

ПОЛУЧЕНИЕ СЕЛЕКТИВНО-МЕЧЕНОГО ВОЛЬТ-СЕНСОРНОГО ДОМЕНА ПОТЕНЦИАЛОЗАВИСИМОГО ИОННОГО КАНАЛА K_vAP В БАКТЕРИАЛЬНОЙ БЕСКЛЕТОЧНОЙ СИСТЕМЕ

Копейна Г.С.¹, Люкманова Е.Н.², Шингарова Л.Н.², Парамонов А.С.², Шенкарев З.О.², Арсеньев А.С.², Долгих Д.А.^{1,2}, Кирпичников М.П.^{1,2}

1. Московский Государственный Университет

2. Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

e-mail: katya@nmr.ru

Мембранные белки составляют около 20% от общего количества белковых компонентов клетки. Данные белки участвуют во взаимодействии клетки с внешней средой, поддержании осмотического баланса, регулировании жизненных процессов, функционировании нервной и эндокринной систем. Особую роль играют потенциалозависимые ионные каналы, которые опосредуют передачу нервного импульса, дефекты в их аминокислотной последовательности и пространственной организации во многих случаях обуславливают возникновение и развитие ряда нервных заболеваний. Изучение структуры этих белков затруднено в связи с тем, что мембранные белки имеют гидрофобные трансмембранные участки, что значительно осложняет получение этих белков в растворимой форме. При рекомбинантной продукции в бактериальных или эукариотических клетках, эти белки зачастую выпадают в осадок и накапливаются в виде телец включения. Альтернативным подходом является использование бесклеточной системы продукции. Бесклеточные системы имеют несколько преимуществ перед системами, основанными на клеточной продукции: во-первых, в такой системе синтезируется преимущественно целевой продукт; во-вторых, эти системы открыты для внесения каких-либо веществ, взаимодействующих с белком, например, кофакторов, ингибиторов, лигандов, а также детергентов; в-третьих, можно проводить синтез изотопно-меченых по определенным аминокислотным остаткам белков для структурных исследований. Стоит особо отметить, что, например, бактериальная продукция селективно-меченых белков часто затруднена из-за перераспределения метки в процессе клеточного метаболизма. В бесклеточной системе синтез таких белков не осложняется подобными обстоятельствами.

Нашей задачей являлась разработка бесклеточной системы продукции селективно-меченого вольт-сенсорного домена K⁺-канала K_vAP из термофильной бактерии *Aeropyrum*

pernix (ВСД-КvАР) в растворимой форме в количествах, достаточных для структурных исследований. Для экспрессии гена ВСД-КvАР использовали коммерческий вектор *pET28a(+)*. Электрофоретический анализ показал, что в процессе синтеза практически весь белок агрегирует и детектируется в осадке. Был протестирован целый ряд различных вариантов ренатурации ВСД-КvАР из осадка. При подборе в качестве хаотропных агентов использовали мочевины в концентрации до 8 М и гуанидингидрохлорид (ГГХ) в концентрации до 6 М. Так как ВСД-КvАР имеет трансмембранную гидрофобную часть для растворения осадка необходимо было применять детергенты, в экспериментах были использованы следующие детергенты, – додецилсульфат натрия (ДСН), луарилсаркозил и додецилфосфатидилхолин (ДФХ). Процедуру ренатурации проводили во всех случаях по одной схеме: сначала осадок белка, полученного в результате бесклеточного синтеза, ресуспендировали в растворе детергента с добавлением/или без добавления хаотропного агента. Дальнейшую ренатурацию проводили на смоле Ni-Sepharose: белок в денатурированном состоянии связывали со смолой, далее для избавления от хаотропного агента колонку промывали раствором детергента, в котором изначально растворяли осадок. После этого, детергент заменяли на 1% ДФХ, и затем белок элюировали ступенчато: 100 мМ, 300 мМ и 500 мМ имидазола с добавлением 0.2 % ДФХ. Агрегатное состояние ВСД-КvАР оценивали с помощью электрофореза. Также для ренатурации ВСД-КvАР был применен недетергентный сульфобетайн 201 (НДСБ 201), часто используемый для повышения выхода ренатурации. Однако ни использование НДСБ201, ни замена мочевины на гуанидингидрохлорид, ни использование ДФХ в качестве детергента для исходного растворения осадка не привели к исчезновению агрегатов или увеличению выхода белка. В результате, в качестве оптимальных были признаны следующие условия ренатурации: растворение осадка белка в смеси 4 М мочевины и 2% додецилсульфата натрия и дальнейшая замена ДСН на 0.2% ДФХ с помощью металл-хелатной хроматографии. Отсутствие агрегатов и мономерная форма ВСД-КvАР в растворе 0.2% ДФХ была подтверждена данными гель-электрофореза. Выход конечного продукта при таком подходе составил ~ 0.7 мг/мл трансляционной смеси. Для того, чтобы оценить эффективность селективного мечения в бесклеточной системе, синтезировали [¹⁵N]-меченный по аланину ВСД-КvАР. Белок из осадка растворяли в трифторэтаноле и анализировали методом ЯМР. Анализ методами спектроскопии ЯМР показал, что все остатки аланина в белке являются [¹⁵N]-мечеными. Таким образом, была разработана эффективная система бесклеточной продукции селективно-меченого ВСД-КvАР, и были подобраны условия получения этого белка в мономерной форме.