



УДК 577.29

ДИЗАЙН ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ, ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА МОНОМЕРНОЙ ФОРМЫ РЕЦЕПТОРА GPR17 КЛАССА GPCR ДЛЯ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ¹

© 2025 г. Н. А. Сафронова*, А. П. Лугинина*, А. А. Садова*, М. Б. Шевцов*,
О. В. Моисеева*, В. И. Борщевский*, А. В. Мишин*,[#]

** Центр исследований молекулярных механизмов старения и возрастных заболеваний,
Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет),
Россия, 141701 Долгопрудный, Институтский пер., 9*

Поступила в редакцию 26.08.2024 г.

После доработки 06.09.2024 г.

Принята к публикации 07.09.2024 г.

Рецепторы, сопряженные с G-белком (GPCR), – это семейство семиспиральных трансмембранных белков, состоящее более чем из 800 представителей в геноме человека, играющих ключевую роль в регуляции большинства процессов в организме и являющихся мишенями для трети всех современных лекарств. Многие GPCR, несмотря на значимость для фармакологии, до сих пор орфанные, т.е. эндогенный лиганд для них неизвестен. Орфанный рецептор GPR17, относящийся к классу A GPCR, экспрессируется преимущественно в центральной нервной системе, играет важную роль в регуляции образования миелиновой оболочки нейронов и представляет собой потенциальную мишень для разработки новых лекарственных препаратов против рассеянного склероза, болезни Альцгеймера и ишемии. Цель данной работы заключалась в подготовке GPR17 для структурно-функциональных исследований, начиная с модификации рецептора и заканчивая получением белкового препарата. Был проведен скрининг различных генно-инженерных конструкций, проанализирован ряд точечных мутаций, а также проверено значительное число потенциальных лигандов данного рецептора. В результате работы оптимизированы условия экспрессии, выделения и очистки GPR17, что в совокупности позволило получить достаточно стабильный и мономерный белковый препарат, подходящий для дальнейших структурных исследований.

Ключевые слова: GPCR, GPR17, стабилизация белка

DOI: 10.31857/S0132342325010086, **EDN:** LZDVJL

ВВЕДЕНИЕ

В современном мире весьма значимыми проблемами являются нейродегенеративные заболевания, ожирение и сердечно-сосудистые болезни. Для многих состояний, таких как болезнь Альцгеймера, рассеянный склероз и метаболический синдром, до сих пор не существует эффективной терапии, несмотря на активные исследования [1]. В связи с этим особую актуальность приобретают задачи по разработке лекарственных средств и поиску

фармакологических мишеней в организме человека, нацеленных на лечение данных недугов.

Потенциальной мишенью для решения поставленной задачи может стать рецептор GPR17, принадлежащий к суперсемейству GPCR. Данный белок преимущественно экспрессируется в центральной нервной системе, а именно в молодых олигодендроцитах, и общепризнанно считается регулятором образования миелиновой оболочки нейронов. Ингибирование GPR17 ускоряет миели-

¹ Дополнительные материалы к этой статье доступны по doi 10.31857/S0132342325010086 для авторизованных пользователей.

Сокращения: BRIL – термостабилизированный апоцитохром b562RIL; CPM – N-[4-(7-диэтиламино-4-метил-3-кумаринил)-фенил]малеимид; GPCR – рецепторы, сопряженные с G-белком (G protein coupled receptor); SE – поверхностная экспрессия (surface expression); WT – дикий тип рецептора, конструкция без мутаций.

[#] Автор для связи: (тел.: +7 (916) 810-07-84; эл. почта: mishinalexej@gmail.com).

низацию аксонов как при нормальном развитии, так и в случае восстановления различных повреждений мозга, таких как ишемия, травмы, нейродегенеративные заболевания [2–4]. Кроме того, недавно были открыты новые функции GPR17: регуляция уровня глюкозы в крови при экспрессии в клетках кишечного эпителия [5], а также контроль аппетита при экспрессии в гипоталамических нейронах [6]. Все это делает GPR17 потенциальной мишенью для будущей разработки лекарственных препаратов против ожирения, рассеянного склероза, болезни Альцгеймера, инсультов, ишемии и для ускорения реабилитации после черепно-мозговых травм.

Рецепторы класса GPCR крайне важны для фармацевтической индустрии: ~35% всех лекарств, одобренных Управлением по контролю за продуктами и лекарствами США, нацелены на представителей GPCR-семейства, и данное направление в фармакологии активно развивается [7]. Разработка новых лекарственных препаратов – долгий и дорогостоящий процесс, но знание структуры рецептора-мишени может существенно его ускорить [8]. Недавно была опубликована структура активной конформации GPR17 в комплексе с G_{ai1} -белком [9]. Но для большинства потенциальных фармакологических приложений данного белка интересна структура неактивной формы, т.к. именно ингибирование GPR17 приводит к положительным терапевтическим эффектам [4]. К тому же разрешение предполагаемого лиганд-связывающего кармана GPR17 в опубликованной структуре составило ~4 Å, что недостаточно для рациональной разработки препаратов [10], поэтому уточнение расположения аминокислотных остатков в этом фармакологически значимом участке рецептора представляет собой актуальную задачу, и дальнейшие структурно-функциональные исследования GPR17 не потеряли своей актуальности.

Целью данной работы являлась подготовка белкового препарата GPR17, включая дизайн новых генно-инженерных конструкций, обеспечивающих наработку качественного белка, а также оптимизация протоколов выделения и очистки рассматриваемого рецептора для получения достаточного количества стабильного мономерного белка, подходящего для дальнейших структурно-функциональных исследований.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оптимизация генно-инженерных конструкций. На первом этапе работы с GPR17 было важно подобрать такую генно-инженерную конструкцию, которая будет встраиваться в плазматическую

мембрану клеток насекомых Sf9, имея при этом достаточно высокий выход целевого белка с литра культуры. Было протестировано более 60 конструкций, которые отличались партнерным белком, его положением в аминокислотной последовательности GPR17, длиной *N*- и *C*-концов рецептора, а также точечными мутациями. Партнерный белок – это небольшой стабильный водорастворимый белок, который встраивают в аминокислотную последовательность рецептора с целью его стабилизации и в дальнейшем для создания кристаллических контактов [11]. В данной работе в качестве партнерных белков использовали термостабилизированный апоцитохром b562RIL (BRIL) и рубредоксин. Их полные аминокислотные последовательности приведены в дополнительных материалах (приложение 1).

Пригодность конкретной генно-инженерной конструкции для дальнейшей работы оценивали показателем поверхностной экспрессии, который определяли как отношение числа клеток, в которых GPR17 успешно встроился в плазматическую мембрану, к общему числу клеток, экспрессирующих GPR17 в культуре. Пример экспериментальных данных для определения поверхностной экспрессии рецептора приведен в дополнительных материалах (приложение 2). Несмотря на то что все собранные генно-инженерные конструкции GPR17, включая дикий тип рецептора, имели высокий уровень транскрипции и трансляции: 95–99% клеток в культуре были положительными по наличию FLAG-метки, внедренной на *N*-конец рецептора (см. раздел “Эксперим. часть”), в большинстве случаев экспрессированный рецептор не встраивался в цитоплазматическую мембрану, и его поверхностная экспрессия была нулевой, что может быть непосредственно связано с неверным фолдингом рецептора [12]. На рис. 1 показано, что конструкции с низкой поверхностной экспрессией недостаточно стабильны при выделении и очистке, что выражается в высокой доле белковых агрегатов, время удержания которых при проведении гель-фильтрационной ВЭЖХ ниже, чем время удержания мономерного рецептора. В дополнительных материалах (приложение 3) приведены данные по поверхностной экспрессии всех протестированных конструкций, а в табл. 1 показаны лучшие конструкции первого этапа оптимизации. Точечные мутации и позиции аминокислот в спиралях в табл. 1 и далее по тексту обозначены в соответствии с номенклатурой Ballesteros-Weinstein, где первое число обозначает номер трансмембранной спирали, а второе – позицию на спирали; при этом номер 50 присваивают самой

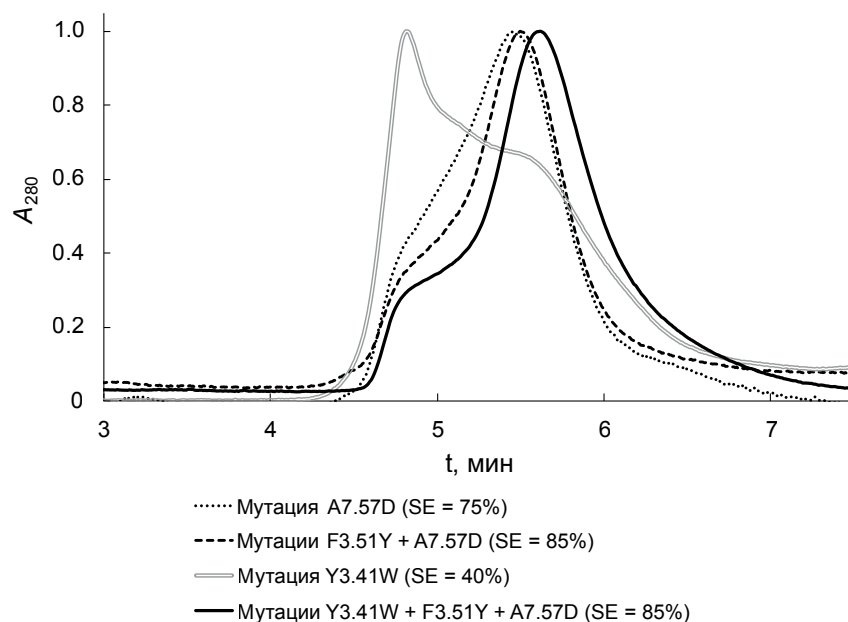


Рис. 1. Результаты гель-фильтрации для конструкции R252-BRIL-V253 с различными точечными мутациями и их комбинациями. SE – поверхностная экспрессия (surface expression).

Таблица 1. Поверхностная экспрессия генно-инженерных конструкций с партнерным белком BRIL в третьей внутриклеточной петле между аминокислотными остатками R252 и V253 с различными точечными мутациями и разными длинами C-конца рецептора

Мутация	C-конец	Поверхностная экспрессия, %
WT (нет мутаций)	P350	0
Y148 ^{3.41} W	P350	22
D321 ^{7.49} N	P350	4
D105 ^{2.50} N	P350	0
F158 ^{3.51} Y	P350	50
M324 ^{7.52} I	P350	10
A329 ^{7.57} D	P350	66
R308 ^{7.35} D	P350	13
Y148 ^{3.41} W	Полный	40
Y148 ^{3.41} W	G342 ^{8.60}	8

консервативной аминокислоте на данной спирали, при помощи которой производится выравнивание всех гомологичных GPCR-рецепторов [13]. Позиции аминокислот вне трансмембранных спиралей обозначены только порядковым номером остатка в аминокислотной последовательности GPR17.

Все конструкции с ненулевой поверхностной экспрессией оказались производными от конструкции с партнерным белком BRIL, вставленным

между аминокислотными остатками R252 и V253 в третьей внутриклеточной петле (R252-BRIL-V253). В первоначальном варианте эта конструкция имела необрезанный N-конец, соответствующий короткой изоформе GPR17 (первая аминокислота M29 [14]) и неполный C-конец, оканчивающийся на P350. В ходе работы длины N- и C-концов варьировались (см. табл. 1 и дополнительные материалы – приложение 3), и оказалось, что наилучший результат достигается с

необрезанными *N*- и *C*-концами. Поскольку в варианте без аминокислотных замен в рецепторе конструкция имела нулевую поверхностную экспрессию, выделение и очистку проводили только для вариантов с различными точечными мутациями и их комбинациями. На рис. 1 представлены нормализованные результаты гель-фильтрационной ВЭЖХ для нескольких вариантов данной конструкции. Комбинация трех точечных мутаций Y148^{3.41}W + F158^{3.51}Y + A329^{7.57}D оказалась лучше других.

Вторым этапом работы стала термостабилизация рецептора, необходимая, в частности, для кристаллизации в липидной кубической фазе, проводимой при комнатной температуре [15], а также других структурно-функциональных исследований белка. Для решения этой задачи также был произведен ряд генетических модификаций GPR17. Список мутаций-кандидатов был сформирован при помощи вычислительного инструмента CompoMug (Computational Predictions of Mutations in GPCRs), использующего алгоритмы машинного обучения и разработанного специально для предсказания *in silico* термостабилизирующих точечных мутаций рецепторов класса GPCR [16]. Все новые кандидаты были внесены в конструкцию GPR17 R252-BRIL-V253 с мутациями Y148^{3.41}W + F158^{3.51}Y + A329^{7.57}D в качестве четвертой мутации, а затем стабильность рецептора была протестирована методом анализа кривых плавления. Данный метод заключается в том, что температура белкового образца постепенно повышается в присутствии красителя CPM (*N*-[4-(7-диэтиламино-4-метил-3-кумаринил)фенил]-

малеимид), что сопровождается увеличением флуоресценции вследствие связывания CPM с постепенно высвобождающимися остатками цистеина, которые в нативном состоянии встроены в гидрофобное ядро белка. Таким образом, зависимость интенсивности флуоресценции от температуры коррелирует со стабильностью анализируемого белка [17]. Сводные результаты данного анализа для различных точечных мутаций GPR17 представлены на рис. 2. Выяснилось, что 4 из 11 протестированных точечных мутаций сдвигают кривую плавления GPR17 в область более высоких температур, следовательно, являются стабилизирующими.

На третьем этапе стабилизации рецептора наилучшие мутации комбинировали. В дополнительных материалах (приложение 4) приведены температуры плавления конструкций с различными комбинациями точечных мутаций. В конечном итоге наиболее стабильной оказалась конструкция с шестью точечными мутациями: R252-BRIL-V253 A131^{3.24}L + Y148^{3.41}W + F158^{3.51}Y + F231^{5.49}L + I234^{5.52}L + A329^{7.57}D, ее схематичное изображение приведено на рис. 3, а результаты аналитической хроматографии и кривая плавления – на рис. 4. В дополнительных материалах (приложение 5) представлены результаты электрофореза в ПААГ для наиболее стабильной конструкции в сравнении с конструкцией R252-BRIL-V253 F158^{3.51}Y + A329^{7.57}D. У стабилизированной дополнительными точечными мутациями конструкции заметно меньше следов деградации рецептора.



Рис. 2. Диаграмма, отражающая термический сдвиг в результате внесения в GPR17 точечных мутаций. Показаны усредненные значения, полученные в результате трех независимых экспериментов.

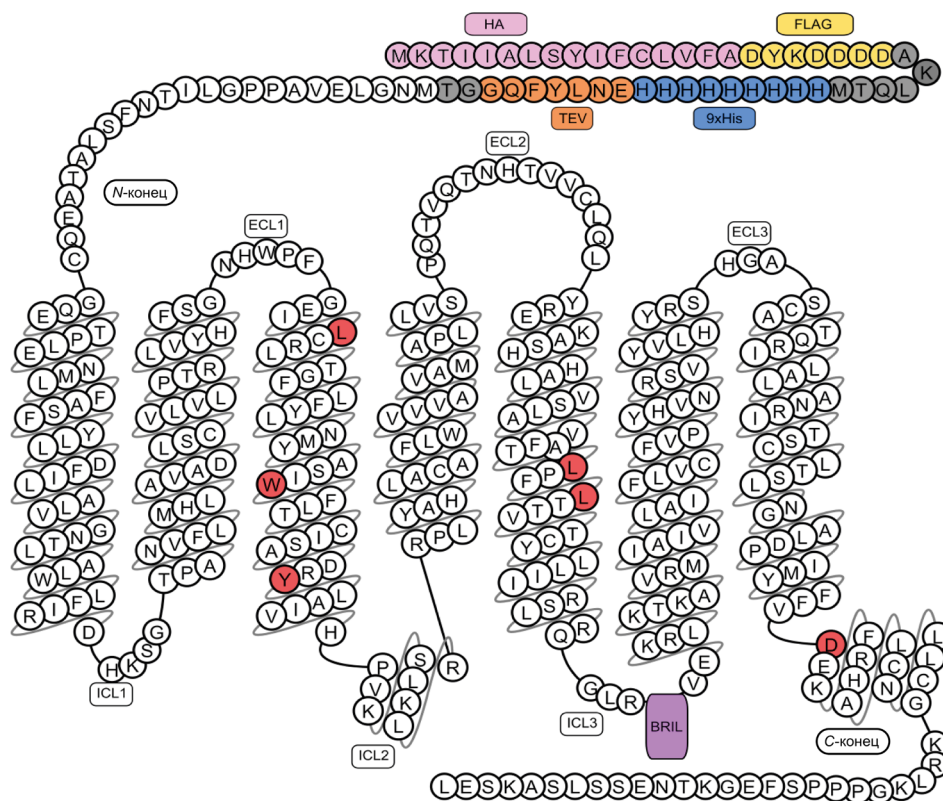


Рис. 3. Схематичное изображение лучшей конструкции. Красным цветом обозначены внесенные точечные мутации, фиолетовым – партнерный белок BRIL, розовым – HA-фрагмент, желтым – последовательность FLAG, голубым – 9 остатков гистидина, оранжевым – сайт протеазы TEV, серым – атавистические линкеры.

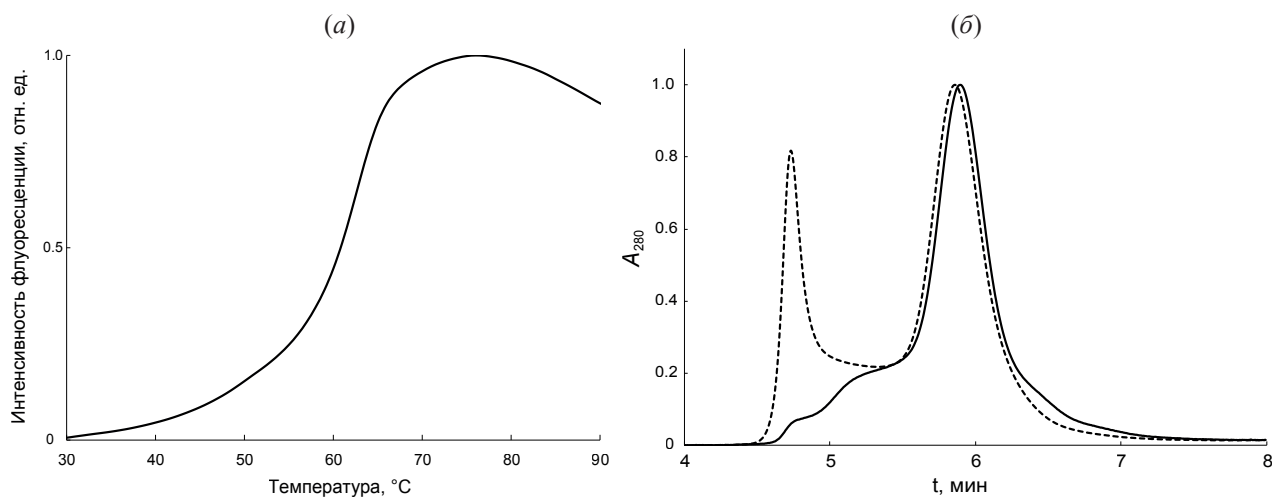


Рис. 4. Нормализованная кривая плавления (а) и результаты аналитической гель-фильтрационной ВЭЖХ (б) для самой лучшей конструкции R252-BRIL-V253 с мутациями A131^{3.24}L + Y148^{3.41}W + F158^{3.51}Y + F231^{5.49}L + I234^{5.52}L + A329^{7.57}D. Сплошная линия – образец с концентрацией 0.1 мг/мл, пунктирная – 30 мг/мл.

Следует отметить, что некоторые конструкции, слегка отличающиеся набором мутаций, тоже подходят для структурно-функциональных исследований:

– R252-BRIL-V253 Y148^{3.41}W + F158^{3.51}Y + F231^{5.49}L + I234^{5.52}L + A329^{7.57}D;

– R252-BRIL-V253 Y148^{3.41}W + F158^{3.51}Y + F231^{5.49}L + G318^{7.46}S + A329^{7.57}D;

– R252-BRIL-V253 Y148^{3.41}W + F158^{3.51}Y + I234^{5.52}L + G318^{7.46}S + A329^{7.57}D;

– R252-BRIL-V253 A131^{3.24}L + Y148^{3.41}W + F158^{3.51}Y + F231^{5.49}L + A329^{7.57}D.

Температуры плавления всех этих конструкций находятся в интервале 59–61°C, а результаты гель-фильтрации при высоком давлении для них приведены в дополнительных материалах (приложение 6).

Для ряда структурных исследований, в частности для кристаллизации GPCR, крайне важно, чтобы рецептор сохранял свою мономерность в области высоких концентраций (30–40 мг/мл) [12, 18]. На рис. 4 и в дополнительных материалах (приложение 6) приведены результаты гель-фильтрации для концентрированных образцов GPR17. При концентрировании до 30 мг/мл наименьшая доля белковых агрегатов наблюдается у конструкций R252-BRIL-V253 Y148^{3.41}W + F158^{3.51}Y + I234^{5.52}L + G318^{7.46}S + A329^{7.57}D и R252-BRIL-V253 A131^{3.24}L + Y148^{3.41}W + F158^{3.51}Y + F231^{5.49}L + A329^{7.57}D.

Оптимизация протоколов выделения. Стартовый протокол выделения опирался на структурные исследования гомологичных GPCR [18]. В данной работе варьировали солевой состав буфера для выделения и очистки GPR17. На рис. 5 приведены данные, из которых следует, что оптимальная соль – хлорид натрия, к нему близок хлорид калия по своему влиянию на стабильность GPR17, а хлорид магния отрицательно влияет на стабильность рецептора, существенно снижая его температуру плавления.

Был проведен скрининг различных концентраций солей и глицерина. Выяснилось, что для сохранения температуры плавления рецептора на максимальном для рассматриваемой конструкции уровне концентрация хлорида натрия в буфере должна находиться в пределах 100–800 mM, а концентрация глицерина – в пределах 2–10% по объему.

В ходе работы выполняли поиск возможного лиганда данного рецептора, который мог бы стабилизировать его в определенной конформации. Методом анализа кривых плавления была протестирована таргетированная библиотека, состоящая более чем из 60 химических соединений, среди которых были UDP, UDP-глюкоза, ATP, Pranlukast, MDL29951 и другие, которые в литературе фигурировали как потенциальные лиганды GPR17. Ни одно из проверенных соединений не оказало стабилизирующего действия на исследуемый рецептор, более того, многие лиганды

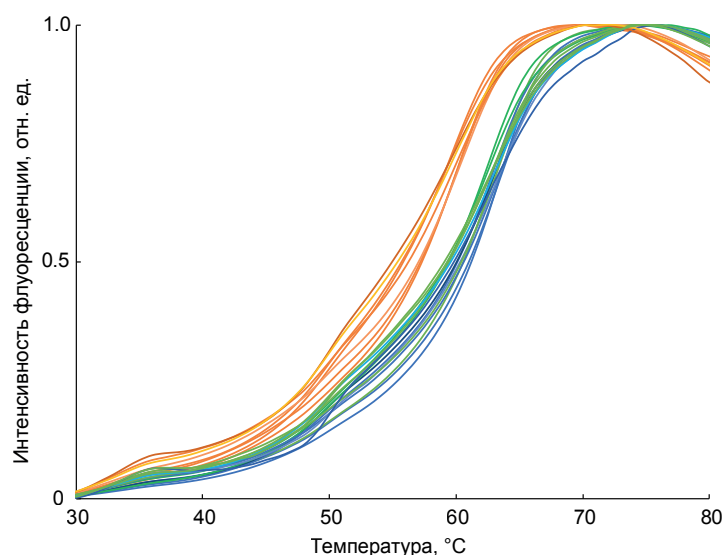


Рис. 5. Влияние солевого состава буфера на термостабильность GPR17. Показаны кривые плавления для нескольких конструкций рецептора. Для каждой конструкции эксперимент проводился в трех разных буферах: синие линии соответствуют буферу с NaCl в составе, зеленые – с KCl, а оранжевые – с MgCl₂. Концентрации солей в данном эксперименте составляла 500 mM.

его дестабилизировали, существенно снижая температуру плавления. Данные о температуре плавления GPR17 в комплексе с наиболее часто встречающимися в литературе потенциальными лигандами приведены в табл. 2.

Стоит отметить, что вопрос о лигандах GPR17 весьма неоднозначен, хотя и широко освещался в литературе. В самой первой работе, где серьезно исследовался вопрос взаимодействия GPR17 с лигандами [19], авторы показали, что данный рецептор связывается с двумя типами лигандов: урацил-нуклеотидами и цистеинил-лейкотриенами. Во всех своих последующих работах эта группа авторов дает множество экспериментальных подтверждений. Однако далеко не все исследовательские группы смогли получить те же результаты. В табл. 3 сведена информация об

экспериментальных данных, полученных независимыми группами ученых. Видно, что между ними нет однозначного согласия по поводу связывания GPR17 с рассматриваемыми лигандами.

Опубликованная структура GPR17 [9] показывает рассматриваемый рецептор в активном состоянии в комплексе с белком $G_{\alpha i}$. Тем не менее в структуре отсутствует какой бы то ни было лиганд, что нехарактерно для “активных” структур рецепторов класса GPCR. Вместо агониста в лиганд-связывающем кармане GPR17 находится фрагмент внеклеточной петли между 4 и 5 трансмембранными спиралями, и это дает повод предположить, что GPR17 – это аутоактивирующийся рецептор, не требующий эндогенного агониста для нормального функционирования в организме.

Таблица 2. Температура плавления рецептора GPR17 в зависимости от добавленного в буфер лиганда

Потенциальный лиганд GPR17	Температура плавления, °C
Контрольный образец (без лиганда)	55
N6-cyclopentyl-ATP (Jena Bioscience)	55
ATP	55
Pranlukast	53
UK137910	55
MDL29-951	55
HAM13379	53
UDP	55
UDP-глюкоза	55

Примечание: В экспериментах использовали конструкцию R252-BRIL-V253 Y148^{3.41}W + F158^{3.51}Y + A329^{7.57}D.

Таблица 3. Противоречивые данные о связывании GPR17 с наиболее часто упоминаемыми в литературе лигандами, полученными различными исследовательскими группами

Ссылка	UDP	UDP-глюкоза	UDP-галактоза	ATP	LTC4	LTD4	Cangrelor
[19]	Да	Да	Да	Только GPR17L	Да	Да	Да
[20]	–	Нет	–	–	Нет	Нет	–
[21]	Только GPR17S	Да	Да	–	Нет	Нет	–
[22]	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет	–	–
[23–25]	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет	Нет
[26]	Нет	Нет	–	–	Нет	Нет	Нет

Примечание: GPR17L и GPR17S – длинная и короткая изоформы рецептора соответственно [14].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение генно-инженерных конструкций.

Синтетическая нуклеотидная последовательность, кодирующая GPR17 (Uniprot ID Q13304), была куплена в библиотеке плазмид cdna.org, гены партнерных белков BRIL (PDB ID: 1M6T) и рубредоксина (PDB ID: 1FHM) были синтезированы *de novo* в компании Genscript (США).

Вставку нуклеотидной последовательности партнерного белка в нуклеотидную последовательность гена GPR17 проводили с помощью ПЦР, рестрикции и лигирования. Место вставки варьировалось в целях увеличения уровня экспрессии и стабилизации экспрессируемого белка. Использовали полимеразу Phusion High-Fidelity DNA Polymerase в буфере GC (Thermo Fisher Scientific, США), праймеры были синтезированы в компании Евроген (Россия). Нуклеотидные последовательности праймеров для вставки партнерного белка BRIL в третью внутриклеточную петлю между аминокислотными остатками R252 и V253 (оптимальное положение): прямой праймер gaatgcatacattcagaagtacctgGTGGAGAAGCG-CCTCAAGAC, обратный праймер cccaattgtctccagatcagcACGCAGGCCCTGCCGCAG (заглавные буквы соответствуют участкам, отжигающимся на гене GPR17, а строчные – на BRIL). Продукты ПЦР очищали посредством электрофореза в 1%-ном агарозном геле, выделение из геля проводили с использованием коммерческого набора Gel Extraction Kit (Qiagen, Германия). Реакцию рестрикции проводили в течение часа при 37°C в FD-буфере, используя рестриктазы FD KpnI и FD HindIII (Thermo Fisher Scientific, США). Фрагменты ДНК с липкими концами очищали в 1%-ном агарозном геле аналогично ПЦР-продукту. Далее проводили реакцию лигирования в течение ночи при 21°C: в лигазную смесь объемом 20 мкл добавляли ~500 нг ДНК с молярным соотношением вектор: вставка от 3 : 1 до 5 : 1, а также 1 мкл 100 мМ АТФ и 1 ед. ДНК-лигазы фага T4 (Thermo Fisher Scientific, США). Полученную лигазную смесь использовали для трансформации химически компетентных клеток *Escherichia coli* штамма Top10.

Внесение в генно-инженерную конструкцию точечных мутаций и других небольших изменений осуществляли методом безлигазного клонирования. Для проведения ПЦР плазмиды целиком использовали полимеразу Pfx в составе смеси AccuPrime Pfx SuperMix (Thermo Fisher, США). Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала 100–300 нг матричной ДНК и по 500 нМ праймеров. Чтобы отделить целевой продукт от

исходной ДНК, ПЦР-смесь в течение 3 ч при 37°C обрабатывали 10 ед. активности рестриктазы DpnI (NEB) с добавлением 2 мкл буфера для рестрикции Cut Smart (NEB, США), при этом происходило расщепление метилированной матричной ДНК. Затем проводили трансформацию компетентных клеток *E. coli* штамма Top10 аналогично рестриктазно-лигазному методу.

Все описываемые генно-инженерные конструкции GPR17 имели на N-конце следующие модификации: НА-последовательность для направления рецептора в клеточную мембрану при трансляции (MKTIIALSYIFCLVFA), метку FLAG для анализа экспрессии (DYKDDDD), линкер (AKLQTM), метку 10xHis для очистки, сайт распознавания и расщепления протеазы TEV (ENLYFQG). Схематичное изображение оптимизированной конструкции со всеми сигнальными последовательностями представлено на рис. 3.

Рекомбинантная наработка белка методом бакуловиральной экспрессии. Конструкции клонировали в вектор pFastBac1 (Invitrogen, США). После контрольного секвенирования по протоколу Bac-to-Bac (Invitrogen, США) были приготовлены бакуловirus для дальнейшей работы: плазмидой pFastBac1 трансформировали клетки *E. coli* (штамм DH10Bac), где происходила транспозиция гена интереса в челночный вектор *bMON14272* – бакмиду. Далее бакмиду в стерильных условиях выделяли из клеток с помощью коммерческого набора Plasmid Midi (Qiagen, Германия) и пересаживали в изопропиловом спирте. Очищенную бакмиду хранили при 4°C не более месяца.

Клеточную линию Sf9 культивировали в среде ESF921 (Thermo Fisher Scientific, США). Бакмиду доставляли в клетки методом трансфекции. Очищенную бакмиду (5 мкл, с концентрацией 1–2 мкг/мкл) добавляли в следующую смесь: 100 мкл среды для трансфекции Transfection Medium (Thermo Fisher Scientific, США), 3 мкл катион-липидного реагента для трансфекции X-tremeGENE 9 (Roche, Швейцария). Смесь инкубировали 15–30 мин при комнатной температуре в стерильных условиях, затем добавляли к 3 мл клеток с плотностью 1×10^6 кл./мл.

Первичную наработку вируса проводили в круглодонном глубоком 24-луночном планшете, покрытом воздухопроницаемой пленкой, при 28°C и постоянном перемешивании в течение 96 ч в шейкере-инкубаторе ShellLab Shaking Incubator (Sheldon Manufacturing) при 350 об/мин. Далее клетки осаждали центрифугированием при 2000 g и комнатной температуре в течение 7 мин. Супернатант (~2.5 мл) хранили при 4°C в темноте

не более месяца до востребования, затем добавляли в 40 мл клеток с плотностью 2 млн/мл для наработки вирусного стока. Нарботка вирусного стока длилась 72–96 ч при температуре 28°C и перемешивании 120 об/мин в шейкере-инкубаторе Innova 44 New Brunswick (Eppendorf, Германия). Клетки отделяли центрифугированием при 2000 g при комнатной температуре в течение 10 мин, вирус в супернатанте аккуратно отбирали и хранили в темноте при 4°C до востребования. Концентрацию вирусных частиц в единице объема определяли методом проточной цитометрии (см. ниже).

При инфекции клетки с плотностью 2×10^6 кл./мл заражали вирусом в количественном соотношении 1 : 5 соответственно. Нарботка биомассы длилась 48 ч при 28°C и перемешивании 120 об/мин в шейкере-инкубаторе Innova 44 New Brunswick.

После экспрессии GPR17 клетки осаждали методом центрифугирования (2000 g, 10 мин) и хранили до востребования при температуре –80°C.

Анализ титра вируса и экспрессии белка методом проточной цитометрии. Перед экспрессией рецептора в клеточной линии Sf9 измеряли заражающий титр бакуловируса. Для этого приготовленный бакуловирс разбавляли средой ESF921 в 500, 1000 и 2000 раз, добавляли 20 мкл к 100 мкл клеток Sf9 с концентрацией 2 млн/мл. Спустя 24 ч методом проточной цитометрии измеряли процент клеток, экспрессирующих белок оболочки бакуловируса GP64 на поверхности. Использовали проточный цитометр BD Accuri C6 Plus (BD Biosciences, США). Перед измерением клетки обрабатывали моноклональными анти-GP64-антителами, конъюгированными с флуорофором фикоэритрином (Thermo Fisher, США; $\lambda_{\text{полл}} = 496$ нм, $\lambda_{\text{эм}} = 578$ нм). Титр вируса рассчитывали по формуле:

$$T = -\frac{Nd}{V} \ln(1 - g),$$

где T – количество вирусных частиц в 1 мл, N – общее количество клеток, d – коэффициент разведения вируса, V – объем добавленного разведенного вируса, g – доля клеток, экспрессирующих GP64 на поверхности.

Экспрессию GPR17 как на поверхности, так и внутри клеток также оценивали методом проточной цитофлуориметрии: перед измерением на проточном цитометре BD Accuri C6 Plus пробу клеточной культуры обрабатывали антителами с флуоресцентной меткой. Использовали моноклональные антитела против последовательности метки FLAG: ANTI-FLAG® M2-FITC (Sigma,

США), $\lambda_{\text{полл}} = 495$ нм, $\lambda_{\text{эм}} = 519$ нм. Для определения экспрессии GPR17 внутри клеток в пробу дополнительно добавляли Triton X-100 (Sigma, США) – детергент для пермеабилзации клеточной мембраны.

Очистка белка. Очистку GPR17 проводили во льду или при 4°C. Клеточную биомассу с GPR17 в плазматической мембране сначала подвергали лизису путем ресуспендирования в гипотоническом буфере, содержащем 10 mM Hepes (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 20 mM KCl и комплексный ингибитор протеаз Complete (Roche, Швейцария), затем мембраны трижды промывали высокосолевым буфером, содержащим 10 mM Hepes (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 20 mM KCl, 1 M NaCl и ингибитор протеаз Complete. Осаждение мембран выполняли на ультрацентрифуге Coulter Optima XPN-100 (Beckman, США) с ротором 45Ti (200 000 g, 30 мин). После промывания в высокосолевым буфере мембранную фракцию ресуспендировали в буфере (Hepes 20 mM, NaCl 500 mM) объемом 25 мл. Здесь и далее все количественные параметры приведены в расчете на количество биомассы, полученной с 1 л клеточной культуры. После ресуспендирования к промытым мембранам добавляли солюбилизирующий буфер объемом 25 мл (Hepes 20 mM, NaCl 500 mM, глицерин 20% (v/v), *n*-додецил-*d*-мальтопираниозид (DDM; Avanti Polar Lipids, США) 1% (w/v) и холестерилгемисукцинат (CHS; Sigma-Aldrich, США) 0.2% (w/v)). Рецептор извлекали из мембран и переводили в детергентные мицеллы в процессе солюбилизации на протяжении 3 ч с перемешиванием (7 об/мин). После солюбилизации GPR17 в мицеллах отделяли от остатков мембран путем центрифугирования на протяжении 55 мин при 500 000 g (Beckman Coulter Optima XPN-100 с ротором 70Ti). Далее супернатант с рецептором в мицеллах инкубировали с металл-аффинной смолой TALON Superflow Resin (Clontech, США; 800 мкл) на протяжении 12–16 ч с перемешиванием (7 об/мин). После посадки рецептора на смолу проводили промывки: сперва 8 мл промывочного раствора, содержащего 100 mM Hepes (pH 7.5), 500 mM NaCl, 10% (v/v) глицерина, 0.1% (w/v) DDM, 0.02% (w/v) CHS, 15 mM имидазола, 10 mM MgCl₂ и 8 mM АТФ, затем 4 мл раствора, содержащего 50 mM Hepes (pH 7.5), 500 mM NaCl, 10% (v/v) глицерина, 0.05% (w/v) DDM, 0.01% (w/v) CHS, 30 mM имидазола. Далее белок элюировали буфером (2.5 мл), содержащим 25 mM Hepes (pH 7.5), 500 mM NaCl, 10% (v/v) глицерина, 0.05% (w/v) DDM, 0.01% (w/v) CHS и 300 mM имидазола. Затем выполняли обессоливание GPR17 на гель-фильтрационной

колонке G-25 с наполнителем Sephadex G-25 (GE Healthcare, США) в буфере 25 mM Hepes (pH 7.5), 500 mM NaCl, 10% (v/v) глицерина, 0.05% (w/v) DDM, 0.01% (w/v) CHS.

Функциональный анализ выделенного рецептора. Аналитическую хроматографию – гель-фильтрацию при высоком давлении выполняли при помощи системы ВЭЖХ Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific, США) с колонкой Sepax Nanofilm SEC-250 (Sepax Technologies, США). Состав буфера для ВЭЖХ: Hepes 20 mM, глицерин 2% (v/v), NaCl 500 mM, $MgCl_2$ 10 mM, DDM, 0.05% (w/v), CHS 0.01% (w/v). Поток 0.35 мл/мин, детектирование УФ 280 нм.

Электрофорез в ПААГ проводили с 12%-ным разделяющим и 4%-ным концентрирующим гелем на основе смеси акриламид : бисакриламид 37.5 : 1 (Bio-Rad, США) в присутствии 0.1% додецилсульфата натрия при постоянном напряжении 120 В в течение 2.5 ч в трис-глицериновом буфере на приборе Mini Protean Tetra Cell (Bio-Rad, США).

Аналитическое плавление рецептора проводили на приборе Rotor-Gene Q (Qiagen, Германия) в присутствии флуоресцирующего при взаимодействии с тиольными и, в меньшей степени, гидрофобными группами реагента CPM (Invitrogen, США; $\lambda_{\text{полл}} = 488$ нм, $\lambda_{\text{эм}} = 647$ нм). Белок денатурировал при постепенном повышении температуры от 25 до 95°C со скоростью 1°C/мин. Температуру плавления рецептора определяли как температуру, при которой повышение флуоресценции образца составляло половину от максимального. При тестировании лигандов их добавляли к рецептору в нескольких концентрациях, лежащих в диапазоне $100 \dots 10\,000 \times EC_{50}/IC_{50}$, значения которых были взяты из литературных источников, приведенных в табл. 3.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

GPR17 – орфанный GPCR и важная, активно исследуемая фармакологическая мишень. В настоящее время неизвестна структура неактивного состояния белка, а для лиганд-связывающего кармана решенной структуры активного состояния разрешение составляет 4 Å, таким образом, делая структурно-функциональные исследования этого белка актуальной для биомедицины задачей. В результате проведенного исследования был разработан ряд генно-инженерных конструкций GPR17 для рекомбинантной экспрессии данного рецептора: были идентифицированы генно-инженерные модификации, увеличивающие поверхностную экспрессию рецептора и его термостабильность, а именно стабилизирующие рецептор точечные му-

тации и оптимальное положение белка-партнера. Также подобран оптимальный буферный состав для очистки белка.

Описанные в настоящей статье разработки могут быть использованы как для структурно-функциональных исследований GPR17, так и выступать в качестве примера стратегии для оптимизации работы с новыми GPCR.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Анастасии Гусач за ценные советы, участие и помощь в проведении экспериментов, а также Светлане Устиновой за подготовку реактивов, ведение нетрансформированных клеточных линий и поддержание порядка в лаборатории.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работы по генетической инженерии и экспрессии белка выполнены при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (договор № 075-03-2024-117, проект № FSMG-2024-0012). Очистку и функциональный анализ рецептора выполняли при поддержке Российского научного фонда (проект № 24-74-10020, <https://rscf.ru/project/24-74-10020/>).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Все авторы внесли равноценный вклад в написание статьи.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kuneš J., Hojná S., Mráziková L., Montezano A., Touyz R., Maletínská L. // *Physiol Res.* 2023. V. 72. P. S73–S90. <https://doi.org/10.33549/physiolres.935109>
2. Marucci G., Dal Ben D., Lambertucci C., Marti Navia A., Spinaci A., Volpini R., Buccioni M. // *Exp. Opin. Ther. Pat.* 2019. V. 29. P. 85–95. <https://doi.org/10.1080/13543776.2019.1568990>
3. Dziejczak A., Miller E., Saluk-Bijak J., Bijak M. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. P. 1852. <https://doi.org/10.3390/ijms21051852>

4. Ou Z., Sun Y., Lin L., You N., Liu X., Li H., Ma Y., Cao L., Han Y., Liu M., Deng Y., Yao L., Lu Q.R., Chen Y. // *J. Neurosci.* 2016. V. 36. P. 10560–10573. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0898-16.2016>
5. Yan S., Conley J.M., Reilly A.M., Stull N.D., Abhyankar S.D., Ericsson A.C., Kono T., Molosh A.I., Kubal C.A., Evans-Molina C., Ren H. // *Cell Rep.* 2022. V. 38. P. 110179. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.110179>
6. Ren H., Cook J. R., Kon N., Accili D. // *Diabetes.* 2015. V. 64. P. 3670–3679. <https://doi.org/10.2337/db15-0390>
7. Sriram K., Insel P.A. // *Mol. Pharmacol.* 2018. V. 93. P. 251–258. <https://doi.org/10.1124/mol.117.111062>
8. Khorn P.A., Luginina A.P., Pospelov V.A., Dashevsky D.E., Khnykin A.N., Moiseeva O.V., Safronova N.A., Belousov A.S., Mishin A.V., Borshchevsky V.I. // *Biochemistry (Moscow).* 2024. V. 89. P. 747–764. <https://doi.org/10.1134/S0006297924040138>
9. Ye F., Wong T., Chen G., Zhang Z., Zhang B., Gan S., Gao W., Li J., Wu Z., Pan X., Du Y. // *MedComm (Beijing).* 2022. V. 3. P. e159. <https://doi.org/10.1002/mco2.159>
10. Van Montfort R.L.M., Workman P. // *Essays Biochem.* 2017. V. 61. P. 431–437. <https://doi.org/10.1042/EBC20170052>
11. Chun E., Thompson A.A., Liu W., Roth C.B., Griffith M.T., Katritch V., Kunken J., Xu F., Cherezov V., Hanson M.A., Stevens R.C. // *Structure.* 2012. V. 20. P. 967–976. <https://doi.org/10.1016/j.str.2012.04.010>
12. Гусач А.Ю. // Структурные исследования человеческого цистенил-лейкотриенового рецептора второго типа для создания новых лекарственных препаратов. Дис. канд. физ.-мат. наук, МФТИ, Москва, 2020.
13. Ballesteros J.A., Weinstein H. // *Methods Neurosci.* 1995. V. 25. P. 366–428. [https://doi.org/10.1016/S1043-9471\(05\)80049-7](https://doi.org/10.1016/S1043-9471(05)80049-7)
14. Bläsius R., Weber R.G., Lichter P., Ogilvie A. // *J. Neurochem.* 1998. V. 70. P. 1357–1365. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1998.70041357.x>
15. Cherezov V., Abola E., Stevens R.C. // *Methods Mol. Biol.* 2010. P. 141–168. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-762-4_8
16. Popov P., Peng Y., Shen L., Stevens R.C., Cherezov V., Liu Z.J., Katritch V. // *Elife.* 2018. V. 7. P. e34729. <https://doi.org/10.7554/eLife.34729>
17. Alexandrov A.I., Mileni M., Chien E.Y.T., Hanson M.A., Stevens R.C. // *Structure.* 2008. V. 16. P. 351–359. <https://doi.org/10.1016/j.str.2008.02.004>
18. 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. // *Sci. Adv.* 2019. V. 5. P. eaax2518. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax2518>
19. Ciana P., Fumagalli M., Trincavelli M.L., Verderio C., Rosa P., Lecca D., Ferrario S., Parravicini C., Capra V., Gelosa P., Guerrini U., Belcredito S., Cimino M., Sironi L., Tremoli E., Rovati G.E., Martini C., Abbracchio M.P. // *EMBO J.* 2006. V. 25. P. 4615–4627. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601341>
20. Maekawa A., Balestrieri B., Austen K.F., Kanaoka Y. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. P. 11685–11690. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905364106>
21. Benned-Jensen T., Rosenkilde M.M. // *Br. J. Pharmacol.* 2010. V. 159. P. 1092–1105. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00633.x>
22. Qi A.D., Harden T.K., Nicholas R.A. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2013. V. 347. P. 38–46. <https://doi.org/10.1124/jpet.113.207647>
23. Hennen S., Wang H., Peters L., Merten N., Simon K., Spinrath A., Blättermann S., Akkari R., Schrage R., Schröder R., Schulz D., Vermeiren C., Zimmermann K., Kehraus S., Drewke C., Pfeifer A., König G.M., Mohr K., Gillard M., Müller C.E., Lu Q.R., Gomeza J., Kostenis E. // *Sci. Signal.* 2013. V. 6. P. ra93. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2004350>
24. Merten N., Fischer J., Simon K., Zhang L., Schröder R., Peters L., Letombe A., Hennen S., Schrage R., Bödefeld T., Vermeiren C., Gillard M., Mohr K., Lu Q.R., Brüstle O., Gomeza J., Kostenis E. // *Cell Chem. Biol.* 2018. V. 25. P. 775–786.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2018.03.012>
25. Simon K., Merten N., Schröder R., Hennen S., Preis P., Schmitt N., Peters L., Schrage R., Vermeiren C., Gillard M., Mohr K., Gomeza J., Kostenis E. // *Mol. Pharmacol.* 2017. V. 91. P. 518–532. <https://doi.org/10.1124/mol.116.107904>
26. Harrington A.W., Liu C., Phillips N., Nepomuceno D., Kuei C., Chang J., Chen W., Sutton S.W., O'Malley D., Pham L., Yao X., Sun S., Bonaventure P. // *Br. J. Pharmacol.* 2023. V. 180. P. 401–421. <https://doi.org/10.1111/bph.15969>

Construct Design, Isolation and Purification of the Monomeric Form of Human GPCR GPR17 for Structural and Functional Studies

**N. A. Safronova*, A. P. Luginina*, A. A. Sadova*, M. B. Shevtsov*, O. V. Moiseeva*,
V. I. Borshchevskiy*, A. V. Mishin*,#**

Phone: +7 (916) 810-07-84; e-mail: mishinalexej@gmail.com

** Research Center for Molecular Mechanisms of Aging and Age-related Diseases,
Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University),
Institutsky per. 9, Dolgoprudny, 141701 Russia*

G protein-coupled receptors (GPCRs) are a family of heptahelical transmembrane proteins consisting of more than 800 representatives in the human genome that regulate most processes in the human body and are targets for up to a third of all modern drugs. Many GPCRs, despite their importance for pharmacology, are still considered orphan, i.e., their endogenous ligand is unknown. Orphan receptor GPR17, belonging to class A GPCR, is expressed mainly in the central nervous system, plays an important role in the formation of the myelin sheath of neurons and is a potential target for the development of new drugs against multiple sclerosis, Alzheimer's disease and ischemia. The aim of this work was to prepare GPR17 for structure-functional studies, starting with the heterologous expression and ending with obtaining a stable protein sample. Screening of various genetically engineered constructs was performed, a number of point mutations were analyzed, and a significant number of potential ligands of this receptor were tested. As a result of the work, the conditions for expression, isolation, and purification of GPR17 were optimized, which together made it possible to obtain a fairly stable and monomeric protein preparation suitable for further structural studies.

Keywords: GPCR, GPR17, protein stabilization