

Подготовка и иммобилизация рецепторов, сопряженных с G-белком, для исследований конформационной динамики

Научный руководитель – Борщевский Валентин Иванович

Воронина М.Д.¹, Маслов И.В.²

1 - Московский физико-технический институт, Москва, Россия, *E-mail: voronina.md@phystech.edu*; 2 - Московский физико-технический институт, Москва, Россия, *E-mail: ivan.v.maslov@phystech.edu*

Рецепторы, связанные с G-белками (GPCRs), вовлечены в широкий круг физиологических процессов, таких как зрение, обоняние, регуляция активности иммунной системы и воспаления, функционирование вегетативной нервной системы. Именно они являются мишенями для 40% выпускаемых лекарственных средств [1]. Функция рецепторов определяется его конформационной динамикой, но только для малой доли GPCRs предложены какие-либо модели, а для тех из них, что были изучены с этой точки зрения, данные нередко довольно противоречивы [2-4]. Изучение белков методами микроскопии одиночных молекул дает возможность получить эту информацию [5, 6]. Наблюдение за сменой конформационного состояния рецептора возможно посредством измерения спектроскопических свойств флуоресцентной метки, ковалентно-связанной с определенными участками в молекулах белка. Проведение такого эксперимента невозможно без тщательной пробоподготовки. Важно, чтобы введение точечной мутации, определяющей место связывания с красителем, не сказалось на функции рецептора, а флуоресцентная метка, оставаясь чувствительной к окружению, не препятствовала подвижности. Для отслеживания субсекундных конформационных изменений в рецепторе необходимо иммобилизовать его на поверхности стекла, поэтому важно подобрать подходящую мембраномоделирующую систему, в которой будет встроен рецептор. В качестве модельного рецептора в данной работе был выбран человеческий аденозиновый рецептор A2a. Были подобраны, выделены и очищены 6 его перспективных мутантных конструкций, которые были специфично помечены, встроены в нанодиски на основе мембранного каркасного белка с целью дальнейшего изучения методом микроскопии одиночных молекул. Работа выполнена при поддержке РФФИ 20-34-70034.

Источники и литература

- 1) Filmore, David. It's a GPCR world // Modern Drug Discovery. — American Chemical Society, 2004. — Т. 2004, № November. — С. 24–28.
- 2) Eddy M.T. et al. Allosteric Coupling of Drug Binding and Intracellular Signaling in the A2A Adenosine Receptor // Cell. 2018. Vol. 172, № 1–2. P. 68–80.e12.
- 3) Ye L. et al. Mechanistic insights into allosteric regulation of the A2A adenosine G protein-coupled receptor by physiological cations // Nat. Commun. Springer US, 2018. Vol. 9, № 1.
- 4) Landin E.J. et al. The Aminotriazole Antagonist Cmpd-1 Stabilises a Novel Inactive State of the Adenosine 2A Receptor // Angew. Chemie. 2019. P. ange.201902852.
- 5) Lin S. Fluorescent Labeling of Purified beta(2) Adrenergic Receptor // J. Biol. Chem. 1995. Vol. 270, № 47. P. 28268–28275.
- 6) Ghanouni P. et al. Agonist-induced conformational changes in the G-protein-coupling domain of the 2 adrenergic receptor // Proc. Natl. Acad. Sci. 2001. Vol. 98, № 11. P. 5997–6002.