysLT₂R, преимущественно экспрессируемого в сердечно-сосудистой и мозговой тканях, показало позитивный эффект при ишемических состояниях и острых повреждениях головного мозга [22]. Разработка более эффективных методов

лечения астмы и связанных с ней заболеваний затрудняется отсутствием знаний о селективности и функциональных механизмах CysLTR, что требует структурных данных высокого разрешения.

Основные цели и задачи исследования

Первоначальной и основной целью данной диссертационной работы было установление пространственной структуры высокого разрешения человеческого цистеинил-лейкотриенового рецептора второго типа. Эта работа вместе с работой по исследованию CysLT₁R является первым примером полного структурного исследования GPCR рецептора от клонирования и до анализа структуры как в нашей лаборатории, так и в России. Поэтому параллельно стояла задача отладки всех стадий процесса и методов, никогда до этого не используемых в научной группе, таких как оптимизация экспрессии в клеточной линии насекомых, подбор условий сольubilизации и очистки белка, оптимизация кристаллизационных условий, разработка алгоритма предсказания стабилизирующих мутаций, скрининга лигандов, снятия данных дифракции методом слияния частичных наборов данных для получения структур максимального разрешения. После получения структур стало ясно, что задача расширилась до составления модели взаимодействия лигандов с цистеинил-лейкотриеновыми рецепторами, подтвержденной большим количеством данных функциональных тестов *in vivo* и *in vitro*. Особый интерес появился к аспектам, связанным с созданием лекарств, ориентированных на данный рецептор, поэтому большая часть литературного обзора посвящена процессу драг-дизайна. Опубликованные в 2016 году данные [23] об участии мутантного рецептора в патогенезе увеальной меланомы вылились в задачу объяснения эффекта этой мутации из структуры, далее идея была расширена все известные из литературы болезнетворные мутации.

Научная новизна

В работе впервые отработана экспрессия человеческого цистеинил-лейкотриенового рецептора 2 типа в клетках насекомых *Sf9*, исследованы и оптимизированы условия экспрессии. Для стабилизации белка и потенциального создания кристаллизационных контактов созданы химерные конструкции с различными партнерными белками – драйверами кристаллизации. Произведена экспрессия в *Sf9* и далее очистка и скрининг всех вариантов. Охарактеризованы

биофизические свойства: стабильность, гомогенность, термостабильность. Впервые показан эффект увеличения выхода белка в несколько раз при укорачивании N-концевой последовательности CysLT₂R без потери функциональности. Различными методами были предложены несколько десятков стабилизирующих мутаций, не описанных в литературе. Их экспериментально подтвержденный эффект позволил комбинированием нескольких мутаций добиться существенного увеличения термостабильности рецептора. Впервые протестированы более 20 высокоаффинных лигандов, специально синтезированных соавторами, проведено сравнение с коммерчески доступными селективными лигандами. Охарактеризован и ранжирован их стабилизирующий эффект для очищенного препарата белка. Сочетание лучшей конструкции с лучшими из новых синтезированных лигандов позволило добиться сначала хорошей диффузии в липидной кубической фазе, а затем и роста кристаллов. Получение 4 структур высокого разрешения в комплексе с 3 неспецифичными антагонистами CysLT₁/CysLT₂ рецепторов позволило пролить свет на вопрос о специфичности связывания лигандов и описать структурные особенности CysLT₂ рецептора и его лиганд-связывающего кармана. Впервые установлены структурные особенности замен аминокислот, вызванных однонуклеотидными полиморфизмами. Кристаллическая структура CysLT₂R также помогла пониманию влияния мутаций рецептора, вызывающих злокачественные образования и склонность к болезням.

Теоретическая и практическая значимость

Уникальный пример быстрой трансляции результатов научных исследований в практическое применение — это созданный в 2014 году GPCR консорциум (<http://gpcrconsortium.org/>). Он объединил усилия нескольких научно-исследовательских групп-лидеров в структурной биологии GPCR и фармацевтических компаний. Компании-члены консорциума номинировали несколько наиболее актуальных для фармацевтической индустрии мишеней и предоставляли ученым закрытые наработки в области лигандов для повышения успеха кокристаллизации.

В 2016 году в качестве мишени консорциума компанией Ono Pharmaceutical был номинирован человеческий цистеинил-лейкотриеновый рецептор второго типа. Наработки в области экспрессии и стабилизации цистеинил-лейкотриеновых рецепторов нашей группы и в том числе автора

диссертации позволили МФТИ вступить в GPCR консорциум. Автору работы были предоставлены высокоаффинные лиганды от компании Ono Pharmaceutical, которые помогли стабилизировать рецептор и получить ряд кокристаллических структур. Также на основании полученных структур нашей группой были проанализированы данные компании и объяснены тренды в селективности между двумя подтипами цистеинил-лейкотриеновых рецепторов, чего не удавалось до этого. Несомненно, структуры послужат для дальнейшего улучшения существующих кандидатов в лекарства и помогут создать первые препараты, нацеленные на CysLT₂ рецептор.

Методология и методы исследования

В работе были использованы следующие методы и технологии:

- Генно-инженерные методы модификации белков: удаления и внесения последовательностей аминокислот в ген белка, введение точечных мутаций, автоматизированный анализ аминокислотных последовательностей для предсказания стабилизирующих модификаций белка.
- Бакуловирусная система экспрессии рекомбинантных белков в клетках насекомых штамма *Sf9*, метод проточной цитометрии для характеристики поверхностной и полной экспрессии мембранного рецептора в клетках *Sf9*, а также количественных характеристик вируса.
- Выделение мембранной фракции путем лизиса клеток с последующей отмывкой в буферах с различной ионной силой, солюбилизация рецептора из мембран в растворе детергента, очистка белка в мицеллах металл-аффинной хроматографией, исследование монодисперсности и выхода белка методом аналитической гель-фильтрации.
- Электрофоретический анализ чистоты, иммуноблоттинг, аналитическая гель-фильтрационная хроматография, исследование стабильности рецептора в присутствии лигандов и без методом измерения кривых плавления.
- Исследование диффузии белка в липидной кубической фазе методом восстановления флуоресценции после фотообесцвечивания.
- Кристаллизация мембранного белка в липидной кубической фазе
- Микрофокусная кристаллография на синхротронных источниках рентгеновского излучения
- Уточнение кристаллографических данных, получение структуры
- 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. Модификации человеческого CysLT₂ рецептора, обеспечивающие достаточную для кристаллизации стабильность и гомогенность: набор из термостабилизирующих точечных мутаций (W1.45V, D2.50N, F3.51Y), удаление аминокислотных остатков M1-E16 и G323-V346, вставка партнерного белка BRIL в третью внутриклеточную петлю между E232 и V240
2. Условия экспрессии рекомбинантного человеческого CysLT₂ рецептора в клеточной линии Sf9, обеспечивающие выход 1.6 мг гомогенного мономерного белка с литра клеточной культуры, оптимизированные по времени экспрессии, плотности клеток, соотношению вирусы:клетки и концентрации добавленного лиганда BayCysLT2
3. Условия солюбилизации и очистки CysLT₂ рецептора, оптимизированные по концентрациям солей и буферов, pH, концентрации детергента и лигандов, обеспечивающие достаточную для кристаллизации стабильность и монодисперсность
4. Условия кристаллизации в липидной кубической фазе оптимизированной химерной конструкции человеческого CysLT₂ рецептора с набором неселективных CysLT₁/CysLT₂ антагонистов
5. Четыре структуры высокого разрешения человеческого CysLT₂ рецептора в комплексе с неселективными CysLT₁/CysLT₂ антагонистами с разрешением 2.4 Å (CysLT₂R-L, C222₁ и f222), 2.7 Å (CysLT₂R-O, CysLT₂R-S)
6. Гипотетический механизм селективности цистеиниловых лейкотриенов к рецепторам CysLT₁ и CysLT₂, выдвинутый на основе анализа полученных в работе структур

Степень достоверности и апробация результатов

Все данные литературного обзора опираются на публикации в ведущих мировых рецензируемых журналах, индексируемые базами данных Web of Sciences, Scopus и РИНЦ, либо общепринятые учебники и книги по фармакологии, кристаллографии и медицинской химии. Приведенные экспериментальные данные проверялись общепринятыми статистическими критериями и проводились повторные эксперименты для подтверждения воспроизводимости. Структуры высокого разрешения уточнялись согласно стандартам, принятым мировым сообществом белковых кристаллографов. Промежуточные результаты работы были представлены на 27 международных научных конференциях, в том числе в виде 5 устных докладов. Результаты анализа структур опубликованы в 2 статьях в журнале Science Advances и Nature Communications, а обзор новейших методов структурной биологии в создании лекарств – в журнале Expert Opinion on Drug Discovery.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, трех глав, разделенных на подглавы, и заключения.

Первая глава – литературный обзор, призванный познакомить читателя с алгоритмом создания новых лекарств с уклоном в использование биофизических методов на всех этапах процесса. Акцент этой части обзора – на применение рентгеновской кристаллографии для драг-дизайна, основанного на структуре. Такой подход успешно используется для актуальных мишеней фармацевтики, таких как, например, рецепторы, сопряженные с G-белком. Для этого класса белков описана актуальность их исследований, фармакологические аспекты и механизм активации. Один из представителей этого класса мембранных белков – объект диссертации – человеческий цистеинил-лейкотриеновый рецептор второго типа. Для него приведены известные из литературы данные о функциях в организме и роли в патологии заболеваний. Резюмированы результаты фармацевтических компаний по поиску кандидатов в лекарства без знания структуры рецепторов-мишеней.

Вторая глава – описание экспериментальных методов, материалов и оборудования, использованных в работе. Приведены протоколы с пояснениями для методов клонирования, экспрессии рецептора в клеточной линии насекомых Sf9, очистки и характеристики различных вариантов рецептора. Описаны

методики тестирования диффузии рецептора в липидной кубической фазе (ЛКФ) и кристаллизации, отбора кристаллов, их извлечения из ЛКФ, а также снятия дифракционных данных.

Третья глава – изложение результатов, выносимых на защиту, начиная с создания генно-инженерных конструкций белка интереса и до анализа его структур высокого разрешения в комплексе с лигандами-кандидатами в лекарства.

Основные результаты работы

Создание генно-инженерных конструкций и их экспрессия

В подавляющем большинстве GPCR на момент написания работы для успешной кристаллизации была применена стратегия стабилизации рецептора за счет введения в конструкции одного или двух партнерных белков в комбинации с другими стратегиями (введение термостабилизирующих точечных мутаций, удаление подвижных частей рецептора, стабилизация нанотелами). Выбор той или иной стратегии – проблема, до сих пор решаемая перебором всех вариантов, начиная с тех, что показали наибольшую эффективность для уже закристаллизованных рецепторов.

В данной работе использовались все стратегии, кроме введения нанотел. В общей сложности собраны, экспрессированы, очищены и охарактеризованы биофизическими методами более 100 различных модификаций CysLT₂R

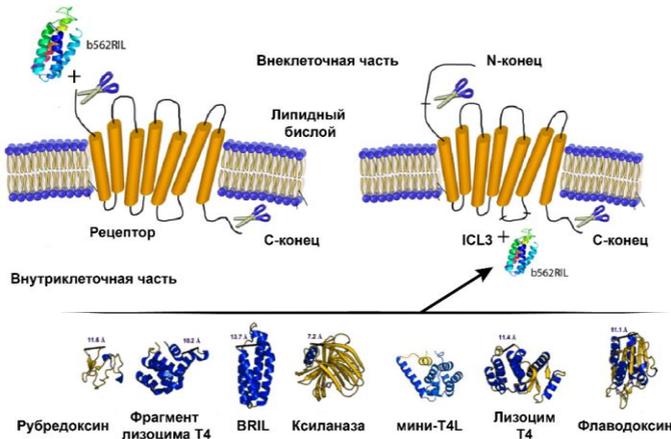


Рисунок 1 Схематическое изображение модификаций рецептора CysLT₂. Вставка партнерных белков на N-конец (левый рисунок) и в третью внутриклеточную петлю (правый рисунок)

Выбор системы экспрессии GPCR – задача многих переменных. Для мембранных белков важны параметры: качество фолдинга белка (часто фолдинг определяется машинерией пост-трансляционных модификаций клеток а также наличием специфичных белков-шаперонов), выход белка с литра культуры, стоимость экспрессии в пересчете на миллиграмм белка, сложность в работе,

устойчивость системы к контаминации, отсутствие токсичности белка для системы экспрессии [24]. Большая часть закристиллизованных GPCR были экспрессированы в клетках насекомых (на момент написания работы из 321 структуры в базе данных gpcrib.org 200 были получены с использованием системы экспрессии в клетках насекомых <https://gpcrib.org/construct/experiments#>)

В случае CysLT₂ рецептора было решено начинать попытки экспрессии именно с бакуловирусной системы, а не с дрожжевой или бактериальной, из-за наличия сайтов гликозилирования белка, а также из положительной статистики успешных случаев экспрессии именно в этой системе для данного класса.

В качестве вектора использовался *pFastBac1*, содержащий после старт-кодона последовательность HA-tag, FLAG-tag, 10x His-tag, сайт узнавания протеазы TEV и сайт рестрикции BamHI для клонирования (см. рис. 2). Ген цистеинил-лейкотриенового рецептора модифицировался в соответствии с конструкцией и встраивался в плазмиду методами генной инженерии. Также была произведена молчащая мутация в гене белка для удаления сайта рестрикции HindIII, облегчающая дальнейшее клонирование.



Рисунок 2 Схематическое изображение экспрессируемой последовательности белка в пределах рамки считывания (ORF)

Подбор условий экспрессии и очистки рецептора

После этапа клонирования все конструкции были экспрессированы с помощью системы Bac-to-Bac в клетках *Sf9* (*Spodoptera frugiperda*, совка травяная). Количественной мерой экспрессии и фолдинга мембранного рецептора в такой системе экспрессии могут служить поверхностная, полная экспрессия и/или их отношение. Для выхода на клеточную мембрану белок должен пройти системы клеточного контроля фолдинга, поэтому такие рецепторы с большой вероятностью подверглись необходимым пост-трансляционным модификациям.

Была произведена оптимизация экспрессии по: времени, соотношению вирусы:клетки, содержанию добавки Production Boost Additive (PBA) в среде и времени его добавления, содержанию добавки холестерина, растворенного в

метил-бета-циклодекстрине, в среде и времени его добавления, по содержанию лигандов (зафирлукаст, ВауСусLT2) в среде и времени их добавления. Измеряемыми параметрами для сравнения служили значения поверхностной и отношения поверхностной к полной экспрессии, получаемые методом проточной цитометрии.

Для подбора условий очистки белка была выбрана конструкция с укороченным С-концом и вставкой партнерного белка BRIL в третью внутриклеточную петлю как одна из наиболее стабильных. Варьировались такие параметры, как количество и объем буферов для про-мывки клеточных мембран, состав буфера для инкубирования мембран перед солюбили-зацией (концентрация лиганда, наличие или отсутствие йодоацетамида), состав солюбили-зационного буфера (наличие или отсутствие глицерина, концентрация хлорида натрия, концентрация детергента) и его объем, состав и объем промывок белка, связанного со смолой, а также объем буфера для элюции и концентрация детергента в нем. Лучшие условия с точки зрения чистоты белка (по электрофоретическому анализу), монодисперсности (по аналитической гель-фильтрации) и выхода белка (по вестерн-блоттингу, электрофорезу и аналитической гель-фильтрации) использовались для всех последующих экспериментов.

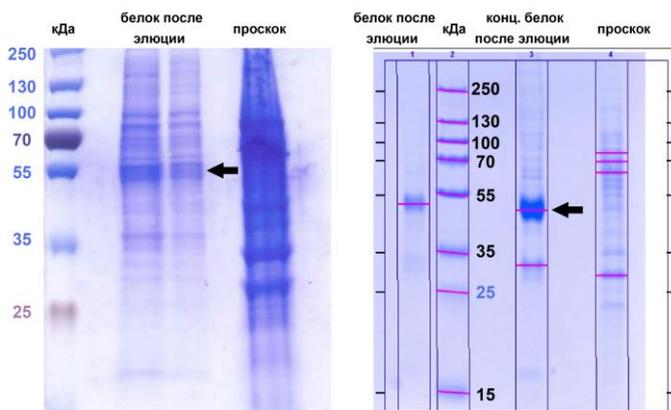


Рисунок 3 Денатурирующий гель-электрофорез для одной из конструкций с BRIL в 3 внутриклеточной петле и укороченным С-концом до (левый рисунок) и после (правый рисунок) оптимизации протокола очистки

Подбор конструкции и лигандов для кристаллизации

В качестве партнерных белков для успешной кристаллизации использовался не только апоцитохром BRIL, но и другие водорастворимые белки небольших размеров, такие как рубредоксин, флаводоксин, T4 лизоцим (T4L), его модификации (miniT4L, T4L fragment), PGS, Xylanase [25]. По результатам цитометрических тестов и по данным гель-фильтрации лучшей конструкцией оказалась с партнерным белком BRIL в 3 петле. Она была выбрана для внесения точечных стабилизирующих мутаций.

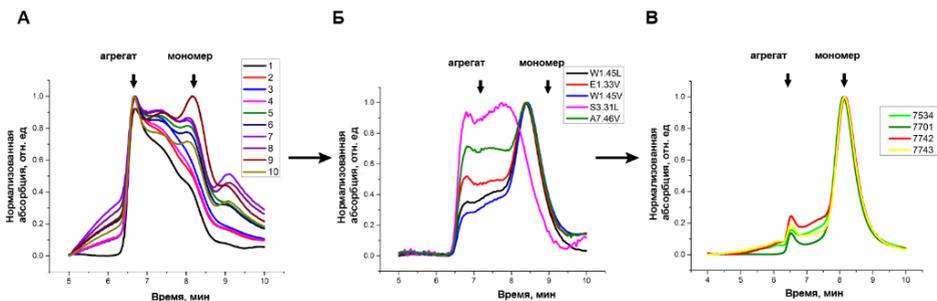


Рисунок 4 Пример нормализованных результатов гель-фильтрации, полученных в процессе оптимизации конструкций. (А) – различные места вставки BRIL (Б) - +точечные мутации, (В) – комбинации точечных мутаций по 2 и 3

Был предложен набор из 20 различных мутаций для выбранной конструкции, основанный на данных литературы, предсказании по гомологии с другими рецепторами, а также автоматизированным сопоставлением всех аминокислотных последовательностей класса А и анализе частоты встречаемости аминокислот в разных позициях. Полученные конструкции экспрессировались и очищались в подобранных ранее оптимальных условиях. По результатам гель-фильтрации выявлены 8 наилучших мутаций, в дальнейшем они комбинировались по 2, 3, 4 и иногда 5, экспрессировались, белок солубилизировался и очищался, и все они сравнивались с помощью аналитической гель-фильтрации, анализа на термостабильность и по электрофорезу в присутствии лигандов и АРО (рис. 4, 5). Аналогично варьировалась длина N-конца рецептора. Комбинированием лучших модификаций удалось получить мономерный, стабильный препарат с выходом в

1.6 мг/л культуры и температурой плавления более 60 градусов в присутствии набора лигандов (см. далее).

Лиганды-антагонисты синтезировались и разрабатывались соавторами (ONO pharmaceuticals) в рамках GPCR консорциума. Поиск оптимального лиганда для последующих кристаллизационных тестов проходил в 2 раунда: сначала тестировались 10 лигандов, экспериментально нами находился лучший, затем на его основе структуры синтезировались еще 10 новых антагонистов, и проводился повторный скрининг. Для простоты работы с лигандами каждому семизначному идентификационному номеру от компании ONO была сопоставлена буква латинского алфавита. А-Ж – для первой серии лигандов и К-Т – для второй.

Для экспериментов по оценке стабильности комплексов рецептор-лиганд использовалась конструкция со вставкой BRIL в третью внутриклеточную петлю и двумя точечными мутациями: W1.45V и F3.51Y, укороченными N- и C-концами. Белок экспрессировался и выделялся по оптимизированному протоколу, солюбилизация и очистка проводились отдельно в присутствии различных лигандов (10 лигандов ONO + коммерчески доступный селективный антагонист BayCysLT2 = 11 отдельных образцов), а также без лиганда (APO). Таким образом, был выбран лучший с точки зрения термостабильности, монодисперсности и выхода белка лиганд. Из следующих 10 лигандов, сделанных на его основе, несколько лучших использовались для кристаллизации, структуры с 3 из них описаны далее.

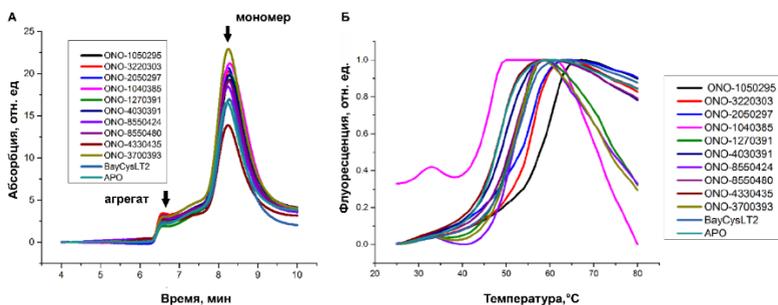


Рисунок 5 Стабилизация рецептора с помощью различных антагонистов (1 раунд). (А) - результаты гель-фильтрации и (Б) - кривые денатурации

Анализ диффузии в липидной кубической фазе и кристаллизация рецептора

Для первых попыток оценки диффузии методом восстановления флуоресценции после фотообесцвечивания (FRAP, fluorescent recovery after photobleaching) была взята конструкция со вставкой BRIL в третью петлю, точечными мутациями W1.45V+F3.51Y, укороченным С- концом) и лиганды А и В (T_m=58 °С, мономерность - более 90%, выход – 0.4 мг с литра культуры). Очистка и экспрессия проводились по оптимизированным протоколам, для удаления возможного N-гликозилирования использовался фермент PNGase. Для кристаллизации была добавлена мутация D2.50N, N-конец обрезан до M17, и брались лиганды L, S, O (T_m=63-64 °С, мономерность более 90%, выход – 1.6 мг с литра культуры).

Концентрация белка перед смешиванием с липидом для получения липидной кубической фазы (ЛКФ) составляла 5-10 мг/мл для экспериментов по анализу диффузии рецептора и 60-70 мг/мл для кристаллизации. Типичный профиль гель-фильтрации и кривая плавления такого белка показан на рисунке 5. Как и в экспериментах по изучению диффузии так и при кристаллизации, первый подбор условий состоял из наборов, содержащих 48 различных солей из набора Hampton stock salts HR2-245 в двух различных концентрациях (100 и 400 мМ) и полиэтиленгликоль с длиной цепи 400 в качестве преципитанта (30 %), а также буфер для поддержания постоянного рН. Четыре таких скрина отличались по рН (5, 6, 7, 8).

Таким образом получены и оптимизированы кристаллы CysLT₂ с лигандами L (пример оптимизации показан на рис. 7), S, O. В случае лиганда L кристаллы получены в двух группах симметрии – C222₁ (при более высоком содержании аммоний тартрата и полиэтилен гликоля 400) и f222 (при более низком содержании компонентов преципитанта) (рис.6).

кристаллы в группе симметрии f222

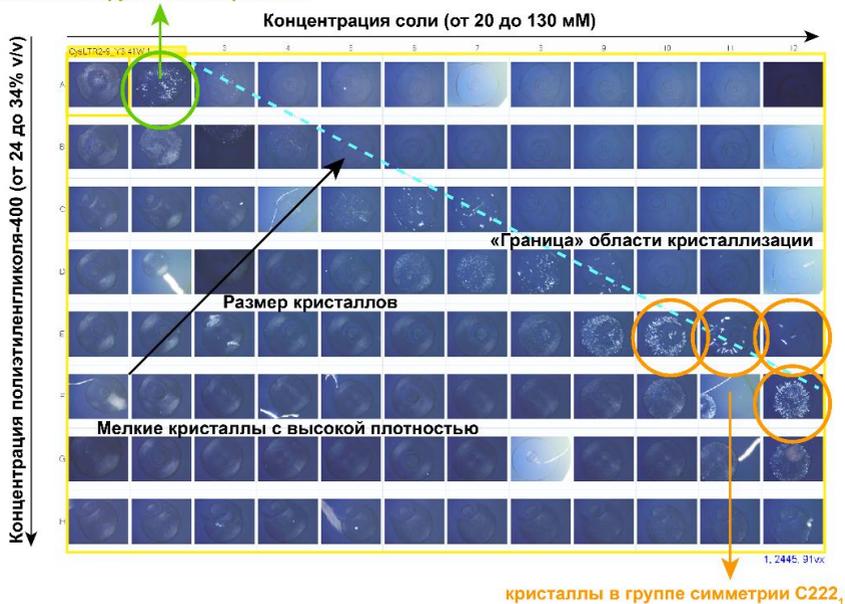


Рисунок 6 Пример результатов кристаллизации 7701-M17 с лигандом L: вариация содержания ПЭГ400 и тартрата аммония. Две изоформы кристаллов наблюдаются в зависимости от концентраций веществ в преципитанте.

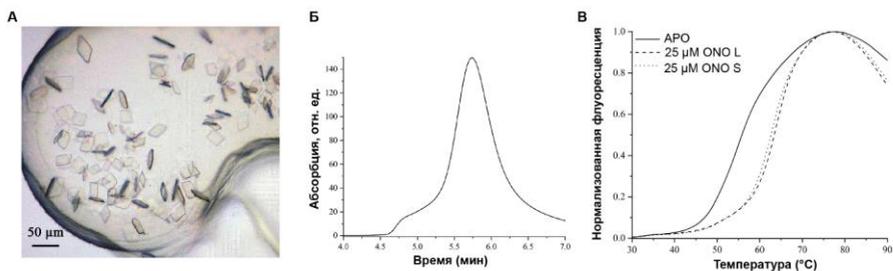


Рисунок 7 Кристаллизация CysLT₂ рецептора с лигандом S. (A) - пример полученных кристаллов, (B) - профиль гель-фильтрации очищенного рецептора в комплексе с лигандом S, (C) - кривые денатурации рецептора в комплексе с лигандами L и S

Сбор данных дифракции и уточнение структур

В данной работе использовался подход снятия данных с многих кристаллов и слияния их в один набор для всех пар рецептор-лиганд. Кристаллы вынимались из лунки по методу Каффри [26], быстро замораживались в жидком азоте и затем помещались в синхротронных пучок, как это описано в работе в разделе «материалы и методы». Для каждого набора данных угловой диапазон составлял 5-20 градусов. В случае лиганда S снимались полные наборы данных с единичных кристаллов.

В общей сложности было снято около 240, 150, 45, 11 наборов данных для 3 различных лигандов (L (группы симметрии $C222_1$ и $f222$), O, S соответственно). Типичный пример получаемой дифракционной картины показан на рисунке 8. Статистика сбора и обработки данных приведена в таблице 1.

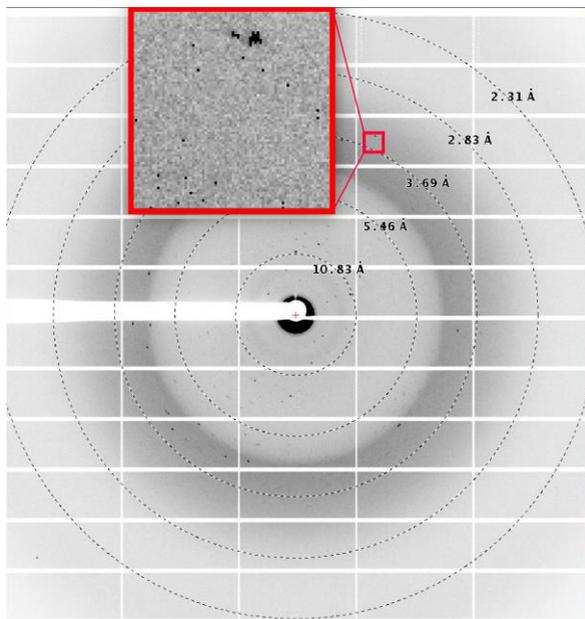


Рисунок 8 Пример дифракционной картины, полученной в эксперименте с $CysLT_2R-L$ в кристаллизационных условиях с малыми концентрациями соли и ПЭГ-400 (группа симметрии кристаллов $F222$).

Лиганд PDB ID	L 6RZ6	L 6RZ7	O 6RZ8	S 6RZ9
Сбор данных дифракции				
Кол-во кристаллов	49	10	4	7
Простр. гр. симметрии	C222 ₁	F222	C222 ₁	14
Параметры элем. ячейки				
a, b, c (Å) α, β, γ (°)	69.8, 170.9, 85.8 90.0, 90.0, 90.0	81.8, 142.1, 171.2 90.0, 90.0, 90.0	69.6, 170.2, 85.7 90.0, 90.0, 90.0	78.4, 78.4, 172.0 90.0, 90.0, 90.0
Разрешение (Å)	30–2.43 (2.52–2.43) ^a	20–2.43 (2.52–2.43)	30–2.73 (2.83–2.73)	30–2.70 (2.80–2.70)
Полное кол-во рефлексов	180,906	67,591	38,974	199,739
Кол-во уник. рефлексов	19,685	17,665	13,531	14,227
R_{merge} (%)	27.9 (322.7)	19.4 (216.8)	15.1 (161.5)	23.9 (275.8)
R_{pim} (%)	9.4 (112.0)	10.8 (119.2)	10.2 (108.4)	6.6 (76.6)
Среднее $I/\sigma I$	5.9 (1.1)	4.8 (0.7)	4.4 (0.9)	9.8 (1.2)
Комплитность (%)	99.8 (99.7)	92.4 (89.2)	97.0 (99.1)	99.9 (100.0)
Мультиплетность	9.2 (8.8)	3.8 (3.9)	2.9 (3.0)	14.0 (13.8)
CC* (%)	99.8 (67.8)	99.7 (59.7)	99.7 (70.8)	99.9 (76.3)
Уточнение				
Количество рефлексов/тестовый набор	19,661/982	17,555/883	13,514/674	14,226/709
R_{work}/R_{free} (%)	19.5/23.3 (28.3/30.7)	22.9/25.9 (33.2/33.2)	21.7/25.4 (32.4/35.8)	19.5/24.7 (28.1/32.9)
Кол-во атомов				
Белок	2,798	2,740	2,740	2,764
Лиганд	41	41	41	43
Липиды/другие атомы	487	351	325	196
B -факторы Уилсона (Å ²)	51.5	49.6	73.1	62.0
Общий средний B - фактор (Å ²)				
CysLT ₂ R	57.5	55.0	74.9	69.9
BRIL	118.5	114.0	133.0	121.7
Лиганд	49.4	47.8	82.5	61.2
Липиды/другие атомы	80.5	83.5	95.4	84.2
Среднекв. откл. от идеальных:				
Длин связей (Å)	0.006	0.007	0.004	0.004
Углов связей (°)	1.04	1.11	0.81	0.72

Таблица 1 Кристаллографическая статистика сбора и уточнения данных.

^a Значения в скобках указаны для оболочки с самым высоким разрешением.

Общие свойства структуры CysLT₂ рецептора в комплексе с антагонистами:

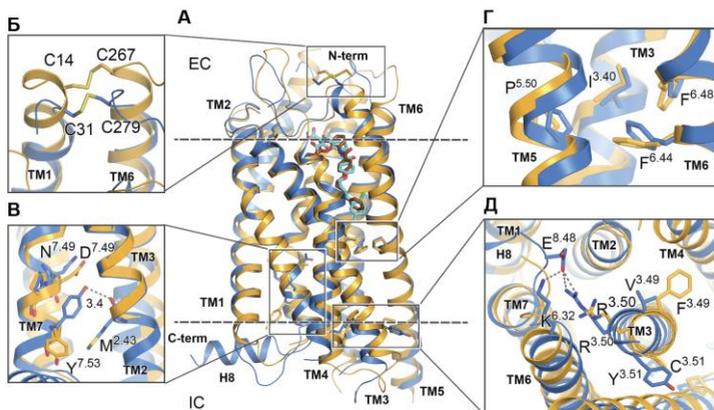


Рисунок 9 (A) Структурная суперпозиция CysLT₂R-L (синий; пространственная группа симметрии C2221) с CysLT₁R-пранлукаст (желтый). (Б) Сравнение дисульфидных мостиков между CysLT₁R и CysLT₂R. (В-Д) - Сравнение функциональных мотивов: NPxxY (В), P-I-F (Г) и DRY (Д). Мембранные границы показаны пунктирными линиями в (А)

Все полученные в работе структуры имеют традиционные для GPCR 7 трансмембранных спиралей и схожие между собой конформации, соответствующие неактивному состоянию, аналогично рецептору CysLT₁, ближайшему гомологу CysLT₂R [27,28]. Исключение – структура CysLT₂R-S, в которой спирали 6 и 7 частично сдвинуты в направлении активного положения, как и консервативный P-I-F-мотив, который принимает конформацию, обычно наблюдаемую в активных состояниях GPCR.

Стоит также отметить, что у CysLT₂R высоко консервативный D[E]RY мотив представлен как VR3.50F, что описано впервые [27]. Еще один важный для активации рецептора консервативный мотив NPxxY существенно отличается от мотива в CysLT₁ рецепторе по положению Y^{7.53}. Несмотря связывание с антагонистами, у CysLT₂R эта аминокислота развернута, как и у рецепторов в активном состоянии.

В случае структур в комплексе с антагонистами L и O четко различима электронная плотность внутриклеточной 8 спирали, важной в регуляции связывания с G-белком [27].

В структуре CysLT₂R-S 8 спираль не различима, вероятно, из-за плотной кристаллической упаковки и нехватки места в элементарной ячейке. Во всех структурах четко различима электронная плотность для лигандов и видны различия в положениях заместителей в концевом бензольном кольце.

Структура		CysLT ₂ R				CysLT ₁ R	
		L (C222 ₁)	L (F222)	O	S	Pran	Zaf
CysLT ₂ R	L (C222 ₁)	0	0.33	0.43	0.51	0.81	2.47
	L (F222)	0.39	0	0.50	0.66	0.81	2.67
	O	0.15	0.41	0	0.46	0.78	2.40
	S	0.54	0.56	0.55	0	1.29	2.75
CysLT ₁ R	Pran	1.03	0.89	1.00	1.02	0	2.31
	Zaf	1.01	0.99	0.98	0.99	0.47	0

Таблица 2 Попарное среднеквадратичное отклонение (RMSD) между структурами CysLT₁R и CysLT₂R. Нижний левый угол: среднеквадратичные отклонения между Ca атомами в Å, рассчитанные по 90% остатков. Нижний правый угол: RMSD (в Å) всех атомов с центрами в пределах 6 Å от связанного лиганда, рассчитано после выравнивания рецептов. Интенсивность цвета пропорциональна числовому значению.

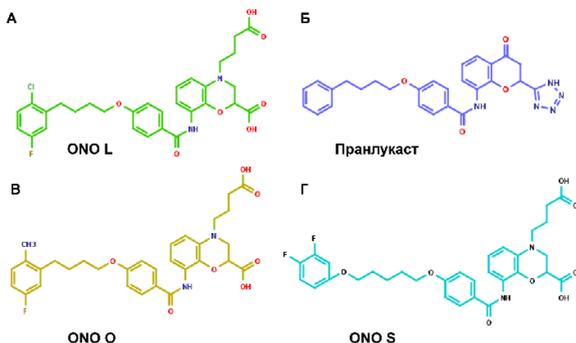


Рисунок 10 Структуры лигандов, использованных для кристаллизации в работе, и их сравнение с пранлукастом

Особенности лиганд-связывающего кармана CysLT₂ рецептора

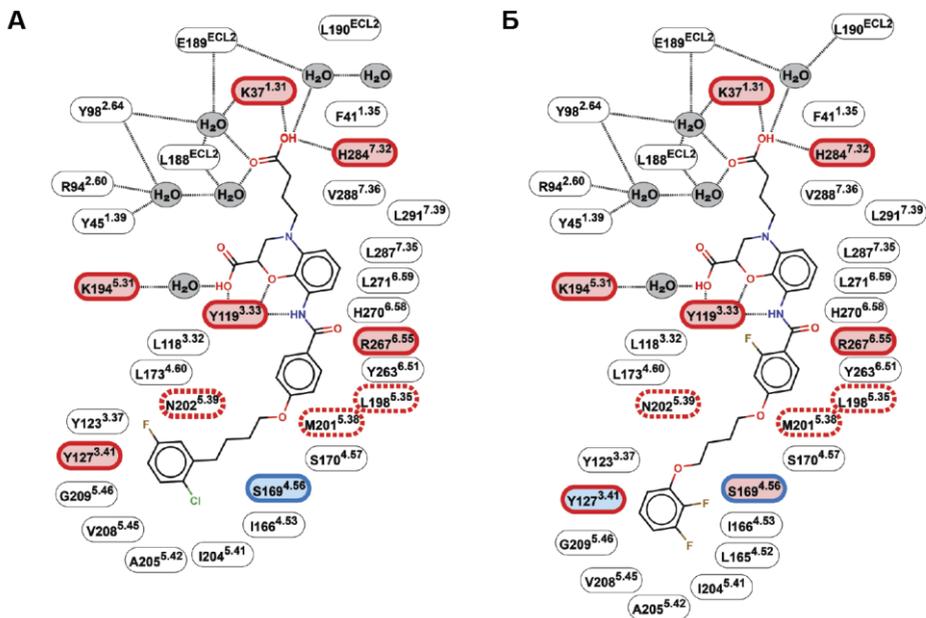


Рисунок 11 Схематические диаграммы взаимодействия CysLT₂ рецептора с лигандом L (А) и S (Б). Аминокислоты окрашены в соответствии с влиянием их мутаций на активность антагонистом в клеточных тестах: светло-красный - сильный эффект, синий - нет эффекта, белые – не тестировались. Цвет контура указывает на влияние мутаций на сигналинг после воздействия агонистом LTD₄: красный - сильный эффект, красный пунктир - не реагирующие мутанты, синий - нет эффекта.

Форма лиганд-связывающего кармана и ключевые взаимодействия его аминокислотных остатков с группами лиганда представляют главный интерес для создания кандидатов в лекарства. Ценность такой структурной информации для фармакологов очень высока.

Все антагонисты, закристаллизованные в комплексе с CysLT₂R, имеют один и тот же 3,4-дигидро-2Н-1,4-бензоксазиновый каркас и связываются в кармане в одинаковых конформациях (RMSD <0.3 Å, рассчитанный по общим атомам лигандов). В работе детально рассмотрены особенности взаимодействия лигандов-антагонистов с рецептором CysLT₂, выделены ключевые для

взаимодействия аминокислоты. Например, якорный остаток Y119^{3,33}, сохраняемый в CysLTR, образует множественные полярные контакты с бензоксазиновой частью, карбоксильной группой и амидным линкером всех лигандов. Верхняя карбоксильная группа образует солевые мостики с K37^{1,31} и H284^{7,32}, специфичными для CysLT₂R. Нижняя гидрофобная часть лиганд-связывающего кармана имеет форму «щели» и образована боковыми группами аминокислот из трансмембранных спиралей TM3 и TM5, многие из них проверены в клеточных тестах.

Анализ селективности рецепторов CysLT₁R и CysLT₂R к различным синтетическим антагонистам

Являясь ближайшими гомологами, CysLT₁R и CysLT₂R по-разному связывают эндогенные лиганды, а также имеют разный профиль селективности к синтетическим антагонистам [29]. Высокое структурное сходство пранлукаста и лигандов L, O и S и сходство структур рецепторов, закристаллизованных с этими антагонистами, позволяет сравнить два рецептора и говорить о характерных особенностях их лиганд-связывающих карманов, обеспечивающих эту разницу в селективности.

Структура CysLT₁ [28] и CysLT₂ рецепторов в комплексе с лигандами пранлукаст и L соответственно использовались для предсказания поз лигандов из [30,31] в рецепторах CysLT₁ и CysLT₂ методами молекулярного докинга. Было показано, что наиболее важным фактором для селективности к CysLT₂R является длина алкильной цепи для O-заместителей (R1). Тип и положение N-заместителя (R2) показывает, что его длина, а также наличие карбоксильной группы в этом кармане оказывает критическое влияние на значения IC₅₀ для обоих CysLTR [27].

Структурный анализ природных полиморфизмов CysLT₂ рецептора и болезнетворных мутаций

Информация о структурах высокого разрешения для CysLT₂ рецептора позволяет рационально трактовать эффект связанных с заболеваниями однонуклеотидных замен (Single Nucleotide Variant, SNV). Частота таких мутаций варьируется в больших пределах, но большинство из них являются очень редкими (частота аллелей $<10^{-4}$), поэтому не всегда удастся установить связь такой мутации с заболеванием.

Опираясь на результаты недавнего исследования более 60000 людей на предмет однонуклеотидных вариаций [32], в работе произведено структурное соотнесение положения мутаций, вызванных этими заменами в гене *CysLT₂R*. Анализ 117 положений аминокислот, являющихся результатом однонуклеотидных замен, показал, что 9 из них принадлежат лиганд-связывающему карману, 7 – это АК, связанные с активацией (АК-переключатели или расположены в сайте связывания натрия), и 9 – на интерфейсе контакта с G-белком или β -аррестином (рис. 13).

В работе также выполнен детальный структурный анализ двух наиболее распространенных мутаций CysLT₂R – однонуклеотидной замены L129^{3.43}Q, связанной с увеальной меланомой и голубыми невусами [23,33] и M201^{5.48}V, ассоциированной с предрасположенностью к астме [34].

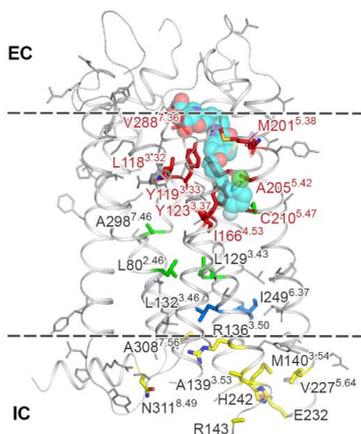


Рисунок 13 SNP из базы данных ExAC и L129^{3.43}, окрашенные в соответствии с их местоположением: лиганд-связывающий карман (красный), аминокислоты-переключатели (синий), натриевый сайт (зеленый), интерфейс взаимодействия с G-белком и β -аррестином (желтый).

Заключение – выводы работы и библиографический список цитируемой литературы

ГЛАВА 4. ОСНОВНЫЕ ВЫВОДЫ РАБОТЫ

1. Созданы генно-инженерным путем, экспрессированы в эукариотических клетках *Sf9*, очищены и охарактеризованы более 100 химерных конструкций рецептора с партнерными белками – драйверами кристаллизации: BRIL, рубредоксином, T4 лизоцимом, мини T4 лизоцимом, различными вариантами длин N- и C- концов и стабилизирующими точечными мутациями.
2. Оптимизированы протоколы экспрессии в *Sf9* и очистки белка методом аффинной хроматографии для получения гомогенного, монодисперсного и максимально стабильного белка.
3. Произведен скрининг более 20 лигандов-антагонистов рецептора методами гель-фильтрации и дифференциальной сканирующей флуориметрии; выбраны лучшие пары рецептор-лиганд.
4. Для одного из лучших лигандов измерена мобильность рецептора в ЛКФ методом FRAP, проведена оптимизация условий для лучшей диффузии рецептора.
5. Получены кристаллы рецептора в комплексе с 3 антагонистами в липидной кубической фазе, произведено в зависимости от лиганда 1-4 раунда оптимизации кристаллов
6. Получены 4 структуры рецептора в комплексе с 3 неспецифическими антагонистами CysLT₁R/CysLT₂R с разрешением 2.4 Å (CysLT₂R-L, C2221 и f222), 2.7 Å (CysLT₂R-O, CysLT₂R-S)
7. Впервые описаны консервативные мотивы, лиганд-связывающий карман рецептора CysLT₂R
8. Предложен механизм селективности связывания цистеиниловых лейкотриенов и синтетических антагонистов CysLT рецепторами.
9. Проанализированы однонуклеотидные замены, встречающиеся в рецепторе CysLT₂
10. Предложено структурное объяснение влияния онкогенной мутации L129Q и мутации M201V, приводящей к атопии

Основные результаты диссертационной работы изложены в следующих публикациях:

Статьи в журналах, индексируемые Scopus, Web of Science:

- 1) **Gusach, A.**, Luginina, A., Marin, E., Brouillette, R.L., Besserer-Offroy, É., Longpré, J., Ishchenko, A., Popov, P., Patel, N., Fujimoto, T., Maruyama, T., Stauch, B., Ergasheva, M., Romanovskaia, D., Stepko, A., Kovalev, K., Shevtsov, M., Gordeliy, V., Han, G.W., Katritch, V., Borshchevskiy, V., Sarret, P., Mishin, A., Cherezov, V., 2019. Structural basis of ligand selectivity and disease mutations in cysteinyl leukotriene receptors. *Nat. Commun.* 10:5573
- 2) Luginina, A., **Gusach, A.**, Marin, E., Mishin, A., Brouillette, R., Popov, P., Shiriaeva, A., Besserer-Offroy, É., Longpré, J.M., Lyapina, E., Ishchenko, A., Patel, N., Polovinkin, V., Safronova, N., Bogorodskiy, A., Edelweiss, E., Hu, H., Weierstall, U., Liu, W., Batyuk, A., Gordeliy, V., Han, G.W., Sarret, P., Katritch, V., Borshchevskiy, V., Cherezov, V., 2019. Structure-based mechanism of cysteinyl leukotriene receptor inhibition by antiasthmatic drugs. *Sci. Adv.* 5.
- 3) Mishin, A., **Gusach, A.**, Luginina, A., Marin, E., Borshchevskiy, V., Cherezov, V., 2019. An outlook on serial femtosecond crystallography application in drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* 14, 1–13.

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. Ostanovich, 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, **A. Gusach**, E. Marin, V. Borshchevskiy, A. Mishin, V. Cherezov. 5th Annual iHuman Forum; ShanghaiTech; Шанхай; Китай, 2017

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.

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.

26) Structural Basis of Ligand Selectivity and Disease Mutations in Cysteinyl Leukotriene Receptors. **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. First ERNEST meeting: GPCR Pharmacology - Activation, Signalling and Drug Design, Белфаст, Великобритания, 2019

Список цитируемой литературы

1. Blass B.E. Basic Principles of Drug Discovery and Development // Basic Principles of Drug Discovery and Development. 2015.
2. Wlodawer A. Protein Crystallography. 2017. Vol. 1607. 627–641 p.
3. Hughes J.P. et al. Principles of early drug discovery // Br. J. Pharmacol. 2011. Vol. 162, № 6. P. 1239–1249.
4. Alex A.A., Millan D.S. Chapter 5. Contribution of Structure-Based Drug Design to the Discovery of Marketed drugs. 2011. № 13. P. 108–163.
5. Caffrey M. Membrane protein crystallization // J. Struct. Biol. 2003.
6. Nelson D.L., Cox M.M. Lehninger principles of biochemistry. 5 th Editi. New York: W. H. Freeman and company, 2008. 153, 358–359, 816–819 p.
7. Hauser A.S. et al. Trends in GPCR drug discovery: New agents, targets and indications // Nat. Rev. Drug Discov. Nature Publishing Group, 2017. Vol. 16, № 12. P. 829–842.
8. Palczewski K. et al. Crystal Structure of Rhodopsin: A G Protein-Coupled Receptor // Sci. (New York, NY). 2000. Vol. 289, № 5480. P. 739–745.
9. Cherezov V. et al. High-resolution crystal structure of an engineered human β 2-adrenergic G protein-coupled receptor // Science (80-.). 2007. Vol. 318, № 5854. P. 1258–1265.
10. Thal D.M. et al. Recent advances in the determination of G protein-coupled receptor structures // Curr. Op. Struct. Biol. 2018. Vol. 51. P. 28–34.
11. Cooke R.M. et al. Structures of G protein-coupled receptors reveal new opportunities for drug discovery // Drug Disc. Today. 2015. Vol. 20, № 11.
12. Heise C.E. et al. Characterization of the human cysteinyl leukotriene 2 receptor. // J. Biol. Chem. 2000. Vol. 275, № 39. P. 30531–30536.
13. Back M. et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology . LXXXIV : Leukotriene Receptor Nomenclature , Distribution , and Pathophysiological Functions // Pharmacol. Rev. 2011. Vol. 63, № 3. P. 539–584.
14. Yokomizo T., Nakamura M., Shimizu T. Leukotriene receptors as potential therapeutic targets // J. Clin. Invest. 2018. Vol. 128, № 7. P. 2691–2701.
15. Miligkos M. et al. Leukotriene receptor antagonists versus placebo in the treatment of asthma in adults and adolescents: a systematic review and meta-analysis // Ann Intern Med. 2015. Vol. 164, № 10. P. 756–767.
16. Takasaki J. et al. The molecular characterization and tissue distribution of the human cysteinyl leukotriene CysLT(2) receptor. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2000. Vol. 274. P. 316–322.
17. Capra V. Molecular and functional aspects of human cysteinyl leukotriene receptors // Pharmacol. Res. 2004.
18. Jiang Y. et al. CysLT2 receptors interact with CysLT1 receptors and down-

- modulate cysteinyl leukotriene dependent mitogenic responses of mast cells. // *Blood*. 2007. Vol. 110, № 9. P. 3263–3270.
19. Fukai H. et al. Association between a polymorphism in cysteinyl leukotriene receptor 2 on chromosome 13q14 and atopic asthma. // *Pharmacogenetics*. 2004. Vol. 14, № 10. P. 683–690.
 20. Pillai S.G. et al. A coding polymorphism in the CYSLT2 receptor with reduced affinity to LTD4 is associated with asthma. // *Pharmacogenetics*. 2004. Vol. 14, № 9. P. 627–633.
 21. Yonetomi Y. et al. Leukotriene C4 induces bronchoconstriction and airway vascular hyperpermeability via the cysteinyl leukotriene receptor 2 in S-hexyl glutathione-treated guinea pigs // *Eur. J. Pharmacol.* 2015.
 22. Shi Q.J. et al. HAMI 3379, a CysLT2R antagonist, dose- and time-dependently attenuates brain injury and inhibits microglial inflammation after focal cerebral ischemia in rats // *Neuroscience*. 2015. Vol. 291. P. 53–69.
 23. Moore A.R. et al. Recurrent activating mutations of G-protein-coupled receptor CYSLTR2 in uveal melanoma. // *Nat. Genet.* 2016. Vol. 48, № 6.
 24. Komives C. *New Expression Systems for GPCRs*. 2019.
 25. Chun E. et al. Fusion partner toolchest for the stabilization and crystallization of G protein-coupled receptors. // *Structure*. Elsevier Ltd, 2012. Vol. 20, № 6. P. 967–976.
 26. Caffrey M., Cherezov V. Crystallizing membrane proteins using lipidic mesophases. // *Nat. Protoc.* 2009. Vol. 4, № 5. P. 706–731.
 27. Gusach A. et al. Structural Basis of Ligand Selectivity and Disease Mutations in Cysteinyl Leukotriene Receptors // *Nat. Commun.* 2019. Vol. 10:5573.
 28. Luginina A. et al. Structure-based mechanism of cysteinyl leukotriene receptor inhibition by antiasthmatic drugs // *Sci. Adv.* 2019. Vol. 5, № 10.
 29. Back M. et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology . LXXXIV : Leukotriene Receptor Nomenclature , Distribution , and Pathophysiological Functions. 2011. Vol. 63, № 3. P. 539–584.
 30. Itadani S. et al. Discovery of Highly Potent Dual CysLT₁ and CysLT₂ Antagonist // *ACS Med. Chem. Lett.* 2014. Vol. 5, № 11. P. 1230–1234.
 31. Itadani S. et al. Discovery of a potent, orally available dual CysLT₁ and CysLT₂ antagonist with dicarboxylic acid // *Bioorganic Med. Chem.* 2015. Vol. 23, № 9. P. 2079–2097.
 32. Lek M. et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans // *Nature*. Nature Publishing Group, 2016. Vol. 536, № 7616. P. 285–291.
 33. Moller I. et al. Activating cysteinyl leukotriene receptor 2 (CYSLTR2) mutations in blue nevi. // *Mod. Pathol.* 2017. Vol. 30, № 3. P. 350–356.
 34. Brochu-Bourque A. et al. Differential Signaling Defects Associated with the M201V Polymorphism in the Cysteinyl Leukotriene Type 2 Receptor // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2011. Vol. 336, № 2. P. 431–439.