

УДК 577.352.332:577.112.083

# Бактериальный синтез и очистка трансмембранного сегмента нормальной и мутантной рецепторной тирозинкиназы FGFR3 человека

С. А. Гончарук<sup>1,2\*</sup>, М. В. Гончарук<sup>1,2</sup>, М. Л. Майзель<sup>1</sup>, Д. М. Лесовой<sup>1</sup>, В. В. Чупин<sup>1</sup>,  
Э. В. Бочаров<sup>1</sup>, А. С. Арсеньев<sup>1</sup>, М. П. Кирпичников<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

<sup>2</sup>Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

\*E-mail: ms.goncharuk@gmail.com

Поступила в редакцию 17.05.2011 г.

**РЕФЕРАТ** Рецептор фактора роста фибробластов 3, FGFR3 – белок семейства рецепторных тирозинкиназ, играет важную роль в развитии скелета человека. Мутации в этом белке, в том числе замены Gly380Arg или Ala391Glu в его трансмембранной (ТМ) области, приводят к различным нарушениям развития костной системы. Определение пространственной структуры ТМ-домена нормального белка FGFR3 человека и варианта с мутациями Gly380Arg и Ala391Glu чрезвычайно важно для понимания механизмов, управляющих димеризацией и передачей сигнала рецепторными тирозинкиназами. Описаны эффективная система экспрессии эукариотических генов в бактериях и протокол очистки, позволяющие получать в миллиграммовых количествах ТМ-фрагменты FGFR3 как нормальные, так и с мутациями Gly380Arg и Ala391Glu, а также их <sup>15</sup>N- и [<sup>15</sup>N, <sup>13</sup>C]-меченные производные. Каждый пептид нарабатывается в клетках *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS в виде гибрида с тиоредоксином А. Протокол очистки включает металлохелатную аффинную, катионо- и анионообменную хроматографию, гидролиз гибридного белка легкой цепью энтерокиназы человека. Эффективность встраивания целевых пептидов в мицеллы ДФХ/ДСН и ДФХ/ДФГ подтверждена при помощи спектроскопии ЯМР. Разработанный метод получения нормальных и мутантных ТМ-фрагментов FGFR3 делает возможным проведение их структурных исследований методом гетероядерной спектроскопии ЯМР высокого разрешения.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** мембранный белок, FGFR, бактериальная экспрессия, очистка, солиubilизация, спектроскопия ЯМР.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** РТК – рецепторная тирозинкиназа; FGFR – рецептор фактора роста фибробластов; ТМ – трансмембранный (домен мембранного белка); ДФХ – додецилфосфохолин; ДФГ – додецилфосфоглицерин; ДСН – додецилсульфат натрия; ТФЭ – 2,2,2-трифторэтанол.

## ВВЕДЕНИЕ

Рецептор фактора роста фибробластов 3 (FGFR3) относится к семейству рецепторных тирозинкиназ (РТК). Этот белок состоит из внеклеточной части с тремя иммуноглобулинподобными доменами, гидрофобного трансмембранного (ТМ) домена и внутриклеточной части с двумя тирозинкиназными доменами. Специфические лиганды (факторы роста фибробластов) и гепарин связываются с иммуноглобулинподобным доменом FGFR3, стабилизируя димерный комплекс из двух молекул рецептора и обеспечивая передачу сигнала внутрь клетки [1, 2]. FGFR3

играет важную роль в процессах роста и развития человека – как эмбрионального и неонатального, так и во взрослом организме. Мутации в этом белке могут приводить к различным нарушениям развития соединительной ткани и скелета [3–5]. Известно также, что FGFR3 участвует в образовании опухолей [5, 6]. В частности, мутации Gly380Arg и Ala391Glu в трансмембранной (ТМ) области FGFR3 вызывают летальную дисплазию [7] и синдром Крузона с акантокератодермией [8] соответственно. При этом мутация Ala391Glu встречается как при нарушениях формирования скелета, так и при онкогенезе [6]. Счи-

тается, что мутации Gly380Arg и Ala391Glu стабилизируют димеризацию FGFR3 в клеточной мембране, приводя к нерегулируемой передаче сигнала и возникновению патологии [9, 10]. Однако детальный механизм функционирования FGFR3 изучен не до конца. В современной структурной биологии наиболее часто используется подход, предполагающий разбиение исследуемого мембранного белка на составляющие и изучение водорастворимых частей молекулы и ее ТМ-участков по отдельности [11–15]. Получение с высоким разрешением структуры нормального ТМ-домена FGFR3 человека и домена с мутациями Gly380Arg и Ala391Glu чрезвычайно важно для понимания механизмов, управляющих их димеризацией и функционированием, поскольку именно эти фрагменты служат связующим звеном между внеклеточным и внутриклеточным доменами РТК и непосредственно участвуют в передаче сигнала внутрь клетки.

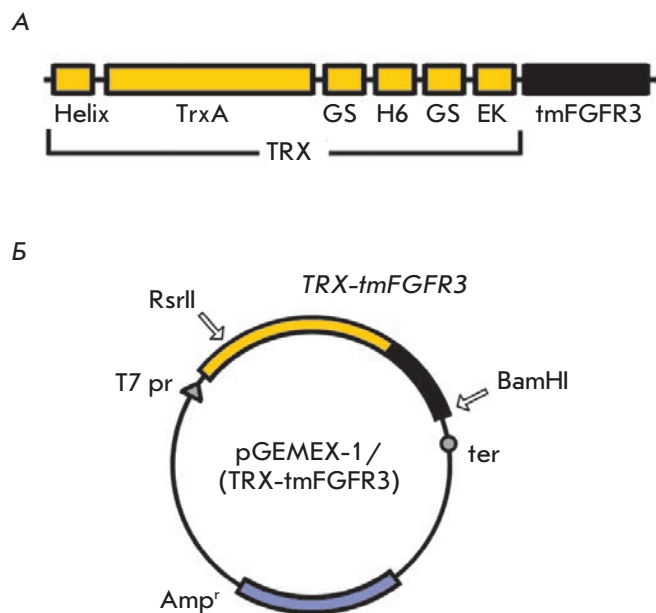
В представленной статье описаны эффективная система экспрессии генов и протокол очистки, позволяющие получить препаративные количества ТМ-фрагмента FGFR3 как нормального, так и с одиночными мутациями Gly380Arg и Ala391Glu, а также их  $^{15}\text{N}$ - и [ $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ ]-меченных производных. Разработанный подход получения ТМ-пептидов делает возможным проведение их структурных исследований методом гетероядерной спектроскопии ЯМР высокого разрешения.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**В работе использованы** штаммы *Escherichia coli* XL-10-Gold («Stratagene», США) и BL21(DE3)pLysS («Stratagene»), плазмиды pGEMEX-1 («Promega», США) и pGEMEX-1/TRX-TMS [16]. Олигонуклеотиды синтезированы фирмой «Evrogen» (Россия). ДНК секвенировали в Межинститутском центре коллективного пользования «ГЕНОМ» (Россия). Для введения изотопных меток  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$  использовали реагенты фирмы «CIL» (США). Полностью дейтерированный додецилфосфоглицерин (ДФГ) получен ферментативной реакцией трансфосфатидилирования из полностью дейтерированных додецилфосфохолина (ДФХ) и глицерина в присутствии фосфолипазы D [17].

### Клонирование генов

Плазмидные векторы для экспрессии генов пептидов в виде гибрида с тиоредоксином А конструировали согласно [12, 16–19]. Гены, кодирующие ТМ-фрагменты FGFR3 человека (*tmFGFR3*): аминокислотные остатки 357–399 нормального FGFR3 (*tmFGFR3-nat*) и 357–399 FGFR3 с точечными мутациями G380R (*tmFGFR3-R*) и A391E (*tmFGFR3-E*) собирали из ше-



**Рис. 1.** Схематическое изображение (А) гибридных белков TRX-tmFGFR3 и (Б) соответствующих экспрессионных векторов. Helix – N-концевая аминокислотная последовательность мембраноактивного белка из *Helicobacter pylori*; TrxA – тиоредоксин А *E. coli*; GS – последовательность Gly-Ser-Gly-Ser-Gly; H6 – последовательность из шести His; EK – сайт узнавания легкой цепи энтерокиназы человека; tmFGFR3 – нормальный трансмембранный пептид FGFR3 или пептид с мутациями Gly380Arg или Ala391Glu; Amp<sup>r</sup> – ген устойчивости к ампициллину.

сти химически синтезированных олигонуклеотидов с частично перекрывающейся нуклеотидной последовательностью. Используемые кодоны оптимизировали для экспрессии генов в клетках *E. coli*. В 3'-концевые праймеры вводили сайт рестрикции BamHI, в 5'-концевые праймеры – последовательность, кодирующую сайт узнавания энтерокиназы. Эту же последовательность добавляли и на 3'-конец гена белка-носителя (TRX), амплифицированного при помощи ПЦП с вектора pGEMEX-1/(TRX-TMS) [16]. Рекомбинацию генов TRX и *tmFGFR3* проводили при помощи ПЦП с образованием TRX-tmFGFR3. Экспрессионные плазмиды pGEMEX-1/(TRX-tmFGFR3) (рис. 1Б) получали в результате клонирования фрагментов TRX-tmFGFR3, обработанных эндонуклеазами рестрикции RsrII и BamHI, в линеаризованные теми же рестриктазами векторы pGEMEX-1/(TRX-TMS) [16]. Правильность нуклеотидной последовательности в пределах экспрессионных кассет подтверждали при помощи секвенирования ДНК по обеим цепям.

Таблица 1. Состав автоиндукционных сред

Среда	Studier*	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , мМ	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , мМ	Бактотриптон	Дрожжевой экстракт, %	Глицерин	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , MgSO <sub>4</sub> , NH <sub>4</sub> Cl, глюкоза, лактоза, металлы
ВУМ5052	ZYM-5052	+	+	2%	1	+	+
М5052	N-5052	25	25		0.0002	+	+
С750501'	С-750501	+	+		0.0002	+	+
М50501	С-750501	25	25		0.0002	0.5%	+

\*Названия автоиндукционных сред Studier [20], взятых за основу.

Примечание. Знаком «+» отмечены вещества, используемая концентрация которых совпадает с концентрацией в средах Studier [20].

### Подбор условий культивирования рекомбинантного штамма *E. coli*

Гены гибридных белков экспрессировали в клетках *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Клетки растили на богатых и бедных средах. При этом применяли как химическую индукцию синтеза белка (среды ТВ, М9), так и автоиндукцию [20] (среды ВУМ5052, М5052, С750501' или М50501, табл. 1). При подборе оптимальных условий синтеза белка к культуре клеток, росшей при 28°C и достигшей оптической плотности  $OD_{550} \sim 1.5$  о.е. (среда ТВ) или  $\sim 0.6$  о.е. (среда М9), добавляли индуктор, изопропил-β-D-тиогалактозид (ИПТГ), до конечной концентрации 1, 0.25, 0.05, 0.01, 0 мМ и продолжали культивировать в течение 15 ч при 250 об/мин и температуре 37°C; в течение 40 ч (ТВ) или 60 ч (М9) при 25°C; 60 ч (ТВ) или 72 ч (М9) при температуре 13°C. В случае автоиндукционных сред клетки культивировали при 300 об/мин и температуре 18°C в течение 4 дней (ВУМ5052) или 7 дней (М5052, С750501' или М50501). Оптимальную температуру, концентрацию ИПТГ и продолжительность культивирования определяли при помощи Трис-глицинового ДСН-ПААГ-электрофореза.

### Экспрессия генов

Для препаративного получения меченых белков использовали среду М9, содержащую 0.0002% дрожжевого экстракта, <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl и [U-<sup>13</sup>C]-глюкозу (<sup>15</sup>N, <sup>13</sup>C-мечение) или <sup>15</sup>NH<sub>4</sub>Cl и небогатенную глюкозу (<sup>15</sup>N-мечение). Для продукции целевых гибридных белков в культуру клеток с  $OD_{600}$ , равной примерно 0.6 о.е. (среда М9, изотопное мечение) или 1.5 о.е. (среда ТВ, без меток), добавляли ИПТГ до конечной концентрации 0.05 мМ и понижали температуру с 28 до 13°C. Клетки растили при 250 об/мин в течение 72 ч, после чего собирали центрифугированием и хранили при -20°C.

### Очистка целевых белков

Биомассу, полученную с 1 л культуры, суспендировали в 50 мл лизирующего буфера (50 мМ Трис, pH 8.0, 150 мМ NaCl, 10 мМ имидазол, 1% Тритон X-100, 0.2 мМ фенилметилсульфонилфторид), разрушали при помощи ультразвука, центрифугировали и фильтровали через мембрану с размером пор 0.22 мкм. Осветленный лизат наносили на колонку с Chelating Sepharose FF («Amersham Bioscience», США), предварительно заряженную Ni<sup>2+</sup> и уравновешенную буфером А (50 мМ Трис, pH 8.0, 250 мМ NaCl, 1% Тритон X-100), содержащим 10 мМ имидазол. Смолу последовательно промывали буфером А, содержащим 10 мМ имидазол, и этим же буфером, содержащим 40 мМ имидазол. Белок элюировали буфером А, содержащим 175 мМ имидазол. Элюат разбавляли в 11 раз буфером, содержащим 17 мМ Трис, pH 8.0, 20 мМ NaCl и 1% Тритон X-100, и добавляли легкую цепь рекомбинантной энтерокиназы человека [21] в соотношении 25 ед. акт. фермента на 1 мг TRX-tmFGFR3. Смесь инкубировали в течение ночи при комнатной температуре и наносили на колонку с Chelating Sepharose FF, уравновешенную буфером В, pH 8.0 (20 мМ Трис, 40 мМ NaCl, 1% Тритон X-100, 16 мМ имидазол). Фракцию, не связавшуюся со смолой, собирали, pH довели до 4.55 концентрированной уксусной кислотой, фильтровали через мембрану (размер пор 0.22 мкм) и наносили на колонку с SP Sepharose FF («Amersham Bioscience», США), уравновешенную буфером В, pH 4.55. После нанесения смолу промывали этим же буфером. Фракцию, не связавшуюся со смолой, собирали, pH довели до 9.0 при помощи NaOH, фильтровали через мембрану с размером пор 0.22 мкм и наносили на колонку с Q Sepharose FF («Amersham Bioscience», США), уравновешенную буфером С (20 мМ Трис, pH 8.8, 1% Тритон X-100). Пептиды элюировали линейным градиентом NaCl

(0–1 М). После осаждения 10% раствором трихлоруксусной кислоты (ТХУ) очищенные пептиды трижды промывали ацетоном и высушивали под вакуумом. Чистоту и соответствие очищенных пептидов целевым подтверждали методами гель-электрофореза, масс-спектрологии MALDI (оборудование Daltonics Ultraflex II TOF/TOF, «Bruker Daltonik», Германия) и спектрологии ЯМР.

### Солубилизация tmFGFR3 в мембраноподобном окружении

Образцы изотопно-меченных tmFGFR3 для предварительного сворачивания в спиральную конформацию растворяли в смеси ТФЭ/Н<sub>2</sub>О (60/40) с добавлением 2 мМ трис(2-карбоксииэтил)фосфина (ТСЕР) для предотвращения образования неспецифической межмолекулярной дисульфидной связи. Полного растворения добивались с использованием 10 циклов замораживания (в жидком азоте)/оттаивания. Гомогенизированные образцы получали с помощью ультразвукового воздействия (ультразвуковая ванна D-78224 Singen/Htw («Elma», Германия)) на этапе оттаивания в каждом из 10 циклов. Растворимость и формирование вторичной структуры tmFGFR3 в смеси ТФЭ/Н<sub>2</sub>О контролировали с помощью <sup>1</sup>H/<sup>15</sup>N-bestHSQC ЯМР-спектров [22–24], анализируя ширину сигналов и их дисперсию. Раствор tmFGFR3 в ТФЭ/Н<sub>2</sub>О смешивали с необходимым количеством растворенных в ТФЭ/Н<sub>2</sub>О детергентов и/или липидов до соотношения детергент (липид)/пептид от 120 до 40. Полученную смесь лиофилизовали (ModulyoD-230 Freeze Dryer, «Thermo», Канада), затем растворяли в Н<sub>2</sub>О/D<sub>2</sub>О (10/1) с проведением 10 циклов замораживания/оттаивания (под воздействием ультразвука) для гомогенизации белка и его полного встраивания в детергентные ми-

целлы или липидные бицеллы. Гетероядерные ЯМР-спектры пептидов tmFGFR3, встроенных в супрамолекулярные комплексы, получали при температуре 40°С и варьировании рН от 3.5 до 6.5 на спектрометре AVANCE («Bruker», Германия), оборудованном криогенно охлаждаемым датчиком повышенной чувствительности, с рабочей частотой на протонах 700 МГц.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

#### Система экспрессии генов tmFGFR3

В работе исследовали пептиды, первичная структура которых соответствовала полноразмерному ТМ-фрагменту FGFR3 (tmFGFR3) с прилегающими к гидрофобной области участками: нормальному (tmFGFR3-nat) и с патогенными точечными мутациями G380R (tmFGFR3-R) или A391E (tmFGFR3-E) (табл. 2).

Из-за быстрой протеолитической дегградации небольших пептидов в процессе их экспрессии в клетках бактерий tmFGFR3 получали в виде гибрида с тиоредоксином *A. E. coli* (TrxA) как описано ранее [12] (рис. 1А). Между фрагментами TrxA и tmFGFR3 гибридного белка встраивали шесть остатков гистидина (H6), сайт узнавания легкой цепи энтерокиназы человека (ЕК), а также подвижные глицин-богатые участки, Gly-Ser-Gly-Ser-Gly (GS) с обеих сторон H6. Высокоспецифичный фермент ЕК селективно гидролизует пептидную связь, находящуюся сразу после сайта узнавания (за исключением связи Lys-Pro). На N-конце гибридного белка располагалась аминокислотная последовательность Helix [12], способствующая устранению токсичности некоторых ТМ-пептидов по отношению к клетке-хозяину (данные не приведены). Гены, кодирующие гибридные белки Helix-TrxA-GS-H6-GS-EK-tmFGFR3 (далее

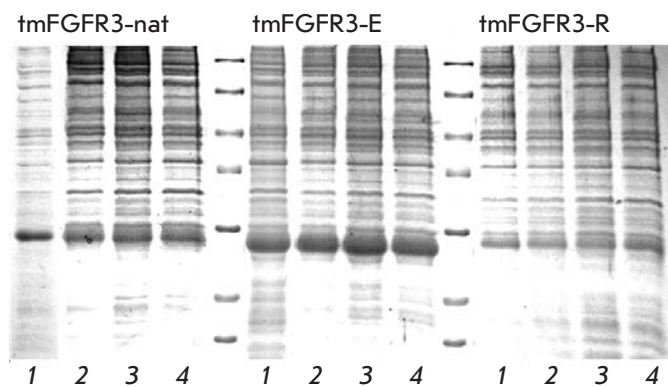
Таблица 2. Эффективность протокола получения гибридных белков (TRX-tmFGFR3) и целевых пептидов (tmFGFR3)

ТМ-пептид	Мол. масса, кДа	Аминокислотная последовательность ТМ-фрагмента	ЕК*, ед./мг	Выход**, мг/л	
				TRX-tmFGFR3	tmFGFR3
tmFGFR3-nat	4.6	L <sup>357</sup> PAEEELVEADEAGSVYAGILSYGVGFFLFILVVAAVTLCLRLR <sup>399</sup>	25	40	6
tmFGFR3-R	4.7	L <sup>357</sup> PAEEELVEADEAGSVYAGILSYR <sup>380</sup> VGFFLFILVVAAVTLCLRLR <sup>399</sup>	30	20	4
tmFGFR3-E	4.7	L <sup>357</sup> PAEEELVEADEAGSVYAGILSYGVGFFLFILVVE <sup>391</sup> AVTLCLRLR <sup>399</sup>	30	50	7

\*Активность легкой цепи энтерокиназы, требуемая для расщепления 1 мг гибридных белков TRX-tmFGFR3.

\*\*Усредненный выход гибридных белков (TRX-tmFGFR3) и очищенных пептидов (tmFGFR3), включая их <sup>15</sup>N- и [<sup>15</sup>N, <sup>13</sup>C]-меченные производные, из 1 л культуральной среды (M9). Выход оценивали по интенсивности окрашивания (Кумасси голубой) полос после ПААГ-электрофореза, а также по весу высушенных очищенных пептидов tmFGFR3.

Примечание. Выделены аминокислотные участки, предположительно соответствующие ТМ-доменам. Мутации Gly380Arg (tmFGFR3-R) и Ala391Glu (tmFGFR3-E) отмечены жирным шрифтом.



**Рис. 2.** Накопление целевых гибридных белков TRX-tmFGFR3 в клетках рекомбинантных штаммов, выращенных на минимальной солевой среде М9 и на автоиндукционных средах М5052, С750501' и М50501. Анализ в 14% Трис-глициновом ДСН-ПААГ клеточного лизата TRX-tmFGFR3-nat, TRX-tmFGFR3-E и TRX-tmFGFR3-R. Рекомбинантные штаммы выращены на среде М9, при 13°C после индукции 0.05 мМ ИПТГ (1); на автоиндукционной среде М5052 при 18°C (2); на автоиндукционной среде М50501 при 18°C (3); на автоиндукционной среде С750501' при 18°C (4). В каждую ячейку внесен эквивалент 20 мкл культуры клеток. Маркеры молекулярных масс белков: 116.0, 66.2, 45.0, 35.0, 25.0, 18.4, 14.4 кДа (сверху вниз).

TRX-tmFGFR3), встраивали в плазмидные векторы рGEMEX-1 под транскрипционный контроль T7-промотора с образованием экспрессионных векторов рGEMEX-1/(TRX-tmFGFR3) (рис. 1Б).

Для наработки белков плазмиды переносили в клетки *E. coli* BL21(DE3)рLysS, поскольку в них удается обеспечить приемлемый уровень экспрессии целевых генов. При выборе между автоиндукцией [20] и химической индукцией в пользу первой говорит отсутствие в необходимости добавлять индуктор при достижении культурой клеток определенной оптической плотности. При сравнимых выходах целевых белков индукция при помощи ИПТГ экономически более выгодна, поскольку для меченя изотопом  $^{13}\text{C}$  в качестве единственного источника углерода можно использовать  $[\text{U}-^{13}\text{C}]$ -глюкозу вместо существенно более дорогого  $[\text{U}-^{13}\text{C}]$ -глицерина.

Условия культивирования, при которых наблюдается максимальное накопление целевых белков, определяли, тестируя среды, используемые для индукции синтеза белка при помощи ИПТГ (ТВ и М9), а также автоиндукционные среды, предложенные FW Studier [20], взятые с небольшими модификациями (табл. 1). В среды, предназначенные для получения изотопно-меченных производных пептидов (М5052 – для введения  $^{15}\text{N}$ , а М9, С750501' и М50501 – для введения

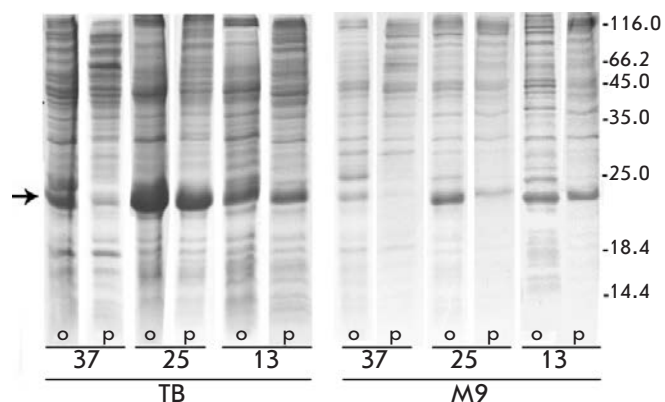
$[\text{U}-^{13}\text{C}]$ ), добавляли дрожжевой экстракт до концентрации 0.0002%. Опытным путем показано, что такая концентрация дрожжевого экстракта способствует максимальному увеличению выхода целевого белка, не влияя на содержание  $^{15}\text{N}$  и  $^{13}\text{C}$  в целевом белке. Ввиду высокой стоимости  $[\text{U}-^{13}\text{C}]$ -глицерина мы провели ряд экспериментов, направленных на определение оптимальной концентрации глицерина в автоиндукционной среде, при которой наблюдается максимальное накопление целевого продукта. Оказалось, что снижение концентрации глицерина в полтора раза вместе с двукратным понижением концентрации фосфатов в культуральной среде (среда М50501) или не влияет на выход целевого продукта (tmFGFR3-nat и tmFGFR3-R), или увеличивает его накопление (tmFGFR3-E) (рис. 2). Это позволяет существенно снизить затраты на получение  $[\text{U}-^{13}\text{C}]$ -меченных препаратов при использовании принципа автоиндукции.

Бактериальные клетки, трансформированные соответствующим вектором, выращивали при 18°C в случае автоиндукции; при 37, 25 и 13°C (после добавления ИПТГ) при использовании химической индукции. Понижение температуры культивирования способствует поддержанию белка в растворимой форме [12]. Так, в случае химической индукции при выращивании клеток как на богатой (ТВ), так и на бедной (М9) средах при высокой температуре (37°C), после добавления ИПТГ гибридные белки TRX-tmFGFR3 накапливались преимущественно в составе телец включения. При понижении температуры до 25°C растворимость белка повышалась – около половины его находилось в составе телец включения. При 13°C все гибридные белки обнаруживались преимущественно в растворимой форме (рис 2, 3).

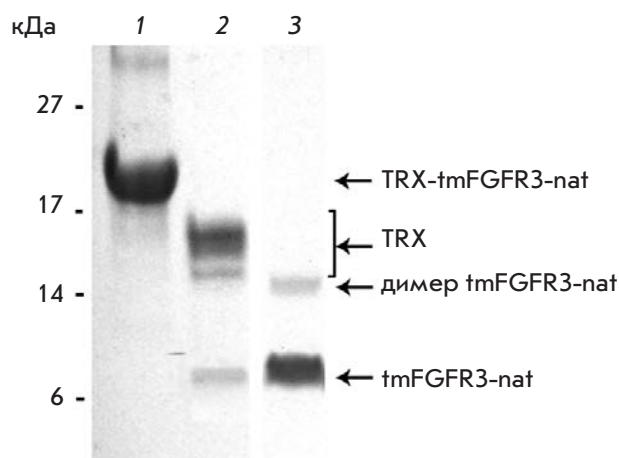
Зависимость уровня экспрессии генов от температуры культивирования, а при химической индукции от концентрации индуктора (1.0, 0.25, 0.05 и 0.01 мМ ИПТГ) оценивали при помощи ДСН-ПААГ-электрофореза. По результатам анализа для наработки немеченных целевых белков использовали богатую среду ТВ (13°C после индукции). Выход гибридных белков при использовании сред М9 и М50501 оказался сравнимым (рис. 2), поэтому для получения изотопно-меченных целевых пептидов в препаративных количествах мы выбрали среду М9 (13°C после индукции). Максимальный выход всех TRX-tmFGFR3 и их  $^{15}\text{N}$ - или  $[\text{U}-^{13}\text{C}]$ -меченных производных достигнут при 0.05 мМ ИПТГ.

#### Очистка гибридных белков

После лизиса клеток гибридные белки очищали при помощи металлохелатной аффинной хроматографии (МХАХ). Во избежание выпадения целевых



**Рис. 3.** Накопление гибридного белка TRX-tmFGFR3-E при культивировании клеток на богатой (ТВ) и бедной (М9) средах в зависимости от температуры (37, 25, 13°C) после индукции ИПТГ. Анализ в 14% Трис-глициновом ДСН-ПААГ клеточного лизата TRX-tmFGFR3-E (0.05 мМ ИПТГ). Справа приведены маркеры молекулярных масс белков, кДа. Стрелка указывает на полосы, соответствующие гибриднему белку TRX-tmFGFR3-E. В ячейки вносили по 5 мкл (ТВ) или 10 мкл (М9) культуры клеток. о – суммарный, р – растворимый белок.



**Рис. 4.** Эффективности очистки tmFGFR3-nat. 1 – Очищенный гибридный белок, 2 – продукты гидролиза энтерокиназой, 3 – очищенный tmFGFR3-nat. Стрелками отмечены: гибридный белок TRX-tmFGFR3-nat, белок-носитель TRX, димерная и мономерная формы tmFGFR3-nat. Электрофорез в 14% трициновом ДСН-ПААГ. Расчетная молекулярная масса TRX-tmFGFR3-nat – 19.6 кДа, tmFGFR3-nat – 4.6 кДа.

белков в осадок на этой и последующих стадиях очистки использовали неионный детергент Тритон X-100. Чистота белковых препаратов, полученных методом МХАХ, составила не менее 80%. Молекулярные массы гибридных белков, определенные по их электрофоретической подвижности (ДСН-ПААГ, трициновый буфер) (рис. 4), сходны с расчетными значениями.

Гибридные белки TRX-tmFGFR3, очищенные при помощи МХАХ, расщепляли с использованием легкой цепи энтерокиназы человека (ЕК) [21] (рис. 1А). При оптимизации условий реакции для каждого пептида учитывали эффективность последующих стадий очистки. Оптимальный состав реакционной смеси получали, разбавляя фракции, содержащие гибридный белок в 11 раз (см. раздел “Экспериментальная часть”). Для полного отделения пептидов tmFGFR3 от белка-партнера использовали ЕК (30 ед. акт. на 1 мг гибридного белка TRX-tmFGFR3) (рис. 4).

После расщепления гибридного белка в течение ночи для исключения из реакционной смеси фрагментов TRX, а также остаточных количеств гибридных белков, проводили МХАХ. Концентрирование и дополнительная очистка целевых пептидов tmFGFR3 при помощи двух последовательных стадий катионообменной и анионообменной хроматографии при значениях pH, обеспечивающих максимальный заряд и сродство целевых полипептидов к ионообменным

смолам, позволили получить белковые препараты чистотой не менее 97%. Результаты ДСН-ПААГ-электрофореза подтверждают эффективность гидролиза TRX-tmFGFR3-E и очистки tmFGFR3-E (рис. 4). Результаты очистки и эффективность предложенного протокола аналогичны для tmFGFR3-nat и tmFGFR3-R. Электрофоретическая подвижность tmFGFR3 соответствует подвижности пептидов преимущественно в мономерных конформациях. Чистота и соответствие очищенных пептидов целевым tmFGFR3 подтверждены при помощи масс-спектроскопического анализа (рис. 5) и спектроскопии ЯМР.

Как уже отмечалось выше, пептиды tmFGFR3 получали в присутствии Тритона X-100. Высокое оптическое поглощение водного раствора Тритона X-100 препятствует использованию оптических методов анализа и определению посредством спектроскопии КД вторичной структуры пептидов в этом детергенте. В случае спектроскопии ЯМР (см. ниже) даже примесные концентрации Тритона X-100 в образце негативно влияют на свойства мембраноподобного окружения, используемого для структурных исследований, а также на пространственную структуру пептида. Для эффективного удаления детергента из раствора пептиды с Тритоном X-100 осаждали ТХУ с последующим промыванием осадка охлажденным ацетоном [12]. Высокую эффективность удаления Тритона X-100 из белковых образцов под-

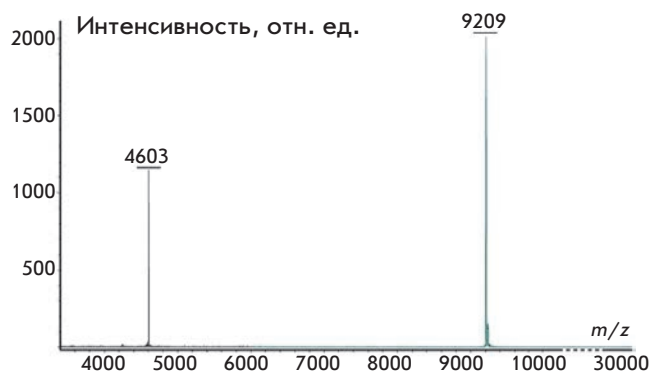


Рис. 5. Масс-спектрометрический анализ очищенного tmFGFR3-nat. Пики на спектре соответствуют мономеру ( $m/z$  4603) и димеру ( $m/z$  9209) tmFGFR3-nat.

тверждали методом спектроскопии ЯМР. С помощью описанной процедуры удалось довести выход целевых белков до 4–8 мг/л культуры. Чистота рекомбинантных белков и степень введения [ $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ ]-меток были не менее 97%.

#### Солюбилизация tmFGFR3 в мембраноподобном окружении

Выбор среды, имитирующей окружение объекта в клеточной мембране, исключительно важен для успешного проведения его структурно-функциональных исследований [23]. При этом состав мембраноподобного окружения, оптимальный для ЯМР-исследований, определяется следующими основными параметрами: размером супрамолекулярных частиц со встроенными в них tmFGFR3; монодисперсностью образца; отсутствием агрегации и стабильностью образца; реализацией нативной спиральной конформации и димеризацией tmFGFR3. Соответствие супрамолекулярных комплексов tmFGFR3 в выбранном мембраноподобном окружении этим критериям оценивали при помощи спектроскопии ЯМР. В качестве мембраноподобной среды были испробованы как детергентные мицеллы, так и липидные бицеллы различного состава. Итоговое качество образцов с точки зрения возможности проведения дальнейших структурных исследований методом спектроскопии ЯМР оценивали с использованием двумерных спектров  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -bestHSQC и  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -TROSY. Анализировали общее количество разрешенных кросс-пиков, количество кросс-пиков в области NH-сигналов остатков глицина, дисперсию, уширение и дублирование сигналов.

Стоит отметить, что для структурных исследований мембранных белков и пептидов методами ЯМР в растворе зачастую требуются как цвиттер-ионные,

так и заряженные дейтерированные детергенты, которые дают возможность имитировать частично заряженные клеточные мембраны. К настоящему времени единственным коммерчески доступным полностью дейтерированным отрицательно заряженным детергентом является ДСН. Этот детергент не имеет структурных аналогов среди фосфолипидов, входящих в состав биологических мембран, поэтому использование ДСН для моделирования свойств мембран не всегда корректно. В представленной работе мы попробовали использовать полностью дейтерированный ДФГ, синтезированный нами, для создания частичного отрицательного заряда на поверхности мицелл. Структура полярной «головы» ДФГ такая же, как и у фосфатидилглицерина, основного отрицательно заряженного фосфолипида в составе бактериальных мембран. Использование ДФГ позволяет лучше моделировать свойства биологических мембран по сравнению с ДСН.

Нами подобраны условия солюбилизации tmFGFR3-nat, позволяющие изучать его пространственную структуру и димеризацию. Наилучшие результаты при солюбилизации пептида tmFGFR3-nat получены при использовании смешанных мицелл полностью дейтерированных ДФХ/ДФГ (9/1 моль/моль) и ДФХ/ДСН (9/1 моль/моль). Общее количество пиков, хорошая дисперсия сигналов (существенно превышающая соответствующие значения для пептида в конформации «клубок», что говорит о формировании вторичной структуры) и небольшая ширина линий в спектре  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -bestHSQC полностью соответствуют ожидаемым на основании аминокислотной последовательности пептида, его вторичной структуры и гидродинамического размера (рис. 6). Наличие дублирования кросс-пиков в  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -bestHSQC-спектрах, а также зависимость относительных интенсивностей в этих дублетах от количества молекул tmFGFR3-nat, встроенных в одну мицеллу (рис. 6),

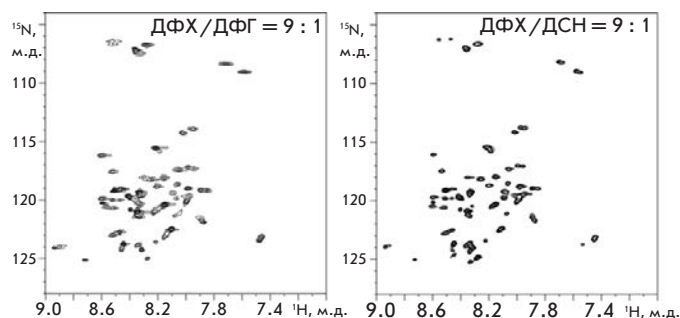


Рис. 6.  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$ -bestHSQC ЯМР-спектры tmFGFR3-nat в мицеллах ДФХ/ДФГ (слева) и ДФХ/ДСН (справа). Температура 40°C, pH 5.7, соотношение детергент/пептид – 40.

указывают на успешное определение условий димеризации tmFGFR3-nat, подходящих для структурных исследований методом гетероядерной ЯМР-спектроскопии.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанная система экспрессии генов и протокол очистки позволяют получать рекомбинантные трансмембранные пептиды tmFGFR3, в том числе изотопно-меченные производные в миллиграммовых количествах, необходимых для проведения структурно-функциональных исследований. Относительно небольшой размер комплексов пептидов в мембраноподобном окружении свидетельствует о возможности получения пространственной структуры tmFGFR3-nat в димерном состоянии при помощи гетероядерной спектроскопии ЯМР высокого разрешения [12, 24]. В настоящее время уже определяется конформация димера tmFGFR3-nat и начато изучение процессов специфической ассоциации tmFGFR3-E и tmFGFR3-R, получение которых опи-

сано в нашей работе. Предложенная технология получения рекомбинантных пептидов позволит лучше понять механизм функционирования и передачи сигнала с участием рецептора FGFR3, а также пролить свет на молекулярные механизмы возникновения различных нарушений развития скелета человека, возникновение которых непосредственно связано с мутациями в ТМ-домене FGFR3. ●

*Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, Программы Российской академии наук «Молекулярная и клеточная биология» и Федеральных целевых программ «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 годы» (П1276 и 16.740.11.0195), а также Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы» (16.512.11.2172).*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Pantoliano M.W., Horlick R.A., Springer B.A., van Dyk D.E., Tobery T., Wetmore D.R., Lear J.D., Nahapetian A.T., Bradley J.D., Sisk W.P. // *Biochemistry*. 1994. V. 33. P. 10229–10248.
- Shi E., Kan M., Xu J., Wang F., Hou J., McKeehan W.L. // *Mol. Cell Biol.* 1993. V. 13. P. 3907–3918.
- Vajo Z., Francomano C.A., Wilkin D.J. // *Endocr. Rev.* 2000. V. 21. P. 23–39.
- Passos-Bueno M.R., Wilcox W.R., Jabs E.W., Sertie A.L., Alonso L.G., Kitoh H. // *Human Mutat.* 1999. V. 14. P. 115–125.
- Cappellen D., de Oliveira C., Ricol D., Diez de Medina S.G., Bourdin J., Sastre-Garau X., Chopin D., Thiery J.P., Radvanyi F. // *Nat. Genet.* 1999. V. 23. P. 18–20.
- van Rhijin B., van Tilborg A., Lurkin I., Bonaventure J., de Vries A., Thiery J.P., van der Kwast T.H., Zwarthoff E.C., Radvanyi F. // *Eur. J. Hum. Genet.* 2002. V. 10. P. 819–824.
- Webster M.K., Donoghue D.J. // *EMBO J.* 1996. V. 15. P. 520–527.
- Meyers G.A., Orlow S.J., Munro I.R., Przylepa K.A., Jabs E.W. // *Nat. Genet.* 1995. V. 11. P. 462–464.
- Merzlyakov M., Chen L., Hristova K. // *J. Membr. Biol.* 2007. V. 215. P. 93–103.
- Li E., You M., Hristova K. // *J. Mol. Biol.* 2006. V. 356. P. 600–612.
- MacKenzie K.R., Prestegard J.H., Engelman D.M. // *Science*. 1997. V. 276. P. 131–133.
- Goncharuk M.V., Schulga A.A., Ermolyuk Ya.S., Tkach E.N., Goncharuk S.A., Pustovalova Yu.E., Mineev K.S., Bocharov E.V., Maslennikov I.V., Arseniev A.S., et al. // *Mol. Biology (Moscow)*. 2011. V. 45. in press.
- Bocharov E.V., Mineev K.S., Volynsky P.E., Ermolyuk Y.S., Tkach E.N., Sobol A.G., Chupin V.V., Kirpichnikov M.P., Efremov R.G., Arseniev A.S. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. P. 6950–6956.
- Mineev K.S., Bocharov E.V., Pustovalova Y.E., Bocharova O.V., Chupin V.V., Arseniev A.S. // *J. Mol. Biol.* 2010. V. 400. P. 231–243.
- Bocharov E.V., Mayzel M.L., Volynsky P.E., Mineev K.S., Tkach E.N., Ermolyuk Y.S., Schulga A.A., Efremov R.G., Arseniev A.S. // *Biophys. J.* 2010. V. 98. P. 881–889.
- Кирпичников М.П., Гончарук М.В., Ермолюк Я.С., Гончарук С.А., Шульга А.А. Маслеников И.В., Арсеньев А.С. // *Технологии живых систем*. 2005. V. 2. P. 20–27.
- Schmitt J.D., Amidon B., Wykle R.L., Waite M. // *Chem. Phys. Lipids*. 1995. V. 77. P. 131–137.
- Bocharov E.V., Mayzel M.L., Volynsky P.E., Goncharuk M.V., Ermolyuk Y.S., Schulga A.A., Artemenko E.O., Efremov R.G., Arseniev A.S. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. P. 29385–29395.
- Bocharov E.V., Pustovalova Y.E., Pavlov K.V., Volynsky P.E., Goncharuk M.V., Ermolyuk Y.S., Karpunin D.V., Schulga A.A., Kirpichnikov M.P., Efremov R.G., et al. // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. P. 16256–16266.
- Studier F.W. // *Protein Expr. Purif.* 2005. V. 41. P. 207–234.
- Gasparian M.E., Ostapchenko V.G., Schulga A.A., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P. // *Protein Expr. Purif.* 2003. V. 31. P. 133–139.
- Schanda P., Lescop E., Falge M., Sounier R., Boisbouvier J., Brutscher B. // *J. Biomol. NMR*. 2007. V. 38. P. 47–55.
- Kim H.J., Howell S.C., van Horn W.D., Jeon Y.H., Sanders C.R. // *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 2009. V. 55. P. 335–360.
- Jura N., Endres N.F., Engel K., Deindl S., Das R., Lamers M.H., Wemmer D.E., Zhang X., Kuriyan J. // *Cell*. 2009. V. 137. P. 1293–1307.