

УДК 577.29

# N-Концевые партнеры для эффективной продукции рецепторов, сопряженных с G-белками, в бактериальных бесклеточных системах

Е. Н. Люкманова<sup>1</sup>, З. О. Шенкарев<sup>1</sup>, Н. Ф. Хабибуллина<sup>1,2</sup>, Д. С. Кульбацкий<sup>1</sup>,  
М. А. Шулепко<sup>1,2</sup>, Л. Е. Петровская<sup>1</sup>, А. С. Арсеньев<sup>1</sup>, Д. А. Долгих<sup>1,2</sup>, М. П. Кирпичников<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт биоорганической химии им. акад. 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: ekaterina-lyukmanova@yandex.ru

Поступила в редакцию 31.08.2012

**РЕФЕРАТ** Семейство рецепторов, сопряженных с G-белками (GPCR), – одно из наиболее многочисленных семейств мембранных белков человека. Эти рецепторы, несмотря на их огромную важность для новых разработок в области фармакологии и медицины, остаются малоизученными. Основным фактором, сдерживающим структурно-функциональные исследования GPCR, – отсутствие высокоэффективных систем гетерологической продукции. Бесклеточные белоксинтезирующие системы, основанные на экстрактах из клеток *Escherichia coli*, в последнее время привлекают большое внимание в качестве эффективной альтернативы клеточным системам продукции рекомбинантных мембранных белков. Продукция GPCR в бактериальных бесклеточных системах затруднена из-за проблем, связанных с низкой эффективностью процесса инициации трансляции. Выход рецепторов может быть увеличен путем экспрессии слитых конструкций, содержащих дополнительные N-концевые аминокислотные последовательности-партнеры. В представленной работе для увеличения эффективности бесклеточного синтеза  $\beta$ 2-адренорецептора, мускаринового M1 холинорецептора и соматостатинового рецептора типа 5 человека предложены три новые N-концевые последовательности. Показано, что использование N-концевого фрагмента (6 а.о.) бактериородопсина грамположительной бактерии *Exiguobacterium sibiricum* (ESR-tag), N-концевого фрагмента (16 а.о.) рибонуклеазы A (S-tag) и белка Mistic из *Bacillus subtilis* позволяет увеличить выход GPCR в 5–38 раз и получить 0.6–3.8 мг целевого белка из 1 мл реакционной смеси, что достаточно для структурно-функциональных исследований.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** бесклеточные системы синтеза, рецепторы, сопряженные с G-белками, инициация трансляции.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** а.о. – аминокислотный остаток; ББС – бесклеточная белоксинтезирующая система; МБ – мембранный белок; РС – реакционная смесь; ПС – питающая смесь; ТМ – трансмембранный;  $\beta$ 2AR –  $\beta$ 2-адренергический рецептор человека; ESR – бактериородопсин из *Exiguobacterium sibiricum*; ESR-tag – N-концевой фрагмент (6 а.о.) ESR; GPCR – рецепторы, сопряженные с G-белками; M1-mAChR – мускариновый ацетилхолиновый рецептор человека типа M1; SSTR5 – соматостатиновый рецептор человека типа 5; S-tag – N-концевой фрагмент (16 а.о.) рибонуклеазы A; T7-tag – N-концевой фрагмент (11 а.о.) лидерной последовательности белка 10 бактериофага T7; TRX – тиоредоксин из *Escherichia coli*.

## ВВЕДЕНИЕ

Интегральные мембранные белки (МБ) участвуют во многих процессах, необходимых для жизни отдельных клеток и многоклеточных организмов. Эти белки ответственны за клеточную энергетику, межклеточное узнавание, а также за процессы проведения сигналов и транспорта различных веществ через

клеточную мембрану [1]. Согласно современным данным, МБ составляют более 25% всех аминокислотных последовательностей, закодированных в геноме высших организмов, включая человека [2]. Один из фармакологически наиболее важных классов МБ – рецепторы, сопряженные с G-белками (GPCR). В геноме человека идентифицировано более 800 генов, коди-

рующих рецепторы этого семейства [3]. Именно мембранные рецепторы этого класса служат мишенями для ~30% современных лекарственных средств [4]. Рецепторы семейства GPCR имеют гомологичную пространственную организацию, они содержат семь трансмембранных (ТМ) спиралей, а также внеклеточный N-концевой и внутриклеточный C-концевой участки [5]. Сайты связывания низкомолекулярных соединений (лигандов) во многих случаях локализованы в ТМ-домене рецептора, в то время как пептидные гормоны и регуляторы белковой природы взаимодействуют с N-концевым участком и внеклеточными петлями [5].

GPCR представляют исключительный интерес для новых разработок в области фармакологии, однако их структурно-функциональные исследования значительно затруднены [5], что во многом связано с невозможностью выделения достаточных количеств белковых препаратов из природных источников, а также с трудностями, возникающими при создании высокоэффективных систем гетерологической продукции этих МБ [6]. В течение последнего десятилетия совместное использование систем экспрессии, основанных на эукариотических клетках, и новых методов рентгеноструктурного анализа позволило определить пространственные структуры ряда рецепторов семейства GPCR [5], включая  $\beta$ 2-адренорецептор ( $\beta$ 2AR) [7] и мускариновые холинорецепторы М2 и М3 (mAChR) человека [8, 9]. Эти работы позволили значительно продвинуться в понимании принципов пространственной организации GPCR, однако для детального исследования функциональной динамики и механизмов работы мембранных рецепторов требуется применение спектроскопических методов высокого разрешения, таких, как гетероядерная ЯМР-спектроскопия [10]. Для применения современных методов ЯМР-спектроскопии необходимо иметь миллиграммовые количества белкового препарата, меченного стабильными изотопами ( $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) [10], что при использовании эукариотических систем сопряжено со значительными финансовыми затратами. В то же время применение традиционных бактериальных систем экспрессии для продукции GPCR зачастую не позволяет добиться высоких выходов целевого белка и осложнено необходимостью разработки протоколов ренатурации [11].

В последнее время бесклеточные белоксинтезирующие системы (ББС) [12] и особенно системы, основанные на бактериальных экстрактах, приобретают все большую популярность в качестве альтернативного инструмента для рекомбинантной продукции МБ [13]. По сравнению с системами, основанными на клеточной продукции, ББС обладают рядом пре-

имуществ. Среди них можно выделить продукцию исключительно целевого белка, возможность синтеза токсичных белков, простую процедуру синтеза селективно изотопно-меченных препаратов, а также возможность прямого внесения в реакционную смесь (РС) различных агентов и кофакторов, способствующих стабилизации нативной пространственной структуры синтезированного белка в растворе [12, 13]. Например, для продукции МБ в растворимой форме в РС могут добавляться компоненты мембраномоделирующих сред, такие, как мицеллы детергентов, липид-детергентные бицеллы, липосомы и липид-белковые нанодиски [13–15].

Согласно опубликованным данным, прямая экспрессия генов GPCR в ББС малоэффективна [14, 16–18]. Одной из возможных причин считается низкая эффективность процесса инициации трансляции [18], вызванная образованием вторичной структуры 5'-концевым фрагментом мРНК [19, 20]. Введение на 5'-конец гена целевого белка дополнительных нуклеотидных последовательностей, кодирующих N-концевые полипептидные партнеры, такие, как фрагмент лидерной последовательности белка 10 бактериофага T7 (T7-tag, 11 аминокислотных остатков, а.о., здесь и далее длина последовательности указана с учетом N-концевого остатка Met) [14, 16], белок тиоредоксин *Escherichia coli* (TRX) [17] или синтетические последовательности длиной 1–6 а.о. [18], во многих случаях позволяет решить эту проблему и добиться необходимого уровня продукции GPCR.

В представленной работе для увеличения эффективности бесклеточной продукции GPCR человека на примере  $\beta$ 2AR, M1-mAChR и соматостатинового рецептора типа 5 (SSTR5) предложены три новых N-концевых партнера. Показано, что использование нуклеотидных последовательностей, кодирующих N-концевой фрагмент (6 а.о.) бактериородопсина грамположительной бактерии *Exiguobacterium sibiricum* (ESR-tag), N-концевой фрагмент (16 а.о.) рибонуклеазы А (N-концевой фрагмент S-пептида, S-tag) и белок *Mistic Bacillus subtilis*, позволяет увеличить выход рецепторов в 5–38 раз, обеспечивая продукцию целевых белков на уровне, достаточном для дальнейших структурно-функциональных исследований.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Дизайн и клонирование генов GPCR с дополнительными 5'-концевыми последовательностями

В работе использованы укороченные гены рецепторов  $\beta$ 2AR, M1-mAChR и SSTR5 человека, содержащие дополнительные замены, и 3'-концевые последо-

вательности, кодирующие 10 остатков His (His<sub>10</sub>-tag) (см. «Результаты и обсуждение»). Молекулярные массы целевых белков составляли 38.2, 32.6 и 32.7 кДа соответственно. Нуклеотидные последовательности, кодирующие T7-tag (11 а.о., MASMTGGQQMG), S-tag (16 а.о., MKETAАAKFERQHMDS), TRX (11.8 кДа) и белок Mistic (12.8 кДа), были введены в одной рамке считывания на 5'-конец укороченных генов GPCR (рис. 1) с использованием стандартных методов генной инженерии. Нуклеотидная последовательность, кодирующая ESR-tag (6 а.о., MEEVNL), была добавлена при помощи одностадийной ПЦР на 5'-конец укороченных генов GPCR взамен участков, кодирующих N-концевые внеклеточные фрагменты рецепторов (см. «Результаты и обсуждение»). Все эти генные конструкции были клонированы в вектор pET22b(+) («Novagen», США) под контроль T7-промотора. Полученные векторы назвали pET22b(+)/GPCR, pET22b(+)/T7-tag-GPCR, pET22b(+)/S-tag-GPCR, pET22b(+)/TRX-GPCR, pET22b(+)/Mistic-GPCR и pET22b(+)/ESR-GPCR (рис. 1).

### Бесклеточная продукция GPCR

GPCR синтезировали в бесклеточной системе диализного типа на основе S30 экстракта из *E. coli*, используя протоколы [15, 21]. Конечная концентрация компонентов РС составляла: 100 мМ HEPES-КОН («Fluka», США), pH 8.0, 8 мМ Mg(OAc)<sub>2</sub>, 90 мМ KOAc, 20 мМ ацетилфосфат калия («Sigma», США), 20 мМ фосфоенолпируват калия («Aldrich», США), набор аминокислот (по 1.3 мМ каждой), за исключением Arg, Cys, Met, Trp, Asp, Glu, концентрация каждой из которых составляла 1 мМ, 0.15 мг/мл фолиевой кислоты («Sigma»), каждый из четырех рибонуклеозидтрифосфатов в концентрации 1 мМ, ингибитор протеиназ (X1 Complete protease inhibitor®, «Roche Diagnostics», Германия), 0.05% NaN<sub>3</sub>, 2% полиэтиленгликоль 8000 («Sigma»); 0.3 ед./мкл ингибитора рибонуклеаз RiboLock («Fermentas», Литва), 0.04 мг/мл пируваткиназы («Fermentas», Литва), 5.5 мкг/мл T7-полимеразы, 0.3 мг/мл плазмидной ДНК, 0.5 мг/мл суммарной тРНК (из *E. coli* MRE 600) («Roche Diagnostics», Швейцария), 30% от общего объема РС экстракта S30 из *E. coli*. Питающая смесь (ПС) имела такой же состав, как и РС, исключая высокомолекулярные компоненты: экстракт S30, плазмиду, ферменты, ингибитор рибонуклеаз. Синтез осуществляли без добавления каких-либо мембраноделирующих сред в РС и ПС. Объем РС составлял 50 мкл, объем ПС – 750 мкл. РС помещали в реактор, отделенный от раствора ПС полупроницаемой целлюлозной мембраной (размер пор 12 кДа, «Sigma», США). Инкубацию проводили в течение 20 ч при 30°C и умеренном перемешивании.

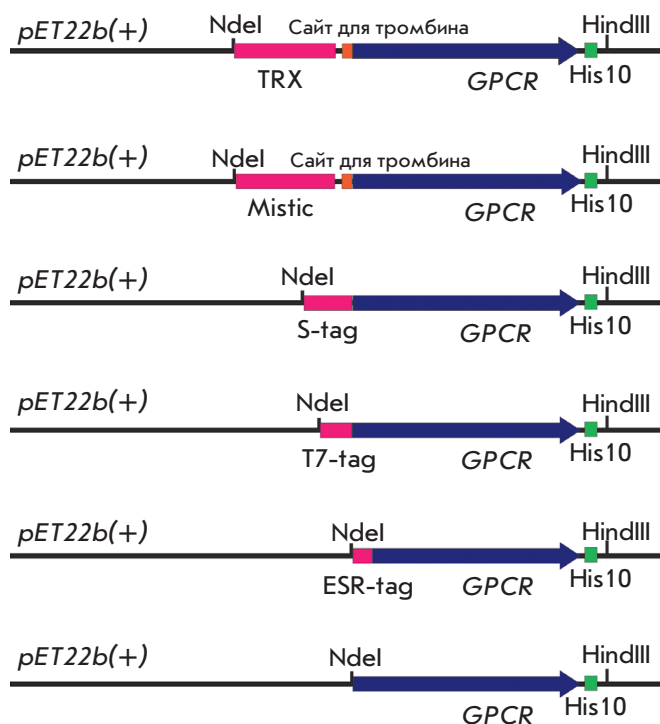
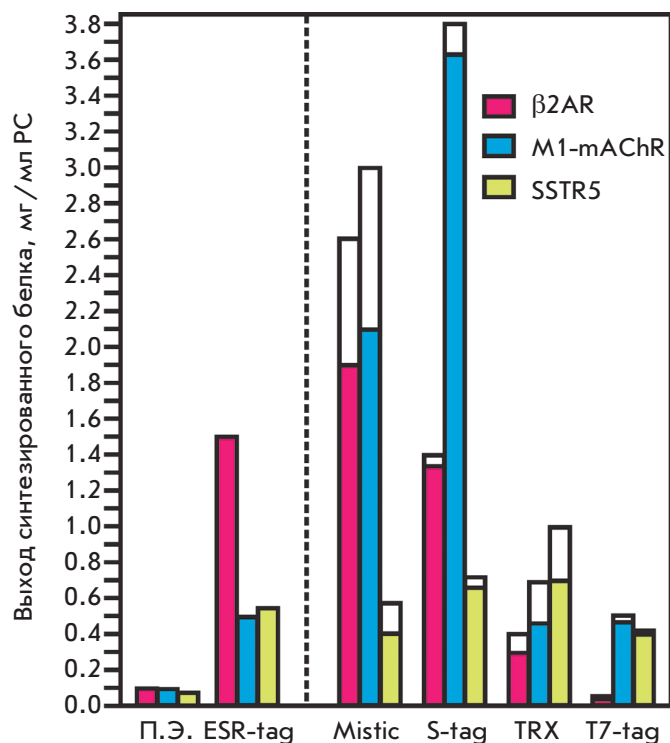


Рис. 1. Дизайн экспрессирующих векторов, содержащих гены GPCR и дополнительные 5'-концевые последовательности. Последовательности, кодирующие N-концевые партнеры, гены GPCR, сайты гидролиза тромбином и полигистидиновые последовательности, показаны розовым, фиолетовым, оранжевым и зеленым соответственно. Показаны сайты эндонуклеаз рестрикции, по которым гены GPCR клонировали в вектор pET22b(+)

### Выделение и очистка препаратов GPCR

РС, содержащие синтезированные GPCR, центрифугировали в течение 15 мин при 14000 об/мин. Полученные осадки сольбилизировали в буфере А (20 мМ Трис-НСl, 250 мМ NaCl, 1 мМ NaN<sub>3</sub>, pH 8.0), содержащем 1% додецилсульфата натрия (SDS), 1 мМ дитиотреитола и 8 М мочевины. Сольбилизированные белки наносили на колонку, содержащую Ni<sup>2+</sup>-сефарозу («GE Healthcare», Швеция), промывали 10 объемами буфера А, содержащего 1% SDS, и элюировали тремя объемами буфера А, содержащего 1% SDS и 500 мМ имидазола. Образцы GPCR диализовали против буфера А, содержащего 1% SDS.

Фракции элюата анализировали при помощи электрофореза в ПААГ и Вестерн-блотинга, используя моноклональные антитела мыши против гексагистидиновой последовательности (His-tag® Monoclonal antibody, «Novagen», США). Количество очищенных препаратов GPCR определяли спектрофотометрически по поглощению при 280 нм. Спектры КД получали



**Рис. 2.** Анализ эффективности бесклеточного синтеза GPCR в зависимости от 5'-концевой последовательности генов. Уровень синтеза GPCR в отсутствие дополнительных 5'-концевых последовательностей обозначен «П.Э.» (прямая экспрессия). Уровень синтеза гибридных белков показан «незаполненными» столбцами, количества синтезированных целевых белков (цветные столбцы) показаны за вычетом доли, занимаемой N-концевыми партнерами. Каждое значение получено на основе усреднения результатов трех повторных опытов, относительная величина стандартного отклонения не превышала 15%. Количественное содержание препаратов GPCR оценивали спектрофотометрически по поглощению при 280 нм после очистки с помощью Ni<sup>2+</sup>-аффинной хроматографии

при комнатной температуре на спектрометре J-810 («Jasco», Япония).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Дизайн генов GPCR

Для увеличения стабильности препаратов GPCR и уменьшения тенденции рекомбинантных белков к агрегации использовали укороченные варианты рецепторов, дополнительно содержащие точечные замены. При помощи методов генной инженерии были удалены N- и C-концевые внеклеточные участки, не участвующие в связывании лигандов [7–9, 22–24].

Делеция C-концевых участков рецепторов привела к удалению остатков Cys (241, 435 и 320), которые, как предполагается, являются сайтами посттрансляционного присоединения остатков пальмитиновой кислоты в молекулах β2AR, M1-mAChR и SSTR5 соответственно [7, 23, 24]. Кроме того, из молекулы M1-mAChR был удален фрагмент цитоплазматической петли 3 (L3), которая также не участвует в связывании лигандов [8, 9, 25]. Полученные гены кодировали участки 25–340, 19–224/354–426 и 37–319 рецепторов β2AR, M1-mAChR и SSTR5 человека соответственно. Для последующей очистки рекомбинантных белков с помощью Ni<sup>2+</sup>-аффинной хроматографии на 3'-концевые участки генов дополнительно вводили последовательности, кодирующие His<sub>10</sub>-tag.

Укороченные гены рецепторов β2AR, M1-mAChR и SSTR5 кодировали 10, 9 и 10 остатков Cys соответственно, из которых только остатки из внеклеточной области, возможно, участвуют в формировании внутримолекулярных дисульфидных связей (Cys106–Cys191 и Cys184–Cys190 в β2AR; Cys98–Cys178 и Cys391–Cys394 в M1-mAChR; Cys112–Cys186 в SSTR5, нумерация приведена для нативной последовательности рецепторов). С целью уменьшения агрегации рекомбинантных белков в результате образования «ненативных» межмолекулярных дисульфидных связей, при помощи сайт-направленного мутагенеза заменили остатки Cys, имеющие трансмембранную и цитоплазматическую локализацию. Так, используя данные [26, 27], остатки Cys77, Cys116 и Cys125 в последовательности β2AR были заменены на Val, а остатки Cys285, Cys327 и Cys265 – на Ser. В M1-mAChR остатки Cys69, Cys205, Cys417, Cys421, Cys435 и Cys460 заменили на Ser [28]. В SSTR5 остатки Cys129, Cys237 и Cys260 заменили на Ser; остатки Cys169, Cys218 и Cys220 – на Val; а остатки Cys51 и Cys298 – на Gly. Кроме того, в последовательность β2AR дополнительно внесли «стабилизирующую» замену Glu122Trp [29].

### Экспрессия генов GPCR в бесклеточной системе

Добавление в PC бесклеточной системы мембрано-моделирующих компонентов в некоторых случаях позволяет синтезировать МБ в растворимой и функционально активной форме [13–18]. Однако многие из подобных добавок, например молекулы детергентов, способны негативно влиять на продуктивность системы, частично или полностью ингибируя синтез целевого белка [14–17]. Поэтому в нашей работе для сравнительного анализа эффективности экспрессии генов GPCR с дополнительными 5'-концевыми участками мы не использовали мембрано-моделирующие среды в процессе синтеза. При этом целевые белки накапливались в виде осадка PC. Осадки рас-



творяли в «жестком» детергенте SDS в присутствии мочевины и восстанавливающего агента дитиотреитола. Количество синтезированных белков оценивали спектрофотометрически после очистки растворенных осадков при помощи Ni<sup>2+</sup>-аффинной хроматографии. Синтез целевых белков подтверждали с использованием моноклональных антител против гексагистидиновой последовательности.

Как и ожидалось, прямая экспрессия укороченных генов *β2AR*, *M1-mAChR* и *SSTR5* в ББС на основе экстракта S30 из *E. coli* была малоэффективна. Выход целевых белков после очистки не превышал 0.1 мг с 1 мл РС (рис. 2). Следует отметить, что ранее мы наблюдали высокоэффективную продукцию (выход до 1.6 мг/мл [15]) бактериородопсина из грамположительной бактерии *Ex. sibiricum* (ESR) – структурного гомолога рецепторов семейства GPCR, также содержащего семь ТМ-спиралей [30]. Мы предположили, что низкий выход модельных GPCR связан с малой эффективностью инициации трансляции, вызванной образованием вторичной структуры фрагментом мРНК в области начала целевого гена. Для подтверждения этого предположения в генах укороченных GPCR заменили 5'-концевые последовательности, кодирующие внеклеточные N-концевые аминокислотные остатки, предшествующие первой ТМ-спирали (остатки 25–33, 19–23 и 37–38 в *β2AR*, *M1-mAChR* и *SSTR5* соответственно), на нуклеотидную последовательность, кодирующую первые 6 а.о. бактериородопсина ESR (ESR-tag, длина последовательности указана с учетом N-концевого остатка Met) (рис. 1). Эта замена позволила значительно увеличить эффективность продукции целевых белков (рис. 2). При этом выход гибридного белка ESR-tag-*β2AR* был сравним с выходом белка ESR, в то время как уровень синтеза двух других гибридных белков – ESR-tag-*M1-mAChR* и ESR-tag-*SSTR5* – был примерно в 3 раза ниже (~ 0.5 мг/мл).

### Сравнение эффективности синтеза GPCR с различными N-концевыми партнерами

Полученные результаты подтвердили важную роль 5'-концевой последовательности гена в эффективной экспрессии в бесклеточной системе. Однако выходы целевых белков, достигнутые с использованием ESR-tag, возможно, не были оптимальными. Так, в литературе описаны примеры синтеза рекомбинантных МБ в ББС диализного типа на основе экстракта S30 клеток *E. coli* с выходом до 4–6 мг/мл [14]. С целью дальнейшей оптимизации системы синтеза модельных GPCR мы опробовали четыре N-концевых партнера. Два из них, T7-tag (11 а.о.) и белок TRX (11.8 кДа), ранее применяли для бесклеточной продукции рецепторов семейства GPCR [14, 16, 17], в то время как белок

Mistic (12.8 кДа) использовали для продукции GPCR в клетках *E. coli* [31, 32]. Кроме того, опробовали последовательность, кодирующую N-концевой фрагмент (16 а.о.) рибонуклеазы А (N-концевой фрагмент S-пептида, S-tag), который применяется для детекции и очистки препаратов рекомбинантных белков при помощи аффинной хроматографии [33], но не использовался ранее в качестве N-концевого партнера для получения рекомбинантных МБ. В отличие от метода, использованного при дизайне гибридных генов с 5'-концевой последовательностью, кодирующей ESR-tag, нуклеотидные последовательности, кодирующие T7-tag, TRX, Mistic и S-tag, были добавлены в единой рамке считывания на 5'-конец генов укороченных вариантов GPCR (рис. 1).

В большинстве случаев использование N-концевых партнеров вело к увеличению выхода модельных рецепторов, причем степень выхода различалась у разных белков. Так, например, использование T7-tag увеличило выход *M1-mAChR* и *SSTR5* до ~ 0.5 мг/мл, в то время как уровень *β2AR* оставался низким и был сравним с выходом, наблюдаемым при прямой экспрессии. Использование TRX также обеспечивало небольшое увеличение эффективности синтеза целевых белков – до ~ 0.3–0.7 мг/мл (здесь и далее приведены количества целевых белков за вычетом доли, занимаемой белками-партнерами, рис. 2). В то же время применение N-концевых партнеров Mistic и S-tag позволило значительно повысить продукцию *β2AR* и *M1-mAChR* (рис. 2). При этом наибольший выход *β2AR* (~ 1.9 мг/мл) наблюдался при использовании белка Mistic, а максимальный выход *M1-mAChR* (~ 3.6 мг/мл) отмечен в случае гибридного белка с последовательностью S-tag (рис. 2). Однако ни одна из использованных последовательностей-партнеров не позволила добиться значительного увеличения уровня продукции *SSTR5*. Выход этого рецептора (0.4–0.7 мг/мл) был близким при использовании разных гибридных конструкций (рис. 2). По-видимому, в случае *SSTR5* инициация трансляции не является единственным фактором, критически важным для эффективности бесклеточного синтеза. Возможно, для увеличения уровня продукции этого рецептора в бактериальной бесклеточной системе требуется дальнейшая оптимизация нуклеотидной последовательности гена, например замена редко встречающихся у *E. coli* вариантов кодонов. Следует отметить, что близкий по величине выход *SSTR5* (~ 0.5 мг/мл) наблюдали ранее в бактериальной ББС диализного типа при использовании гибрида полноразмерного (не укороченного) рецептора с N-концевой последовательностью T7-tag [34].

Как уже отмечалось, увеличение эффективности синтеза белка при использовании дополнительных

N-концевых последовательностей связано, возможно, с уменьшением способности 5'-концевого фрагмента мРНК к образованию вторичной структуры. Для подтверждения этого предположения проведено моделирование вторичной структуры 5'-концевых фрагментов мРНК, использованных нами для продукции GPCR. Моделирование проводили в программе M-fold, позволяющей оценивать свободную энергию образования вторичной структуры РНК [35]. Свободная энергия образования вторичной структуры была рассчитана для фрагментов мРНК, включающих 4 нуклеотида до стартового кодона, стартовый кодон и 34 нуклеотида гена целевого белка или партнера, следующих за стартовым кодоном, как описано в работе [20]. Расчеты показали (таблица), что нативные последовательности укороченных рецепторов способны образовывать стабильные вторичные структуры ( $\Delta G \sim -5.6, -8.2$  и  $-19.3$  ккал/моль для  $\beta 2AR$ , M1-mAChR и SSTR5 соответственно). Использование последовательностей T7-tag и TRX лишь незначительно уменьшало стабильность вторичной структуры 5'-концевого фрагмента мРНК ( $\Delta G \sim -5.5 \dots -7.8$  ккал/моль). В то же время использование N-концевой последовательности бактериородопсина ESR значительно уменьшало стабильность вторичной структуры 5'-концевого фрагмента мРНК  $\beta 2AR$  и M1-mAChR ( $\Delta G \sim -3.1$  и  $-3.5$  ккал/моль соответственно). Наименее стабильные вторичные структуры мРНК получены при использовании последовательностей Mistic и S-tag ( $\Delta G \sim -1.3$  и  $-3.3$  ккал/моль соответственно). Качественная корреляция рассчитанных энергий с уровнем синтеза GPCR косвенно подтверждает важную роль образования вторичной структуры 5'-концевым фрагментом мРНК в снижении эффективности инициации трансляции и, как следствие, общей эффективности бесклеточного синтеза.

Модификация 5'-концевой области гена целевого белка не единственный метод предотвращения формирования вторичной структуры мРНК и увеличения эффективности инициации трансляции. На эти процессы также могут влиять нуклеотидные последовательности, которые находятся в нетранслируемых 5'-концевых областях этих мРНК. В представленной работе мы использовали генетические конструкции на основе вектора *pET22b(+)* («Novagen»), содержащего последовательность *lac*-оператора между T7-промотором и сайтом связывания рибосомы (RBS). Согласно опубликованным данным, использование векторов *pIVEX* («Roche Applied Science», США), не содержащих *lac*-оператор, может увеличить эффективность прямой экспрессии генов GPCR в бактериальных ББС [34]. Для проверки этого предположения мы протестировали эффективность прямой

Свободная энергия образования вторичной структуры 5'-концевым фрагментом мРНК ( $\Delta G$ , ккал/моль)

Партнер/GPCR	$\beta 2AR$	M1-mAChR	SSTR5
Прямая экспрессия	-5.6	-8.2	-19.3
ESR-tag	-3.1	-3.5	-6.4
Mistic	-1.3	-1.3	-1.3
S-tag	-3.3	-3.3	-3.3
TRX	-7.8	-7.8	-7.8
T7-tag	-5.5	-7.6	-7.3

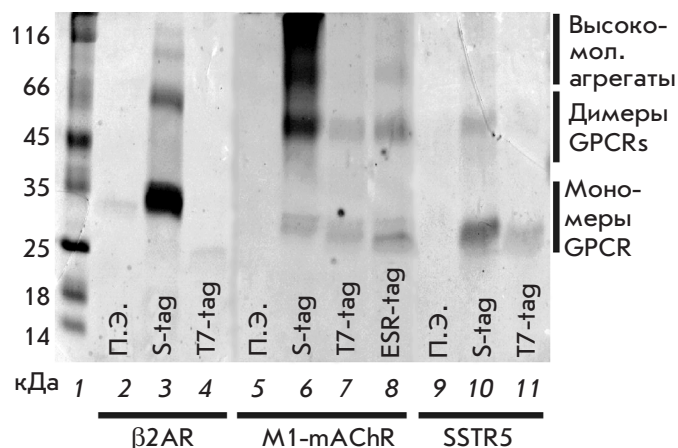
**Примечание.** Свободная энергия рассчитана в программе M-fold [35] для фрагментов мРНК, включающих 4 нуклеотида до стартового кодона, стартовый кодон и 34 нуклеотида гена целевого белка или партнера, следующих за стартовым кодоном.

экспрессии укороченного гена *M1-mAChR* при использовании вектора *pIVEX2.3*. Выход целевого белка в этом случае ( $\sim 0.1$  мг/мл) был не больше, чем при прямой экспрессии гена *M1-mAChR*, клонированного в вектор *pET22b(+)*. Полученные данные согласуются с результатами исследования обонятельных GPCR, продукция которых в бактериальной бесклеточной системе с использованием векторов *pIVEX* была малоэффективной [36]. Кроме того, для высокоэффективной экспрессии клонированных в векторы *pIVEX* генов белков человека также требуется использование N-концевых последовательностей-партнеров [37].

Другим способом решения проблем, связанных с низкой эффективностью инициации трансляции в ББС, может быть рациональный дизайн 5'-концевой последовательности гена целевого белка с использованием синонимичных замен (без изменения кодируемой последовательности), цель которого – уменьшение способности мРНК к формированию вторичной структуры [20]. Так, подобный подход применили для продукции цитокинов млекопитающих в тех случаях, когда наличие последовательности-партнера (N-концевого фрагмента хлорамфеникол-ацетилтрансферазы, 5 а.о.) препятствовало формированию пространственной структуры целевого белка [38].

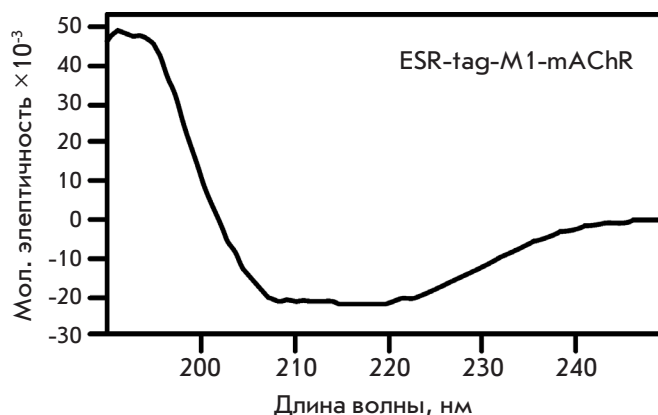
**Анализ рекомбинантных GPCR**

Очищенные препараты GPCR, солюбилизированные в «жестком» детергенте SDS (1%), проанализировали при помощи электрофореза в ПААГ. Репрезентативные фрагменты электрофореграмм показаны на рис. 3. Полученные препараты, как и препараты



**Рис. 3.** Электрофоретический анализ синтезированных GPCR с различными N-концевыми партнерами после очистки с помощью  $Ni^{2+}$ -аффинной хроматографии. В образцах выявлены как мономеры, димеры и тримеры рецепторов, так и агрегаты более высокого порядка. 1 – маркеры молекулярной массы; 2, 5, 9 – рецепторы, синтезированные без N-концевых партнеров (П.Э. – прямая экспрессия); 3, 6, 10 – рецепторы с последовательностью S-tag; 4, 7, 11 – рецепторы с последовательностью T7-tag; 8 – ESR-tag-M1-mAChR

других МБ [39], имели аномальную электрофоретическую подвижность, вызванную, вероятно, неполной денатурацией молекул МБ SDS. На электрофореграммах выявлены отдельные полосы, соответствующие мономерам, димерам, тримерам рецепторов и агрегатам более высокого порядка (рис. 3). Подобное поведение типично для GPCR, которые в составе биологической мембраны формируют димеры и тримеры, а также склонны к спонтанной агрегации из-за гидрофобных взаимодействий ТМ-спиралей даже в растворах «жестких» детергентов [31]. Степень агрегации препаратов GPCR зависела от типа рецептора и последовательности N-концевого партнера, а также, возможно, от концентрации белкового препарата в образце. Так, например, наибольшее количество высокомолекулярных агрегатов отмечено в образце S-tag-M1-mAChR, синтез которого был наиболее эффективным. Методом КД-спектроскопии проанализирована вторичная структура гибрида ESR-tag-M1-mAChR, который в растворе SDS обладал меньшей степенью агрегации (рис. 4). Анализ полученных данных выявил преобладание  $\alpha$ -спиральной структуры ( $\alpha$ -спираль – 65%,  $\beta$ -лист – 4%,  $\beta$ -поворот – 9%, неупорядоченная структура – 22%), что указывает на частично сформированную вторичную структуру рецептора в окружении молекул SDS. Следует



**Рис. 4.** КД-спектр ESR-tag-M1-mAChR в растворе 1% SDS

отметить, что содержание  $\alpha$ -спиральных элементов в молекуле укороченного рецептора M1-mAChR, рассчитанное по аналогии с известными кристаллическими структурами M2 и M3-mAChR [8, 9], должно составлять ~ 72%.

Для дальнейшего изучения рекомбинантных GPCR необходима либо оптимизация процедуры солюбилизации целевых белков из осадка РС с последующей разработкой методов ренатурации полученных препаратов, либо применение мембраномоделирующих сред в процессе бесклеточного синтеза, что в некоторых случаях позволяет синтезировать МБ в функционально активной форме [13, 15, 34, 35].

### ВЫВОДЫ

Результаты, полученные в нашей работе, показали, что применение в качестве N-концевых партнеров аминокислотных последовательностей ESR-tag, S-tag и белка Mistic позволяет добиться высокоэффективной продукции GPCR человека в бесклеточной системе на основе S30 экстракта из *E. coli*. Использование этих последовательностей обеспечивает продукцию целевых белков (0.6–3.8 мг/мл) на уровне, достаточном для дальнейших структурно-функциональных исследований. Представленная работа впервые показывает возможность применения ESR-tag и S-tag для увеличения уровня гетерологической продукции МБ. ●

*Работа поддержана ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 годы», Программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», РФФИ (грант № 11-04-01864-а), программой «У.М.Н.И.К.» и Министерством образования и науки (№ соглашений 8268 и 8789).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lundstrom K.H. *Structural Genomics on Membrane Proteins*. Boca Raton, FL: CRC Press, 2006.
2. Wallin E., von Heijne G. // *Protein Sci.* 1998. V. 7. № 4. P. 1029–1038.
3. Fredriksson R., Lagerström M.C., Lundin L.G., Schiöth H.B. // *Mol. Pharmacol.* 2003. V. 63. № 6. P. 1256–1272.
4. Overington J.P., Al-Lazikani B., Hopkins A.L. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2006. V. 5. № 12. P. 993–996.
5. Rosenbaum D.M., Rasmussen S.G., Kobilka B.K. // *Nature*. 2009. V. 459. № 7245. P. 356–363.
6. McCusker E.C., Bane S.E., O'Malley M.A., Robinson A.S. // *Biotechnol. Prog.* 2007. V. 23. № 3. P. 540–547.
7. Cherezov V., Rosenbaum D.M., Hanson M.A., Rasmussen S.G., Thian F.S., Kobilka T.S., Choi H.J., Kuhn P., Weis W.I., Kobilka B.K., et al. // *Science*. 2007. V. 318. № 5854. P. 1258–1265.
8. Haga K., Kruse A.C., Asada H., Yurugi-Kobayashi T., Shirosaki M., Zhang C., Weis W.I., Okada T., Kobilka B.K., Haga T., et al. // *Nature*. 2012. V. 482. № 7386. P. 547–551.
9. Kruse A.C., Hu J., Pan A.C., Arlow D.H., Rosenbaum D.M., Rosemond E., Green H.F., Liu T., Chae P.S., Dror R.O., et al. // *Nature*. 2012. V. 482. № 7386. P. 552–556.
10. Cavanagh J., Fairbrother W.J., Palmer A.G., III, Skelton N.J., Rance M. *Protein NMR Spectroscopy Principles and Practice*. 2<sup>nd</sup> ed. N.Y.: Academic Press, 2006.
11. Kiefer H. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2003. V. 1610. № 1. P. 57–62.
12. Shirokov V.A., Kommer A., Kolb V.A., Spirin A.S. // *Methods Mol. Biol.* 2007. V. 375. P. 19–55.
13. Schneider B., Junge F., Shirokov V.A., Durst F., Schwarz D., Dötsch V., Bernhard F. // *Methods Mol. Biol.* 2010. V. 601. P. 165–186.
14. Klammt C., Schwarz D., Fendler K., Haase W., Dötsch V., Bernhard F. // *FEBS J.* 2005. V. 272. P. 6024–6038.
15. Lyukmanova E.N., Shenkarev Z.O., Khabibullina N.F., Kopeina G.S., Shulepko M.A., Paramonov A.S., Mineev K.S., Tikhonov R.V., Shingarova L.N., Petrovskaya L.E., et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2012. V. 1818. № 3. P. 349–358.
16. Klammt C., Schwarz D., Eifler N., Engel A., Pehler J., Haase W., Hahn S., Dötsch V., Bernhard F. // *J. Struct. Biol.* 2007. V. 158. № 3. P. 482–493.
17. Ishihara G., Goto M., Saeki M., Ito K., Hori T., Kigawa T., Shirouzu M., Yokoyama S. // *Protein Expr. Purif.* 2005. V. 41. P. 27–37.
18. Haberstock S., Roos C., Hoevels Y., Dötsch V., Schnapp G., Pautsch A., Bernhard F. // *Protein Expr. Purif.* 2012. V. 82. № 2. P. 308–316.
19. Hall M.N., Gabay J., Debarbouille M., Schwartz M. // *Nature*. 1982. V. 295. P. 616–618.
20. Kudla G., Murray A.W., Tollervey D., Plotkin J.B. // *Science*. 2009. V. 324. № 5924. P. 255–258.
21. Хабибуллина Н.Ф., Люкманова Е.Н., Копейна Г.С., Шенкарев З.О., Арсеньев А.С., Долгих Д.А., Кирпичников М.П. // *Биоорг. химия*. 2010. Т. 36. № 5. С. 654–660.
22. Greenwood M.T., Hukovic N., Kumar U., Panetta R., Hjorth S.A., Srikant C.B., Patel Y.C. // *Mol. Pharmacol.* 1997. V. 52. № 5. P. 807–814.
23. Hukovic N., Panetta R., Kumar U., Rocheville M., Patel Y.C. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. № 33. P. 21416–21422.
24. Kaye R.G., Saldanha J.W., Lu Z.L., Hulme E.C. // *Mol. Pharmacol.* 2011. V. 79. № 4. P. 701–709.
25. Shapiro R.A., Nathanson N.M. // *Biochemistry*. 1989. V. 28. № 22. P. 8946–8950.
26. Gether U., Lin S., Ghanouni P., Ballesteros J.A., Weinstein H., Kobilka B.K. // *EMBO J.* 1997. V. 16. № 22. P. 6737–6747.
27. Fraser C.M. // *J. Biol. Chem.* 1989. V. 264. № 16. P. 9266–9270.
28. Savarese T.M., Wang C.D., Fraser C.M. // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. № 16. P. 11439–11448.
29. Roth C.B., Hanson M.A., Stevens R.C. // *J. Mol. Biol.* 2008. V. 376. № 5. P. 1305–1319.
30. Petrovskaya L.E., Lukashev E.P., Chupin V.V., Sychev S.V., Lyukmanova E.N., Kryukova E.A., Ziganshin R.H., Khatypov R.A., Erokhina L.G., Spirina E.V., et al. // *FEBS Lett.* 2010. V. 584. № 19. P. 4193–4196.
31. Петровская Л.Е., Шульга А.А., Бочарова О.В., Ермолюк Я.С., Крюкова Е.А., Чупин В.В., Бломмерс М.Ж.Ж., Арсеньев А.С., Кирпичников М.П. // *Биохимия*. 2010. Т. 75. № 7. С. 1001–1013.
32. Chowdhury A., Feng R., Tong Q., Zhang Y., Xie X.Q. // *Protein Expr. Purif.* 2012. V. 83. № 2. P. 128–134.
33. Terpe K. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2003. V. 60. № 5. P. 523–533.
34. Klammt C., Perrin M.H., Maslennikov I., Renault L., Krupa M., Kwiatkowski W., Stahlberg H., Vale W., Choe S. // *Protein Sci.* 2011. V. 20. P. 1030–1041.
35. Zuker M. // *Nucl. Acids Res.* 2003. V. 31. № 13. P. 3406–3415.
36. Kaiser L., Graveland-Bikker J., Steuerwald D., Vanberghem M., Herlihy K., Zhang S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. V. 105. № 41. P. 15726–15731.
37. Michel E., Wüthrich K. // *J. Biomol. NMR.* 2012. V. 53. № 1. P. 43–51.
38. Goerke A.R., Swartz J.R. // *Biotechnol. Bioeng.* 2008. V. 99. № 2. P. 351–367.
39. Rath A., Glibowicka M., Nadeau V.G., Chen G., Deber C.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. № 6. P. 1760–1765.