

УДК 577.2

Бесклеточная продукция внеклеточного домена никотинового ацетилхолинового рецептора

Е. Н. Люкманова^{1#}, Г. С. Копейна², М. А. Шулепко², З. О. Шенкарев¹,
А. С. Арсеньев¹, Д. А. Долгих^{1,2}, М. П. Кирпичников^{1,2}

¹ Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова,
РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

² Биологический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова
e-mail: genchem@ibch.ru

Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (нАХР) являются лиганд-зависимыми ионными каналами, встроенными в постсинаптические мембраны нейронов [1]. нАХР состоят из пяти гомологичных субъединиц, трансмембранные части которых образуют ионопроводящую пору, а внеклеточные N-концевые домены содержат сайты связывания лигандов (рис. 1). В нервной системе млекопитающих существует гомопентамер нАХР $\alpha 7$ типа ($\alpha 7$ нАХР), с дисфункциями которого связано развитие ряда тяжелых заболеваний нервной и эндокринной систем [2]. Исследования нАХР и разработка препаратов для лечения подобных заболеваний требует высокоэффективных систем продукции отдельных субъединиц и доменов рецептора, создание которых затруднено из-за склонности этих белков к агрегации [3].

Несколько лет назад группой американских ученых была определена пространственная структура ацетилхолинсвязывающего белка из моллюска *Lymnaea stagnalis* (АХСБ) [4]. АХСБ – водорастворимый белок, состоящий из пяти

одинаковых субъединиц, он имеет 25 % гомологию с внеклеточным доменом $\alpha 7$ нАХР ($\alpha 7$ ВД) и взаимодействует с такими лигандами нАХР, как ацетилхолин, α -конотоксины и α -нейротоксины [4]. Было показано, что замена фрагмента внеклеточного домена, заключенного между двумя цистеиновыми остатками 128 и 142 (т. н. Cys-loop фрагмента) на гомологичный участок из АХСБ приводит к значительному повышению растворимости $\alpha 7$ ВД [5].

В течение последних 10 лет бесклеточные системы, в особенности диализного типа (SECF-continuous exchange cell free), успешно используются для получения рекомбинантных белков [7, 8]. У этих систем есть несколько преимуществ перед системами, основанными на клеточной продукции: во-первых, можно решить проблему агрегации путем ввода в реакционную смесь агентов, позволяющих удерживать синтезирующийся полипептид в растворе; во-вторых, можно проводить синтез изотопно-меченных по определенным аминокислотным остаткам белков для структурных исследований.

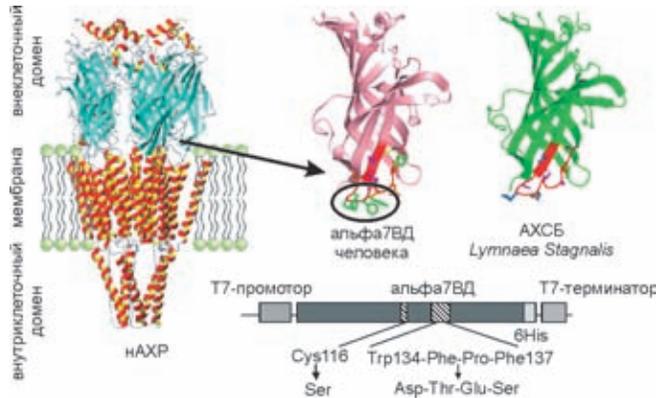


Рис. 1. Модель пространственной структуры NAXP [1]. Сравнение модели субъединицы $\alpha 7$ ВД [6] с пространственной структурой субъединицы АХСБ [4]. Схема введения мутаций в ген $\alpha 7$ ВД

Целью данной работы было создание эффективной системы бесклеточной продукции $\alpha 7$ ВД человека. Для этого на основе полноразмерного гена $\alpha 7$ нАХР (любезно предоставлен проф. Й. Линдстрёмом) были получены два мутантных гена $\alpha 7$ ВД, содержащие замены, возможно, приводящие к повышению растворимости домена. Один ген ($\alpha 7$ ВД/C116S/Cys-loop) кодировал последовательность $\alpha 7$ ВД с заменой неспаренного остатка Cys116 на остаток Ser [3] и заменой фрагмента Cys-loop/ $\alpha 7$ ВД (Cys128-Cys142) на фрагмент Cys-loop/АХСБ [5]. При анализе модели $\alpha 7$ ВД, предложенной в [6] (рис. 1), было замечено, что фрагмент 134-137 $\alpha 7$ ВД имеет гидрофобную природу и, возможно, контактирует с мембранным окружением целого рецептора. В то же время аналогичный участок молекулы АХСБ содержит только гидрофильные остатки (рис. 1). Мы предположили, что для улучшения растворимых свойств $\alpha 7$ ВД будет достаточным произвести замену только четырех аминокислотных остатков Trp134-Phe-Pro-Phe137, принадлежащих Cys-loop, на остатки Asp-Thr-Glu-Ser гомологичного участка АХСБ. Второй ген ($\alpha 7$ ВД/C116S/DTES) кодировал последовательность $\alpha 7$ ВД с этой заменой и заменой Cys116Ser (рис. 1).

Мутантные гены с дополнительной последовательностью, кодирующей 6His на С-конце молекулы, были клонированы в коммерческий вектор *pET22b(+)*. При синтезе обоих вариантов в бесклеточной системе большая часть белкового препарата накапливалась в виде нерастворимых агрегатов, и лишь небольшая часть целевого белка оставалась в растворе (рис. 2, дорожки 2-4). Причиной агрегации, возможно, служили неправильное формирование дисульфидных связей и стремление фрагмента рецептора к самопроизвольной пентамеризации, присущей $\alpha 7$ ВД [9]. Эксперименты показали, что добавление в трансляционную смесь (ТС) смесей восстановленного (GSH) и окисленного (GSSG) глутатионов в концентрации 0.1 мМ и 0.5 мМ соответственно повышало растворимую долю целевого белка до 30% (рис. 2, дорожки 5-7). Присутствие в ТС низкомолекулярного агониста нАХР, 20 мМ карбамоилхолина (КБМХ), также приводило к увеличению выхода растворимой фракции до 30% (рис. 2, дорожки 8-10). Добавление в ТС мягкого неионного детергента Brij-35 в концентрации

0.5% как агента, препятствующего самопроизвольной пентамеризации, наряду с добавлением глутатионов привело к синтезу практически полностью растворимого белка (рис. 2, дорожки 11-13). Следует отметить, что оба химерных варианта $\alpha 7$ ВД демонстрировали одинаковое поведение как при синтезе белка, так и при последующих манипуляциях. Поэтому дальнейшая работа была продолжена только с вариантом $\alpha 7$ ВД/C116S/DTES.

При дальнейшей очистке химерных белков из ТС с помощью металл-афинной хроматографии происходила практически полная преципитация белковых препаратов. Поэтому были подобраны условия ренатурации $\alpha 7$ ВД/C116S/DTES из осадка ТС. Были реализованы различные подходы для растворения осадка, включающие использование как 8 М мочевины, 6 М гуанидинхлорида, так и 1% раствора детергента лаурилсаркозина натрия (LS). Наибольшая эффективность растворения $\alpha 7$ ВД/C116S/DTES из осадка была достигнута при использовании смеси 3 М мочевины и 1% LS в присутствии ДТТ. Дальнейшая ренатурация $\alpha 7$ ВД/C116S/DTES происходила на металл-афинной смоле в результате промывки смесью GSSG/GSH и в градиенте понижения концентрации мочевины и LS. Однако полученный белковый препарат обладал низкой стабильностью в растворе. Тогда был использован вариант ренатурации, в котором 1% LS постепенно заменяли на 0.1% β -додецилмальтозид (DDM) или 0.1% додецилфосфолиин (DPC). В результате были получены стабильные (более 1 месяца при +4 °С) белковые препараты с конечным выходом 1 мг белка с 1 мл трансляционной смеси. Препараты $\alpha 7$ ВД в DDM и DPC были проанализированы с помощью гель-фильтрации (рис. 3). В случае использования DDM белок находился преимущественно в виде растворимых высокомолекулярных агрегатов (рис. 3), а использование DPC позволило получить гомогенный (>90%) препарат $\alpha 7$ ВД с диаметром частиц около 7 нм, что соответствует размеру мономера $\alpha 7$ ВД (5 нм) в комплексе с мицеллой DPC (4 нм).

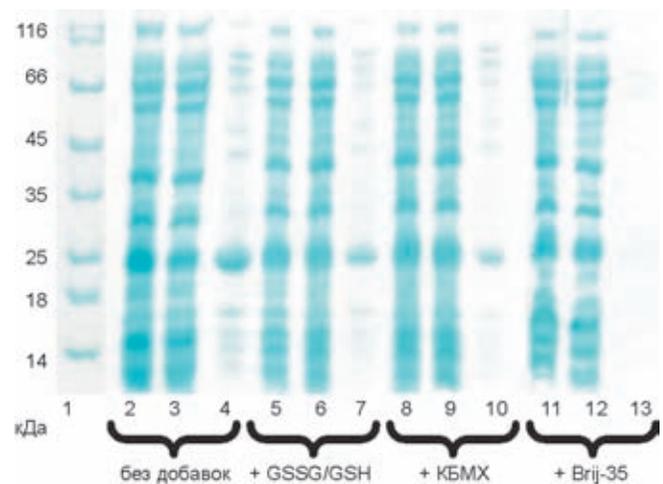


Рис. 2. Электрофоретический анализ синтеза $\alpha 7$ ВД/C116S/DTES в бесклеточной системе. 1 – маркеры молекулярных весов; 2, 5, 8, 11 – общий белок ТС; 3, 6, 9, 12 – растворимая фракция ТС; 4, 7, 10, 13 – нерастворимая фракция ТС

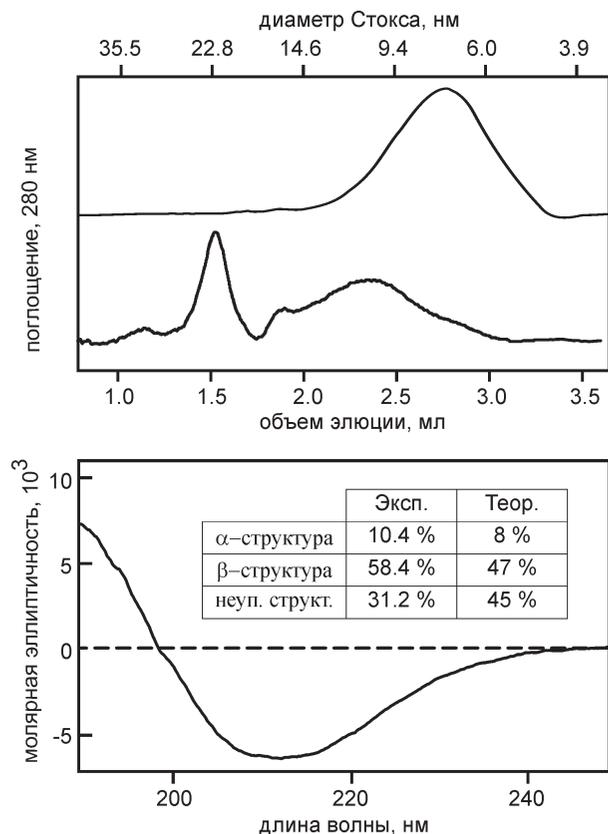


Рис. 3. Анализ с помощью гель-фильтрации на смоле Superdex-200 (GE Healthcare) α 7ВД/С116S/DTES в растворе DDM и DPC. КД-спектр α 7ВД/С116S/DTES в растворе DPC

Анализ вторичной структуры α 7ВД/С116S/DTES в растворе DPC методом КД спектроскопии выявил преобладание β -структуры, что соответствует теоретически рассчитанным значениям (рис. 3). Способность α 7ВД/С116S/DTES в растворе DPC взаимодействовать с антагонистами НАХР была исследована методом ЯМР-спектроскопии с использованием ^{15}N -меченого аналога длинного нейротоксина NTII/NTI, полученного, как описано в [10]. Раствор токсина в DPC титровали раствором домена рецептора, и по ослаблению сигналов токсина в 1D ^{15}N -HSQC спектре судили о взаимодействии токсина с α 7ВД (рис. 4). Было показано, что каждая молекула α 7ВД специфически связывает две молекулы токсина с эффективной константой около 2 мкМ и сравнительно большой кооперативностью (коэффициент Хилла 1.8).

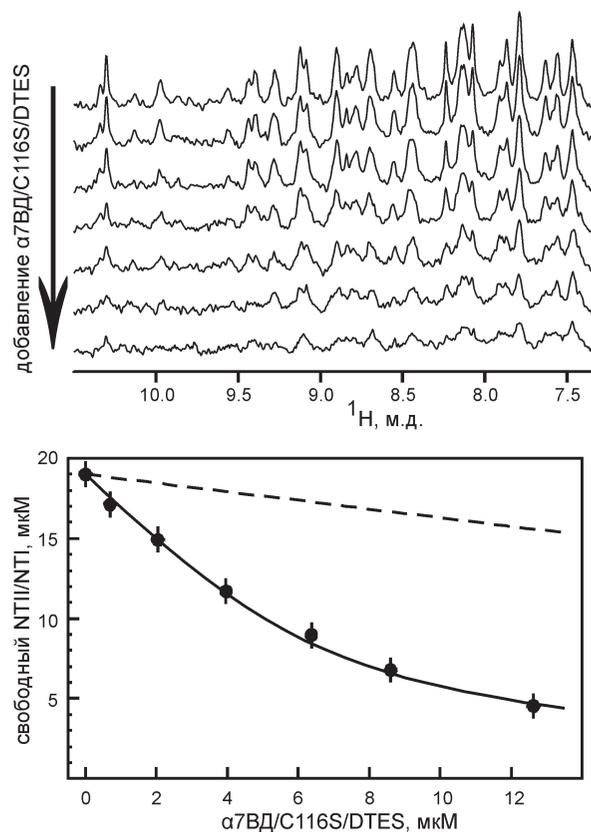


Рис. 4. 1D ^{15}N -HSQC спектры ЯМР токсина NTII/NTI в присутствии мицелл DPC и возрастающих концентраций α 7ВД/С116S/DTES, а также полученная на их основе изотерма связывания. Кривая разведения показана пунктирной линией

Таким образом, нами разработана новая система бактериальной бесклеточной продукции активного внеклеточного домена α 7НАХР. Добавление DPC к препарату белка способствует стабилизации домена в растворе, сохраняя вторичную структуру и не препятствуя взаимодействию с антагонистами. Разработка данной системы открывает новые перспективы для структурно-функциональных исследований взаимодействия НАХР с его лигандами. ●

Данная работа была выполнена при финансовой поддержке Российской академии наук (программа «Молекулярная и клеточная биология»), Российского фонда фундаментальных исследований и при поддержке гранта Президента РФ «молодой кандидат» МК-6386.2008.4.

Список литературы:

- Unwin N. J. Mol. Biol. 2005. 346. 967
- Sharma G., Vijayaraghavan S. Curr Med Chem. 2008. 5(28). 2921-32.
- Tsetlin V.I., Dergousova N.I., Azeeva E.A., Kryukova E.V., Kudelina I.A., Shibanova E.D., Kasheverov I.E., Methfessel C. Eur. J. Biochem. 2002. 269. 2801-2809
- Breje K., Jvan Dijk W., Klaassen R.V., Schuurmans M., van der Oost J., Smit A.B., Sixma T.K. Nature 2001. 411. 269-276
- Avramopoulou V., Mamalaki A., Tzartos S.J. J. Biol. Chem., 2004. 279(37). 38287-93.
- Fruchart-Gaillard C., Gilquin B., Antil-Delbeke S., Le Novère N., Tamiya T., Corringier

- P.J., Changeux J.P., Ménez A., Servent D. Proc. Natl. Acad. Sci., 2002. 99(5). 3216-21.
- Klammt C., Schwarz D., Eifler N., Engel A., Piehler J., Haase W., Hahn S., Dötsch W., Bernhard F. J. Struct. Biol., 2007. 158(3). 482-93.
- Klammt C., Lohr F., Schafer B., Haase W., Dotsch V., Ruterjans H., Glaubitz C., Bernhard F. FEBS Lett., 2004. 271. 568-580.
- Wells G.B., Anand R., Wang F., Lindstrom J. J Biol Chem., 1998. 273(2). 964-73.
- Lyukmanova E.N., Shenkarev Z.O., Schulga A.A., Ermolyuk Y.S., Mordvintsev D., Utkin Y.N., Shoulepko M.A., Hogg R., Bertrand D., Dolgikh D.A., Tsetlin V.I., Kirpichnikov M.P. J. Biol. Chem., 2007. 282(34). 24784-91.