

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ К СТАТЬЕ

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

© 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 переулок, 9*

Приложение 1. Аминокислотные последовательности используемых в работе партнерных белков

BRIL:

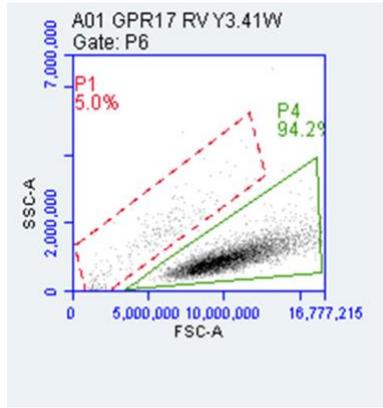
ADLEDNWETLNDNLKVIEKADNAAQVKDALTKMRAAALDAQKATPPKLEDKSPDSEMK-
DFRHGFDILVGQIDDALKLANEGKVKEAQAAAEQLKTRNAYIQKYL

Рубредоксин:

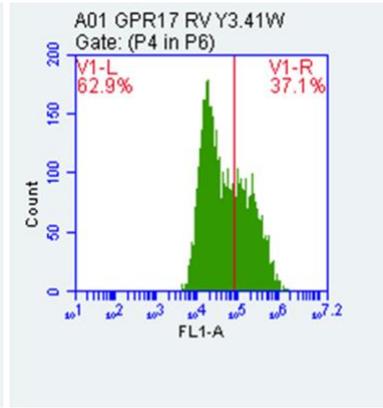
MKKYTCTVCGYIYNPEDGDPDNGVNP GTDFKDIPDDWVCPLCGVGKDQFEEVE

Приложение 2. Результат эксперимента по определению поверхностной экспрессии

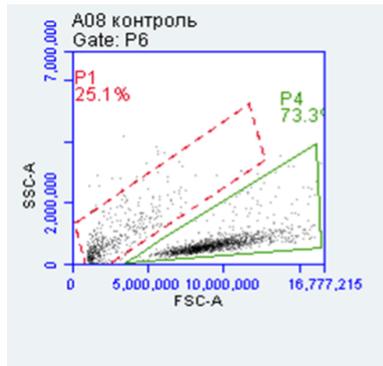
(а)



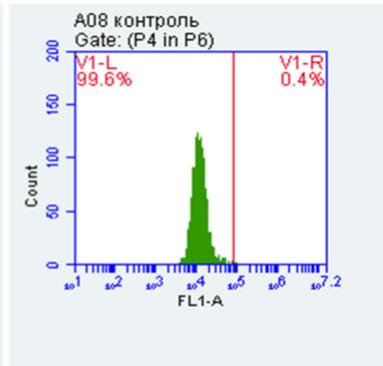
(б)



(в)



(г)



(а, в) – Распределение клеток по сигналам детекции прямого (FSC-A) и бокового (SSC-A) светорассеяния. Зеленым треугольником выделены живые негранулированные клетки; (а) – клетки с рецептором, (в) – контроль;

(б, г) – распределение клеток по интенсивности флуоресценции на длине волны фикоэритрина (FL1-A) и на длине волны 488 нм (FL3-A). Положение вертикальной красной линии определено по данным аналогичного эксперимента для отрицательного контроля, т.е. клеток без экспрессии рассматриваемого рецептора. (б) – клетки с рецептором, (г) – контроль.

Поверхностная экспрессия рецептора в данном эксперименте была равна 37.1%.

Приложение 3. Поверхностная экспрессия всех созданных и протестированных в ходе работы генно-инженерных конструкций GPR17

Конструкции с партнерным белком в ICL3 (указана переменная часть TM5-ICL3-TM6)	WT, %	D105 2.50N, %	D321 7.49N, %	Y148 3.41W, %
...CYLLIIRSLRQ-GLRV-----EKRLKTK...	0	—	—	—
...CYLLIIRSLRQ-GLR BRIL V--EKRLKTK...	0	0	4	22
...CYLLIIRSLR- BRIL Q--GLRVEKRLKTK...	0	0	—	0
...CYLLIIRSLR- BRIL GLRV---EKRLKTK...	0	—	—	0
...CYLLIIRSLR- BRIL LRV----EKRLKTK...	0	—	—	0
...CYLLIIRSLR- BRIL RV-----EKRLKTK...	0	0	—	0
...CYLLIIRSLR- BRIL V-----EKRLKTK...	0	0	—	0
...CYLLIIRSLRQ-G rubredoxin -RLKTK...	0	0	0	0
...CYLLIIRSLRQ-GL BRIL V---EKRLKTK...	—	—	—	6
...CYLLIIRSLRQ- BRIL V-----EKRLKTK...	—	—	—	13
...CYLLIIRSLR- BRIL -----EKRLKTK...	—	—	—	1
...CYLLIIRSLR- BRIL -----KRLKTK...	—	—	—	0
Конструкции с партнерным белком на N-конце (указана переменная часть BRIL N-конец)	WT, %	D105 2.50N, %	D321 7.49N, %	Y148 3.41W, %
BRIL MNGLE...	0	0	4	7
BRIL TNFL...	0	0	0	13
BRIL CGQE...	0	0	—	—

Другие протестированные конструкции				
N-конец	ICL3	C-конец	Точечные мутации	SE, %
полный	...GLR BRIL V...	до P350	F158 ^{3.51} Y	50
полный	...GLR BRIL V...	до P350	M324 ^{7.52} I	10
полный	...GLR BRIL V...	до P350	A329 ^{7.57} D	66
полный	...GLR BRIL V...	до P350	A329 ^{7.57} D	>75
полный	...GLR BRIL V...	до P350	R308 ^{7.35} D	13
полный	...GLR BRIL V...	полный	Y148 ^{3.41} W	40
полный	...GLR BRIL V...	до G342	Y148 ^{3.41} W	8
полный	...GLR BRIL V...	полный	A131 ^{3.24} L + Y148 ^{3.41} W + F158 ^{3.51} Y + F231 ^{5.49} L + I234 ^{5.52} L + A329 ^{7.57} D	>75
полный	...GLR BRIL V...	полный	Y148 ^{3.41} W + A329 ^{7.57} D	>75
полный	...GLR BRIL V...	полный	Y148 ^{3.41} W + F158 ^{3.51} Y + A329 ^{7.57} D	>75
полный	...GLR BRIL V...	полный	Y148 ^{3.41} W + F158 ^{3.51} Y + I234 ^{5.52} L + A329 ^{7.57} D	>75
полный	...GLR BRIL V...	полный	Y148 ^{3.41} W + F158 ^{3.51} Y + F231 ^{5.49} L + A329 ^{7.57} D	>75
полный	...GLR BRIL V...	полный	M60 ^{1.33} L + Y148 ^{3.41} W + F158 ^{3.51} Y + A329 ^{7.57} D	>75
полный	...GLR BRIL V...	полный	I71 ^{1.44} L + Y148 ^{3.41} W + F158 ^{3.51} Y + A329 ^{7.57} D	>75
полный	...GLR BRIL V...	полный	Y148 ^{3.41} W + F158 ^{3.51} Y + N282 ^{6.54} L + A329 ^{7.57} D	>75
полный	...GLR BRIL V...	полный	A131 ^{3.24} L + Y148 ^{3.41} W + F158 ^{3.51} Y + A329 ^{7.57} D	>75
полный	...GLR BRIL V...	полный	Y148 ^{3.41} W + F158 ^{3.51} Y + A304 ^{7.32} L + A329 ^{7.57} D	>75
полный	...GLR BRIL V...	полный	Y148 ^{3.41} W + F158 ^{3.51} Y + M324 ^{7.52} I + A329 ^{7.57} D	>75
полный	...GLR BRIL V...	полный	Y148 ^{3.41} W + F158 ^{3.51} Y + Q249 ^{5.67} A + A329 ^{7.57} D	>75

полный	...GLR BRIL V...	полный	Y148 ^{3.41} W + F158 ^{3.51} Y + T259 ^{6.31} R + A329 ^{7.57} D	>75
полный	...GLR BRIL V...	полный	Y148 ^{3.41} W + F158 ^{3.51} Y + G318 ^{7.46} S + A329 ^{7.57} D	>75
полный	...GLR-S BRIL V...	полный	Y148 ^{3.41} W + A329 ^{7.57} D	40
полный	...GLR-S BRIL V...	полный	Y148 ^{3.41} W + F158 ^{3.51} Y + A329 ^{7.57} D	50
полный	...GLR-S BRIL V...	полный	A329 ^{7.57} D	30
с E33	...GLR- BRIL V...	полный	Y148 ^{3.41} W + F158 ^{3.51} Y + A329 ^{7.57} D	55
с G38	...GLR- BRIL V...	полный	Y148 ^{3.41} W + F158 ^{3.51} Y + A329 ^{7.57} D	>75

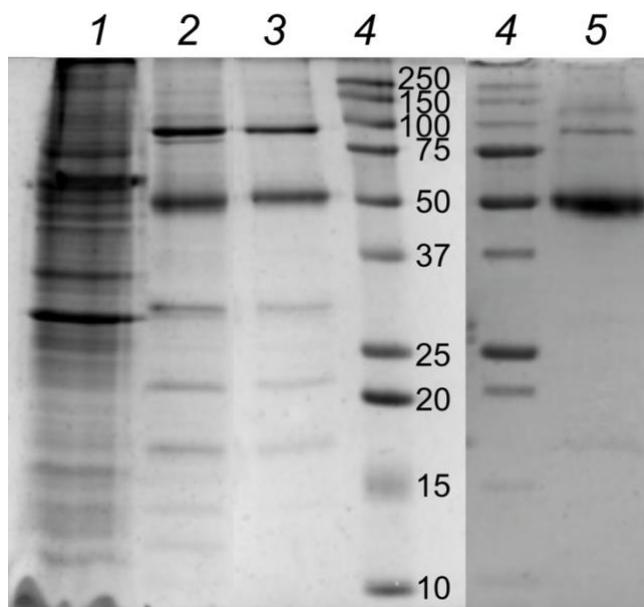
Приложение 4. Усредненные значения температуры плавления для конструкций с различными точечными мутациями

Набор мутаций в конструкции R252-BRIL-V253	Температура плавления, °C
A131^{3.24}L + Y148 ^{3.41} W + F158 ^{3.51} Y + F231^{5.49}L + I234^{5.52}L + A329 ^{7.57} D	61
Y148 ^{3.41} W + A329 ^{7.57} D	52
F158 ^{3.51} Y + A329 ^{7.57} D	56
Y148 ^{3.41} W + F158 ^{3.51} Y + A329 ^{7.57} D	55
Y148 ^{3.41} W + F158 ^{3.51} Y + I234^{5.52}L + A329 ^{7.57} D	56
Y148 ^{3.41} W + F158 ^{3.51} Y + F231^{5.49}L + A329 ^{7.57} D	57
M60^{1.33}L + Y148 ^{3.41} W + F158 ^{3.51} Y + A329 ^{7.57} D	54
I71^{1.44}L + Y148 ^{3.41} W + F158 ^{3.51} Y + A329 ^{7.57} D	51
Y148 ^{3.41} W + F158 ^{3.51} Y + N282^{6.54}L + A329 ^{7.57} D	53
A131^{3.24}L + Y148 ^{3.41} W + F158 ^{3.51} Y + A329 ^{7.57} D	55
Y148 ^{3.41} W + F158 ^{3.51} Y + A304^{7.32}L + A329 ^{7.57} D	53
Y148 ^{3.41} W + F158 ^{3.51} Y + M324^{7.52}I + A329 ^{7.57} D	56
Y148 ^{3.41} W + F158 ^{3.51} Y + Q249^{5.67}A + A329 ^{7.57} D	57
Y148 ^{3.41} W + F158 ^{3.51} Y + T259^{6.31}R + A329 ^{7.57} D	53
Y148 ^{3.41} W + F158 ^{3.51} Y + G318^{7.46}S + A329 ^{7.57} D	59

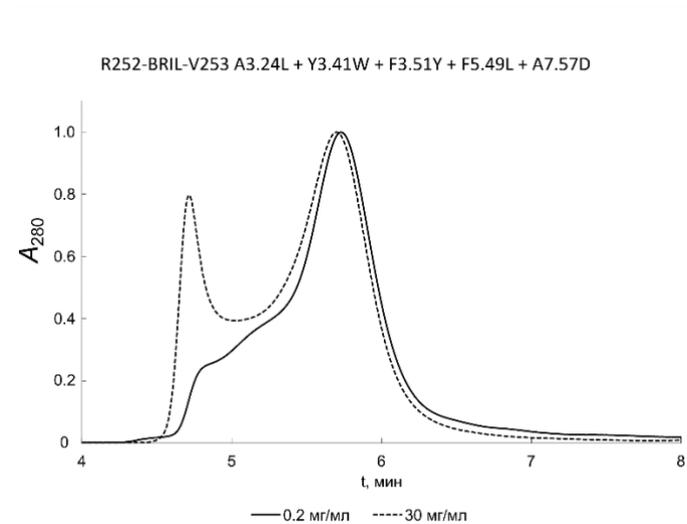
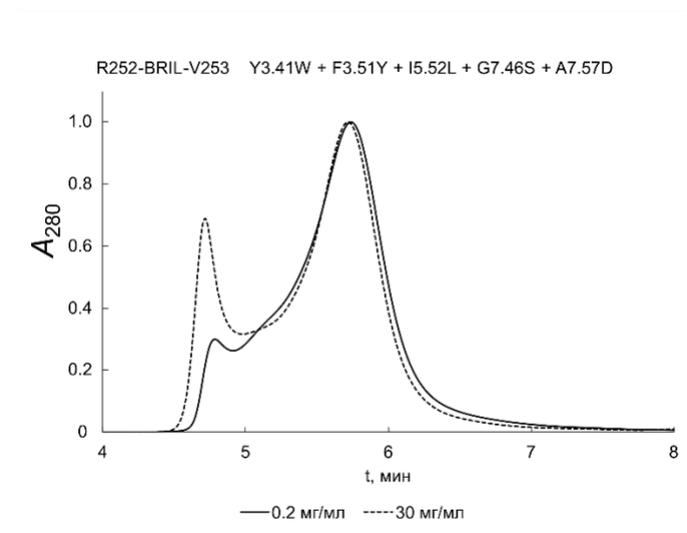
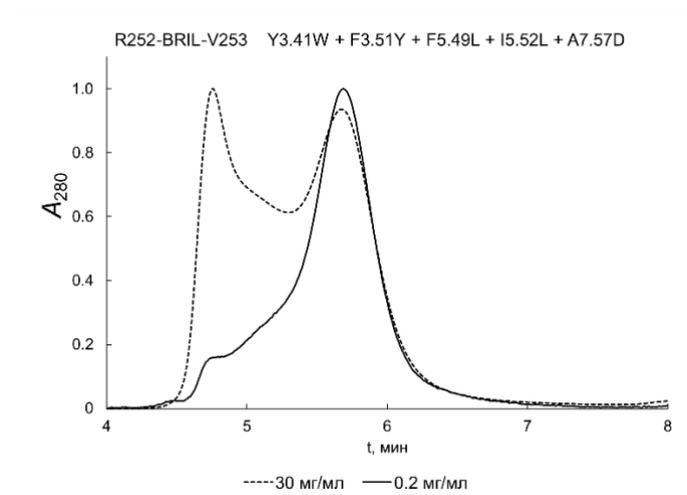
Примечание: жирным шрифтом выделены отличающиеся мутации для удобства сравнения.

Разброс температуры плавления в независимых экспериментах находился в пределах 2°C.

Приложение 5. Результаты электрофореза в ПААГ: 1 – не связавшиеся с металл-аффинной смолой белки; 2 и 3 – конструкция с двумя точечными мутациями R252-BRIL-V253 F158^{3.51}Y + A329^{7.57}D, 2 – образец после элюции, 3 – после обессоливания; 4 – маркер Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards (Bio-Rad, США); 5 – конструкция с шестью стабилизирующими 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 после элюции. Полосы, соответствующие рецептору GPR17, располагаются в областях 50 кДа (мономер) и 100 кДа (димер). Согласно литературным данным, функциональный GPR17 в клетках находится именно в состоянии димера [Yang J., Gong Z., Lu Y., Xu C., Wei T., Yang M., Zhan T., Yang Y., Lin L., Liu J., Tang C., Zhang W. // J. Mol. Biol. 2020. V. 432. P. 4596–4611. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2020.06.009>].



Приложение 6. Сравнение результатов гель-фильтрации при высоком давлении для нескольких конструкций GPR17. Сплошная линия соответствует концентрации 0.2 мг/мл, пунктирная – концентрации 30 мг/мл.



R252-BRIL-V253 Y3.41W + F3.51Y + F5.49L + G7.46S + A7.57D

