

Эксперименты по кристаллизации человеческого эндотелинового рецептора типа В.

Асташкин Р.О.¹, Мишин А. В.¹, Чупин В. В.¹, Черезов В.Г.¹

¹Московский физико-технический институт (государственный университет)

Человеческие эндотелиновые рецепторы относятся к классу рецепторов, сопряженных с G-белком[1]. Этот класс белков является наиболее фармакологически значимым, более чем 40% лекарств направлены на исправление дисфункций данных рецепторов[2]. Эндотелиновая система человека, частью которой являются эндотелиновые рецепторы, играет важную роль в регулировке кровяного давления [1]. Работа этой системы осуществляется следующим образом: клетки эндотелия вырабатывают пептид эндотелин, который, активируя эндотелиновые рецепторы, запускает каскад реакций, приводящих к вазоконстрикции или вазодилатации, в зависимости от подтипа рецептора и ткани [1]. Кроме этого эндотелиновые рецепторы играют роль в таких процессах, как передача нервного импульса, развитие нервного гребня, участвует в регуляции кислотно-солевого баланса в почках[1].

В рамках данной работы была экспрессирована конструкция модифицированного человеческого эндотелинового рецептора В, затем были проведены функциональные тесты полученного белка. После этого были проведены кристаллизационные испытания.

Методами генной инженерии в третью внеклеточную петлю человеческого эндотелинового рецептора типа В был добавлен белок апоцитохром bRIL562. Данный белок является известным драйвером кристаллизации для рецепторов, сопряженных с G-белком [3]. Затем белок нарабатывался с помощью бакуловирусной системы экспрессии в клетках насекомых *sf9*. После этого была произведена очистка и разнообразные функциональные тесты полученного белка. Термостабильность белка была исследована с помощью методики анализа термического сдвига кривой плавления (Thermal Shift Assay). Были проведены эксперименты по адаптации методологии микромасштабного термофореза (Microscale Thermophoresis) для исследования константы связывания эндотелинового рецептора с лигандом. С помощью конфокального микроскопа была определена органельная локализация экспрессированного белка в клетках насекомых с использованием антител. Данные тесты показали, что при выделении получается термостабильный функционально-активный белок. Затем были проведены кристаллизационные испытания эндотелинового рецептора. Белок, окрашенный флуоресцентным красителем Cy3-NHS ester, помещался в кубическую фазу для

дальнейшей кристаллизации при различных условиях. В кубической фазе (LCP) были проведены тесты LCP-FRAP (Fluorescent recovery after photobleaching), показывающие подвижность белка в фазе, что является важным параметром его способности формировать кристаллы. Наблюдение за меченым белком в LCP показало, что в течение 13 дней после кристаллизации в образцах с некоторыми кристаллизационными условиями появились микрокристаллы размером до 10 мкм.

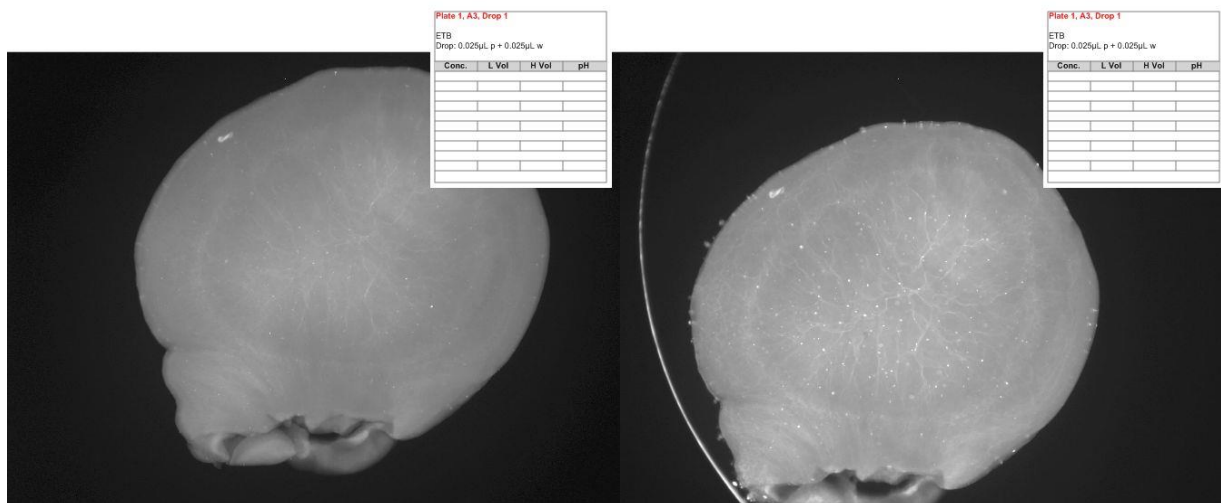


Рис.1

Рис.2

Литература

1. Barton M., Yanagisawa M. // Endothelin:20 years from discovery to therapy. Can J Physiol Pharmacol. -2008. -V.86. N.8. -P. 485-98.
2. Filmore, David // It's a GPCR world. Modern Drug Discovery (American Chemical Society). 2004. – P. 24–28.
3. Eugene Chun, Aaron A. Thompson, Wei Liu, Christopher B. Roth, Mark T. Griffith, Vsevolod Katritch, Joshua Kunken, Fei Xu, Vadim Cherezov, Michael A. Hanson, and Raymond C. Stevens // Fusion Partner Toolchest for the Stabilization and Crystallization of G Protein-Coupled Receptors. Structure. -2012 –V.20. N.6. -P. 967–976.

Рис. 1. Кубическая фаза через 3 дня после начала кристаллизации.

Рис. 2. Кубическая фаза через 17 дней после начала кристаллизации с появившимися микрокристаллами.