

УДК 577.2

Изучение мембранной локализации в *E. coli* рекомбинантных калиевых каналов

О. В. Некрасова^{1#}, А. И. Тагвей¹, А. А. Игнатова^{1,2}, А. В. Феофанов^{1,2}, М. П. Кирпичников^{1,2}¹ Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН² Биологический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова

e-mail: genchem@ibch.ru

РЕФЕРАТ Осуществление эффективной экспрессии рекомбинантных мембранных белков в *E. coli* напрямую связано с совершенствованием подходов и методов, направленных на встраивание целевых белков в клеточную мембрану и образование ими правильной пространственной структуры. Важной технологической задачей в этом направлении является разработка методов изучения локализации целевых белков в клетке-хозяине. На модельной системе гибридного калиевого канала KcsA-Kv1.3 разработана технологическая схема изучения мембранной локализации в клетках *E. coli* рекомбинантных белков, содержащих функционально-активные участки вольт-зависимых эукариотических калиевых каналов. Схема включает применение биохимических и флуоресцентных методов детекции целевых белков в мембране, а также изучение их лиганд-связывающей активности в составе бактериальной мембраны.

Ключевые слова: мембранные белки; KcsA; фракционирование клеток; флуоресцентные методы

ВВЕДЕНИЕ

Определение структуры и функций мембранных и мембранно-связанных белков является одним из актуальных направлений современной биологии. Мембранные белки участвуют в важнейших клеточных процессах – рецепции и межклеточной коммуникации, молекулярном и ионном транспорте, играют роль в патогенезе многих заболеваний и являются мишенями большей части фармацевтических препаратов [1].

В связи с низким уровнем биосинтеза многих мембранных белков в биологических тканях основным источником этих белков для структурно-функциональных исследований являются рекомбинантные молекулы, полученные в различных системах гетерологической экспрессии. [2]. Бактериальные клетки (в частности, *Escherichia coli*) представляют собой распространенную и наиболее продуктивную систему биосинтеза рекомбинантных мембранных белков [3]. Вместе с тем гетерологическая экспрессия в *E. coli* эукариотических белков, в т.ч. мембранных, приводит к возникновению ряда проблем, связанных с их общей токсичностью для клеток. Кроме того, распространенным случаем является экспрессия агрегированного белка в тельцах включения, что приводит к необходимости тщательного подбора условий его рефолдинга после выделения. Более перспективным представляется подход, основанный на экспрессии мембранных белков в составе бактериальной мембраны с образованием правильной пространственной укладки (фолдинга) белковой молекулы [4].

Реализация такого подхода может быть существенно облегчена, если обеспечить возможность простого и эффективного тестирования правильности укладки полипептидной цепи целевого белка в мембране, например, с помощью тестов, измеряющих его функциональную активность или способность связывать лиганды. Кроме того, применение простых биохимических методов для определения локализации целевых белков в клетке позволит оперативно контролировать встраивание целевого рекомбинантного белка в мембрану. Такой подход повысит эффективность планирования и осуществления экспериментов, позволит ускорить выбор оптимальной стратегии для функциональной экспрессии целевого мембранного белка.

Для разработки способов контролируемой функциональной экспрессии рекомбинантных мембранных белков в клетках *E. coli* нами был выбран гибридный калиевый канал KcsA-Kv1.3, возможность экспрессии которого в клетках бактерий была продемонстрирована ранее [5, 6]. Этот и аналогичные ему гибриды KcsA-Kv1.X были получены путем встраивания функционально-активного сайта связывания с лигандами эукариотических калиевых каналов семейства Kv1 в гомологичный участок бактериального канала KcsA.

Интерес к эукариотическим вольт-зависимым калиевым каналам Kv1 определяется важной ролью этих белков в таких процессах, как проведение нервного импульса, регуляция мускульных сокращений, пролиферация клеток [7]. В настоящее время канал Kv1.3 рассматривается в качестве терапевтической мишени при лечении целого ряда

аутоиммунных заболеваний [8], а тестирование его лиганд-связывающей активности составляет основу поиска новых лекарственных препаратов [9].

Получение гибридных белков KcsA-Kv1.X оказалось возможным вследствие высокой структурной и функциональной гомологии калиевых каналов. По своему строению эти белки являются тетрамерами, каждая субъединица которых содержит шесть (вольт-зависимые эукариотические каналы) или две (бактериальные каналы) трансмембранные спирали. В случае эукариотических каналов концевые спирали S5 и S6, соединенные петлей, образуют пору канала, проводящую ионы калия [10]. Бактериальный калиевый канал KcsA [11], имеющий более простое строение субъединиц, по общему плану строения гомологичен поровым доменам самых различных бактериальных и эукариотических вольт-зависимых каналов. Наибольшая гомология аминокислотной последовательности наблюдается в области поровой петли, соединяющей трансмембранные спирали M1 и M2 этого канала (рис. 1а).

Линкер S5-P эукариотических Kv1 каналов участвует в формировании сайта связывания с пептидными токсинами – природными блокаторами вольт-зависимых каналов [12]. Возможность замены S5-P-линкера KcsA на соответствующий участок Kv1.3 канала привела к созданию гибридного белка KcsA-Kv1.3 (рис. 1б), представляющего собой рецептор с высоким сродством к пептидным токсинам [5]. Полученный гибрид сохраняет специфичность связывания с лигандами, присущую эукариотическому каналу Kv1.3, и является, таким образом, подходящей биоинженерной конструкцией для поиска новых модуляторов активности этого канала.

Выбор KcsA-Kv1.3 для настоящего исследования обусловлен, во-первых, достаточно высоким уровнем экспрессии этого белка в *E. coli* (до 2.5 мг/л [5]), что позволяет детектировать этот белок в составе суммарного клеточного лизата с помощью традиционного метода анализа белков – денатурирующего электрофореза в ПААГ. Во-вторых, свойство гибридного белка связывать меченые лиганды может быть использовано для разработки альтернативных методов тестирования локализации мембранных белков в составе клеточной мембраны.

Целью работы является разработка на примере рекомбинантных калиевых каналов технологических подходов для реализации функциональной экспрессии рекомбинантных мембранных белков в составе мембраны клеток *E. coli*, контролируемой на основе методов флуоресцентной микроскопии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

МАТЕРИАЛЫ

В работе были использованы реактивы фирмы Merck, Германия, и фирмы Sigma, США; детергенты Mega 9 (нонаноил-N-метилглюкамид), N-лаурилсаркозинат натрия (фирмы Amresco, США), Тритон X-100 (фирмы Merck, США); наборы для выделения плазмидной ДНК, очистки ПЦР-фрагментов, экстракции ДНК из агарозного геля (фирмы Qiagen, США); ферменты рестрикции и ДНК-модифицирующие ферменты (фирмы Fermentas, Латвия).

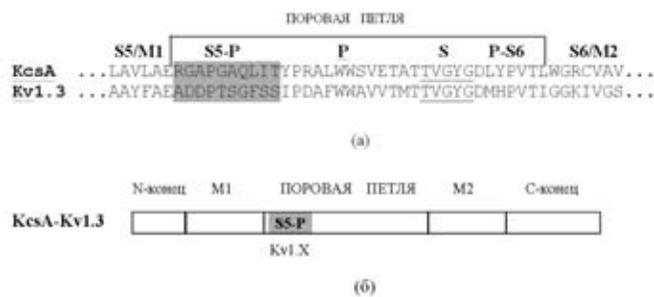


Рис. 1. Гомология аминокислотных последовательностей поровой петли вольт-зависимого канала Kv1.3 и бактериального канала KcsA (а) и схематическое изображение структуры гибрида KcsA-Kv1.3 (б). S5/M1 и S6/M2 – трансмембранные спирали; S5-P и P-S6 – последовательности линкеров; P – поровая спираль; S – последовательность, участвующая в образовании селективного ионного фильтра в составе тетрамера (подчеркнута)

МЕТОДЫ

В работе использовали общие методы работы с рекомбинантными ДНК [13].

ЭКСПРЕССИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ГЕНА KcsA-Kv1.3

Ночную культуру клеток *E. coli* BL21(DE3) (фирмы Novagen), трансформированных плазмидой pET28KcsA-Kv1.3, инокулировали в 30.0 мл среды M9, содержащей 40 мкг/мл канамицина, до начальной мутности $OD_{560} = 0.25$ о.е./см. Культуру индуцировали при $OD_{560} = 1.0$ о.е./см добавлением ИПТГ (изопропил-β-D-тиогаляктопиранозид) до конечной концентрации 50 мкМ и продолжали выращивание в течение 18 ч при 37 °С (конечная мутность культуры составляла 2.5–3 о.е./см). Биосинтез белка детектировали путем разделения белков клеточного лизата электрофорезом в денатурирующем 13.5 % полиакриламидном геле (ДСН-ПААГ) по методу Лэммли [14].

ИММУНОБЛОТТИНГ

Белки из ДСН-ПААГ переносили на нитроцеллюлозный фильтр BA-85 (фирмы Schleisher&Schuell) электрофорезом на приборе Mini-Protean 3 Cell (фирмы Bio-Rad, США) в буфере 25 мМ NaHCO₃, pH 9.2, 10 % метанол в течение 1.5 ч и токе 0.8 мА/см при 20 °С. Иммунохимическое окрашивание проводили с использованием моноклональных мышинных IgG1 антител (Penta-His, фирмы Qiagen, США) в разведении 1:1000 и конъюгата вторичных антител (анти-IgG1 мыши) с пероксидазой хрена (фирмы Novagen) в разведении 1:3000 в соответствии с методикой производителя. В качестве хроматофорного субстрата пероксидазы использовали ТМБ (тетраметилбензидин) в растворе 0.03 % перекиси водорода.

ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ КЛЕТОК

Пробы для фракционирования готовили осаждением клеток из 30 мл культуры центрифугированием при 4000 г в течение 10 мин при 10 °С. Клетки лизировали в 4 мл буфера А (100мМ NaCl, 5мМ KCl, 50мМ Трис pH 8.0), содержащем 0.5 мг/мл лизоцима, 1 мМ ЭДТА и 1мМ фенолметилсульфотригид, при 4 °С в течение 20 мин, после чего проводили озвучивание в течение 5 мин на приборе Digital Sonifier model 250 (фирмы Branson) импульсами по 10 сек при мощности 200 Вт.

Суспензию центрифугировали 10 мин при 10000 g при 5 °С, осадок отделяли (осадок I), а супернатант центрифугировали 1 ч при 80 000 g при 5 °С на центрифуге TLA 100 (фирмы Beckman) и получали осадок II. Каждый осадок экстрагировали буфером В (0.1 М Na₃PO₄, pH 7.0, 5mM KCl), содержащим 40 mM Mega 9 (1 % лаурилсаркозин или 1 % Тритон X-100) при качании в течение 3-4 ч, затем проводили повторное центрифугирование и полученные конечные осадки растворяли в буфере для электрофореза в 13.5 % ДСН-ПААГ.

ОТМЫВКА МЕМБРАН ЩЕЛОЧНЫМ РАСТВОРОМ КАРБОНАТА НАТРИЯ

Клетки лизировали в буфере С (50mM Tris pH 8, 5mM EDTA), содержащем 1 мг/мл лизоцима. Суспензию подвергали трехкратному замораживанию и размораживанию для вскрытия клеток, затем проводили озвучивание в течение 1 мин импульсами по 10 сек. К суспензии добавляли равный объем 0.2 М Na₂CO₃, pH 12, и инкубировали на ледяной бане в течение 5 мин. Белки, встроенные в мембрану, осаждали центрифугированием в течение 1 ч при 80 000 g и 4 °С. Полученный осадок растворяли для анализа в 13.5 % ДСН-ПААГ.

ОЧИСТКА РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА С ПОМОЩЬЮ МЕТАЛЛ-АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Экстракты осадков I или II наносили на колонку с 1 мл смолы Ni-NTA агарозы (фирмы Qiagen) в буфере В, содержащем 40 mM Mega 9. Смола промывалась раствором 20 mM имидазола, и белок элюировали 0.4 М имидазола в этом же буфере.

ПРОЦЕДУРА ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИИ СВЯЗЫВАНИЯ KCSA-KV1.3 С ЛИГАНДОМ

Культуру индуцированных клеток BL21(DE3) с белком KcsA-Kv1.3 (1 мл) центрифугировали в течение 10 мин при 5000 xg, осадок суспендировали в буфере А, содержащем 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 М сахарозу, 0.3 mM EDTA и 20 мкг/мл лизоцима, инкубировали в течение 20 мин при 4 °С, затем добавляли MgCl₂ до конечной концентрации 10 mM. Полученную таким образом суспензию сферопластов разбавляли в 100-200 раз буфером А, содержащим 0.25 М сахарозу, и аликвоту (50-70 мкл) вносили в лунку планшета и инкубировали в течение 1.5 ч при 20 °С с флуоресцентно меченым AgTx2 в концентрации 10 nM. AgTx2, конъюгированный с 5(6)-карбокситетраметилпроламином (Rh-AgTx), был любезно предоставлен Ю. В. Корольковой (ИБХ РАН). Регистрацию образования комплекса мембранного белка KcsA-Kv1.3 с его лигандом Rh-AgTx осуществляли методом лазерной сканирующей конфокальной микроскопии с помощью установки LSM510 META (Zeiss, Германия). Конфокальные флуоресцентные изображения сферопластов, окрашенных Rh-AgTx, измеряли с помощью 63-кратного водоиммерсионного объектива С-Apochromat (числовая апертура 1.2, Zeiss, Германия). Пространственное разрешение составляло около 0.2 мкм в плоскости препарата и 0.5 мкм в направлении оптической оси объектива. Флуоресценцию Rh-AgTx возбуждали He,Ne лазером (543.5 нм, мощность 12 мВт на образце), а испускание флуоресценции регистрировали с помощью длинноволнового барьерного фильтра с границей 585 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПРОЦЕДУР ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ И ЭКСТРАКЦИИ ДЕТЕРГЕНТАМИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ КЛЕТОЧНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ KcsA-Kv1.3

Ген гибридного белка KcsA-Kv1.3 был сконструирован в соответствии с работой [5] и клонирован в плазмиду pET28a (фирмы Novagen). Экспрессию гибридного гена KcsA-Kv1.3 проводили в составе плазмиды pET28KcsA-Kv1.3 в клетках BL21(DE3). Уровень наработки рекомбинантного белка в клетках определяли с помощью анализа суммарного клеточного белка электрофорезом в SDS-ПААГ, а наличие целевого белка в клеточном лизате подтверждали с помощью иммуноблоттинга, используя антитела против участка Hisx6, локализованного на С-конце рекомбинантных белков.

Как известно из литературных источников, рекомбинантный KcsA, а также гибридные белки KcsA-Kv1.3 накапливаются в составе цитоплазматической (внутренней) мембраны *E. coli* [5, 15, 16]. Так, например, выделение гибридных белков [5] проводили из мембранной фракции клеток, полученной путем высокоскоростного центрифугирования клеточного лизата (110 000 g в течение 45 мин). Эту процедуру мы решили использовать для разработки методики фракционирования клеток, направленной на определение клеточной локализации целевых мембранных белков – гибридных калиевых каналов.

Процедура фракционирования клеток, полученных после выращивания индуцированной культуры, основана на разрушении клеток ультразвуком, осаждении фрагментов клеточной стенки и нерастворимых компонентов низкоскоростным центрифугированием при 10 000 g в течение 10 мин (осадок I) и последующем осаждении мембранных везикул высокоскоростным центрифугированием (осадок II). На представленной электрофореграмме (рис. 2а) видно, что гибридный белок KcsA-Kv1.3 содержится в нерастворимой фракции клеток, причем значительное его количество детектируется в осадке II (рис 2а, дорожка 3), что свидетельствует о встраивании рекомбинантного белка в мембрану. Интересным наблюдением является наличие целевого белка в осадке I (рис 2а, дорожка 2). Этот низкоскоростной осадок обычно рассматривается в литературе как фракция, содержащая тела включения – нерастворимые агрегаты целевого белка, образующиеся в результате слипания новосинтезированных рекомбинантных полипептидов в денатурированной форме [17]. В случае экспрессии растворимых белков при выделении рекомбинантных молекул из состава тел включения необходимо проводить процедуру ренатурации белка с целью получения его активной формы. В случае биосинтеза мембранных белков состав низкоскоростного осадка I, а также механизм его образования, по-видимому, могут быть иными. Так, в работе [18] показано, что распределение белков в цитоплазматической мембране клеток *E. coli* неравномерно: с помощью дифференциального центрифугирования были выявлены «легкие» фракции мембран, не содержащие белка, тяжелые фракции, нагруженные белком, а также промежуточные фракции. Учитывая, что в клетках BL21(DE3) происходит суперэкспрессия гибридного белка KcsA-Kv1.3, можно предположить, что осадок I содержит насыщенные белком мембранные везикулы, обладающие большей плотностью, чем мембраны в осадке II. Об этом

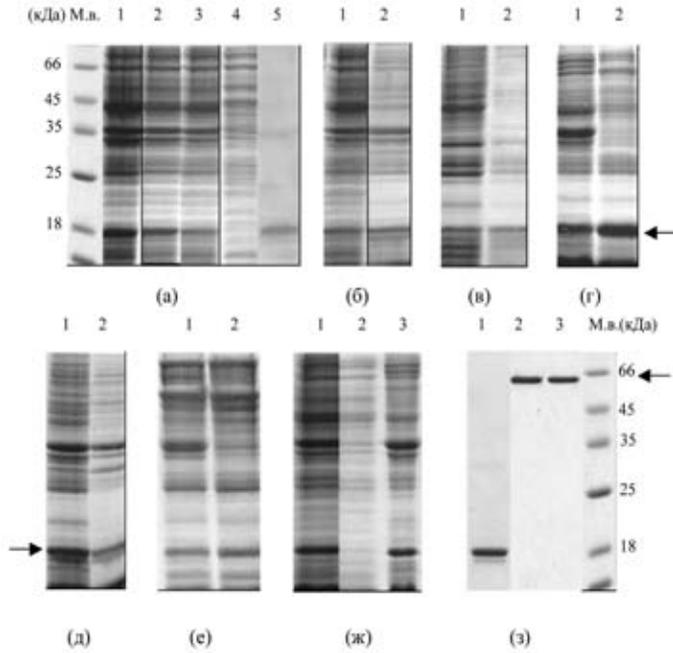


Рис. 2. Фракционирование клеток BL21(DE3), содержащих белок KcsA-Kv1.3 (а). 1 – клеточный лизат; 2 – осадок I; 3 – осадок II; 4 – супернатант после высокоскоростного центрифугирования; 5 – иммуноблот клеточного лизата с анти-His6 антителами. Экстракция осадка I растворами: 40 мМ Mega 9 (б), 1 % лаурилсаркозина (в); 1 % тритона (г). Экстракция осадка II растворами: 40 мМ Mega 9 (д), 1 % тритона (е). 1 – суспензия осадка в детергенте; 2 – экстракт. Фракционирование клеток карбонатным способом (ж). 1 – клеточный лизат; 2 – супернатант после высокоскоростного центрифугирования; 3 – осадок. Анализ образования тетрамерной формы белком KcsA-Kv1.3 (з). 1 – образец KcsA-Kv1.3 с предварительным прогревом в течение 10 мин при 96 °С; 2 – образец KcsA-Kv1.3, выделенный экстракцией 40 мМ Mega 9 из осадка I с предварительным прогревом в течение 10 мин при 37 °С; 3 – образец KcsA-Kv1.3 из осадка II, приготовленный в тех же условиях. М.в. – маркеры молекулярного веса. Стрелкой указано положение целевого белка (мономера или тетрамера)

механизме образования осадка I упоминается в обзоре [2]. Нельзя исключать и того, что осадок I содержит денатурированные молекулы целевого белка.

Исследование осадков I и II проводили с помощью экстракции детергентами. Сначала был использован неионный детергент Mega 9, который обычно применяется для экстракции KcsA и гибридов из мембранной фракции [19]. Как видно на рис. 2б и 2д, обработка обоих осадков этим детергентом привела к растворению целевого белка. Далее осадки экстрагировали мягким ионным детергентом – лауроилсаркозином. Известно, что 1-2 % раствор этого детергента применяется для избирательного растворения цитоплазматической мембраны *E. coli* [20, 21], а в некоторых случаях экспрессии мембранных белков – для растворения низкоскоростного осадка, содержащего целевой белок [22, 23]. Белок KcsA-Kv1.3 полностью экстрагировался из осадков I и II лауроилсаркозином (на рис. 2в представлены результаты по растворимости осадка I). Полная солубилизация осадков I и II произошла и при их обработке раствором 1 % Тритона X-100 по методу [24] (рис. 2г и 2е). Этот детергент в концентрациях 0.5-1.0 % обычно используется для растворения мембранной фракции клеток, а также для отмывки тел включения от примесных белков [17].

Для подтверждения локализации целевого белка в мембране было проведено определение суммарной фракции

мембранных белков путем отмывки мембран раствором карбоната натрия по методу [25]. Этот метод основан на дифференциальном растворении цитоплазматических агрегированных и мембранно-связанных белков в сильнощелочных условиях (pH = 12) и последующем отделении фракции клеток, содержащей интегральные мембранные белки, центрифугированием. Как видно из рис. 2ж, все количество гибридного белка KcsA-Kv1.3 содержится в осадочной фракции.

На следующем этапе мы провели очистку экстрагированных в Mega 9 белков KcsA-Kv1.3 с помощью металл-аффинной хроматографии на колонке Ni-NTA сефарозы, а затем анализировали целевой белок электрофорезом в двух режимах – с предварительным прогреванием при 96 °С в течение 10 мин в буфере, содержащем 1 % SDS, и без прогрева. Этот тест, который используется для детекции образования белком KcsA и его мутантными формами нативной четвертичной структуры, основан на исключительной устойчивости тетрамерной формы KcsA в растворах различных детергентов [16]. Так, например, в случае раствора KcsA в 0.1 % SDS температура плавления комплекса составляет 68 °С. Как видно на рис. 2з, гибридный белок KcsA-Kv1.3, выделенный как из осадка I, так и из осадка II, образует тетрамер. Учитывая, что одним из условий образования тетрамерной структуры белком KcsA является наличие липидного окружения [36], а также основываясь на полученных данных о хорошей растворимости гибридного белка из обоих осадков в детергентах – Mega 9, лауроилсаркозине и Тритоне X-100, можно с большой вероятностью предположить, что гибридный белок в осадке I принимает нативную конформацию в составе мембранных везикул. Дополнительным подтверждением наличия мембранных структур в обоих осадках является переход практически всего количества клеточного целевого белка в нерастворимую фракцию при проведении фракционирования карбонатным методом. Полученные результаты позволяют более правильно оценивать данные по фракционированию мембранных белков в *E. coli*, указывая на то, что локализация целевого мембранного белка в «низкоскоростном» осадке I не исключает образования этим белком нативной конформации в мембранном или мембраноподобном окружении.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕМБРАННОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ KCSA-KV1.3 С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МИКРОСКОПИИ

Наличие лиганд-связывающего сайта в составе гибридного белка KcsA-Kv1.3 дает возможность детектировать встраивание и фолдинг этого рекомбинантного белка в составе цитоплазматической мембраны *E. coli*. Для этих целей была использована разработанная нами процедура связывания флуоресцентно-меченного пептидного токсина – агитоксина, с белком KcsA-Kv1.3 на поверхности целых клеток *E. coli* [26]. Агитоксин (AgTx2) – это пептид (38 аминокислотных остатков) из яда скорпиона *Leiurus quinquestriatus*, который является эффективным блокатором Kv1.3 канала [27]. Связываясь с внешней стороны поры, токсин препятствует транспорту ионов калия через канал. Агитоксин не проявляет сродства к KcsA, однако взаимодействует с высокой аффинностью с очищенным гибридом KcsA-Kv1.3 (IC₅₀ = 6.4 nM) [5]. Кроме того, AgTx2 чувствителен к структурной целостности KcsA и обычно используется

как инструмент для тестирования образования четвертичной (тетрамерной) структуры канала [28].

Для осуществления флуоресцентной детекции связывания целевого белка с агитоксином клетки BL21(DE3), продуцирующие целевой белок KcsA-Kv1.3, предварительно обрабатывали лизоцимом для получения сферопластов с целью удаления клеточной стенки бактерий и обеспечения тем самым доступа меченого лиганда к цитоплазматической мембране. После инкубации сферопластов с Rh-AgTx2 проводили детекцию связывания с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа. На представленной микрофотографии (рис. 3) видно, что флуоресцентный сигнал детектируется на поверхности клеточной мембраны бактерий. В контрольных клетках BL21(DE3), не содержащих плазмиды, а также в клетках, продуцирующих канал KcsA, связывание отсутствовало. Результаты тестирования указывают, что гибридный белок KcsA-Kv1.3 локализован в бактериальной мембране в функционально-активной форме, способной специфически связывать лиганд, пептидный токсин.

В результате проведенных экспериментов показано, что совокупность используемых методов (биохимических и флуоресцентных методов анализа) позволяет адекватно оценивать локализацию рекомбинантных белков – гибридных калиевых каналов в цитоплазматической мембране *E. coli* и контролировать правильность укладки полипептидной цепи по способности белка связывать специфический лиганд.

ВЫВОДЫ

1. На модельной системе мембранного белка KcsA-Kv1.3 разработан подход к изучению мембранной локализации в клетках *E. coli* рекомбинантных каналов, содержащих функционально-активные участки вольт-зависимых эукариотических калиевых каналов. Технологическая схема, основанная на использовании традиционных биохимиче-

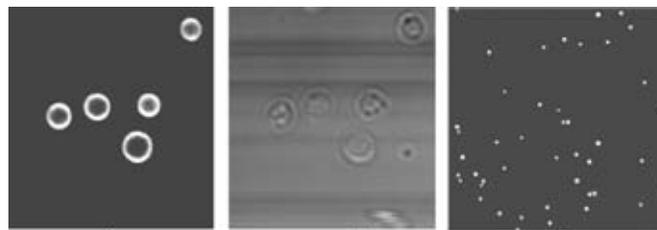


Рис. 3. Связывание гибридного белка KcsA-Kv1.3 с флуоресцентно-меченым лигандом на поверхности бактерий. Цифровые микрофотографии клеток BL21(DE3), продуцирующих KcsA-Kv1.3. (а, б) – флуоресцентные изображения в диапазоне $\lambda > 585$ нм; (б) – клетки в проходящем свете

ских методов анализа, а также на разработанном нами методе флуоресцентной детекции, включает:

- фракционирование клеток, продуцирующих рекомбинантные мембранные белки, с помощью дифференциального центрифугирования клеточного лизата;
- исследование осадочных фракций путем экстракции различными детергентами;
- обнаружение мембранных белков в клеточном лизате «карбонатным» методом;
- определение тетрамерной структуры канала с помощью ДСН-ПААГ;
- детекцию в составе целых клеток *E. coli*, продуцирующих целевой белок, встраивания целевого белка в цитоплазматическую мембрану и образования им правильной тетрамерной структуры канала с помощью флуоресцентных методов.

2. Показано, что осадок, полученный низкоскоростным центрифугированием при фракционировании клеточного лизата, содержит целевой белок, образующий правильную тетрамерную конформацию в мембранном окружении. ●

Данная работа была выполнена при финансовой поддержке программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология»

Список литературы

1. Byrne V., Iwata S. Membrane protein complexes. *Curr Opin in Struct Biol* 2002. 12. P. 239-243.
2. Grishammer R., Tate C.G. Overexpression of integral membrane proteins for structural studies. *Q Rev. Biophys* 1995. 28. P. 314-422.
3. Jana S., Deb J.K. Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2005. 67. P. 289-298.
4. Drew D., Fröderberg L., Baars L., de Gier J.W. Assembly and overexpression of membrane proteins in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 2003. 1610. P. 3-10.
5. Legros C., Pollmann V., Knaus H.-G., Farrell A.M., Darbon H., Bougis P.E., Martin-Eauclaire M.F., Pongs O. Generating a high-affinity scorpion toxin receptor in KcsA-Kv1.3 chimeric potassium channels. *J Biol Chem* 2000. 275. P. 16918-16924.
6. Legros C., Schulze C., Garcia M.L., Bougis P.E., Martin-Eauclaire M.F., Pongs O. Engineering-specific pharmacological binding sites for peptidyl inhibitors of potassium channels into KcsA. *Biochemistry* 2002. 41. P. 15369-15375.
7. Shieh C.C., Coghlan M., Sullivan J.P., Gopalakrishnan M. Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. *Pharmacol Rev* 2000. 52. P. 557-594.
8. Beeton C., Wulff H., Barbara J., Clot-Faybesse O., Pennington M., Bernard D., Cahalan M.D., Chandry K.G., Béraud E. Selective blockade of T lymphocyte K(+) channels ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis, a model for multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001. 98. P. 13942-13947.
9. Kaczorowski G.J., Garcia M.L. Pharmacology of voltage-gated and calcium-activated potassium channels. *Curr Opin Chem Biol* 1999. 3. P. 448-458.
10. MacKinnon R. Potassium channels. *FEBS Lett* 2003. 555. P. 62-65.
11. Doyle D.A., Morais Cabral J., Pfuetzner R.A., Kuo A., Gulbis J.M., Cohen S.L., Chait B.T., MacKinnon R. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 1998. 280. P. 69-77.
12. MacKinnon R., Cohen S.L., Kuo A., Lee A., Chait B.T. Structural conservation in prokaryotic and eukaryotic potassium channels. *Science* 1998. 280. P. 106-109.
13. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
14. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970. 227. P. 680-685.
15. Irizarry S.N., Kutluay E., Drews G., Hart S.J., Heginbotham L. Opening the KcsA K⁺ channel: tryptophan scanning and complementation analysis lead to mutants with altered gating. *Biochemistry* 2002. 41. P. 13653-13662.
16. Cortes D.M., Perozo E. Structural dynamics of the *Streptomyces lividans* K⁺ channel (SKK1): oligomeric stoichiometry and stability. *Biochemistry* 1997. 36. P. 10343-10352.
17. Singh S.M., Panda A.K. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J Biosci Bioeng* 2005. 99. P. 303-310.
18. van Heerikhuizen H., Kwak E., van Bruggen E.F., Witholt B. Characterization of a low density cytoplasmic membrane subfraction isolated from *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 1975. 413. P. 177-191.
19. Schrempf H., Schmidt O., Kümmerlen R., Hinnah S., Mller D., Betzler M., Steinkamp T., Wagner R. A prokaryotic potassium ion channel with two predicted transmembrane segments from *Streptomyces lividans*. *EMBO J* 1995. 14. P. 5170-5178.
20. Carbone G.M., Thomas M.L., Rumschlag H.S., Sottnek F.O. Rapid microprocedure for isolating detergent-insoluble outer membrane proteins from *Haemophilus* species. *J Clin Microbiol* 1986. 24. P. 330-332.
21. Gauthier A., Puente J.L., Finlay B.B. Secretin of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system requires components of the type III apparatus for assembly and localization. *Infect Immun* 2003. 71. P. 3310-3319.
22. Fiermonte G., Walker J.E., Palmieri F. Abundant bacterial expression and reconstitution of an intrinsic membrane-transport protein from bovine mitochondria. *Biochem J* 1993. 294. P. 293-299.
23. Kerman A., Ananthanarayanan V.S. Expression and spectroscopic characterization of a large fragment of the mu-opioid receptor. *Biochim Biophys Acta* 2005. 1747. P. 133-40.
24. Shimada Y., Wang Z.Y., Mochizuki Y., Kobayashi M., Nozawa T. Functional expression and characterization of a bacterial light-harvesting membrane protein in *Escherichia coli* and cell-free synthesis systems. *Biosci Biotechnol Biochem* 2004. 68. P. 1942-1948.
25. van Dalen A., Schrempf H., Killian J.A., de Kruijff B. Efficient membrane assembly of the KcsA potassium channel in *Escherichia coli* requires the protonmotive force. *EMBO Rep* 2000. 1. P. 340-346.
26. Nekrasova O.V., Ignatova A.A., Nazarova A.I., Feofanov A.V., Korolkova Y.V., Boldyreva E.F., Tagvei A.I., Grishin E.V., Arseniev A.S., Kirpichnikov M.P. Recombinant Kv channels at the Membrane of *Escherichia coli* Bind Specifically Agitoxin2. *J Neuroimmune Pharmacol* 2009. 4. P. 83-91.
27. Garcia M.L., Garcia-Calvo M., Hidalgo P., Lee A., MacKinnon R. Purification and characterization of three inhibitors of voltage-dependent K⁺ channels from *Leiurus quinquestriatus* var. *hebraeus* venom. *Biochemistry* 1994. 33. P. 6834-6839.
28. Valiyaveetil F.I., MacKinnon R., Muir T.W. Semisynthesis and folding of the potassium channel KcsA. *J Am Chem Soc* 2002. 124. P. 9113-9120.