

Экспрессия и очистка ADP ribosylation factor 1 для *in meso* кристаллизации

Н.И.Дмитриева¹, Д.Братанов²

¹Московский физико-технический институт (государственный университет)

²Institute of Structural Biochemistry (ICS-6), Forschungszentrum Jülich

Мембранные белки выполняют множество различных функций в клетке и участвуют в таких важных процессах, как взаимодействие клеток, передача сигналов между клетками и транспорт через мембрану. Как следствие, они ответственны за развитие различных заболеваний и являются объектом воздействия значительной части современных лекарств. Для эффективной разработки лекарств полезно знать атомную структуру белка-мишени, однако получение структур мембранных белков является существенно более сложной задачей по сравнению с решением структур растворимых белков. Главная трудность заключается в том, что для рентгеноструктурного анализа, наиболее широко используемого для получения структур белков, необходимы высокоупорядоченные кристаллы. Выращивание кристаллов мембранных белков нужных размеров – непростая задача для структурной биологии.

В данной работе исследовался мембранно-ассоциированный белок ADP ribosylation factor 1 (Arf1), который является одним из основных регуляторов везикулярного транспорта внутри клетки [1]. Его основная функция заключается в сборке, позиционировании и регуляции его эффекторов вблизи мембраны. Белок имеет водорастворимую часть и амфипатическую спираль, которая ответственна за присоединение к мембране. Имеющиеся в настоящее время структурные модели были получены для укороченных белков, не имеющих этой спирали. Однако было показано, что без *N*-концевой спирали белок не функционален, поэтому получение полной структуры белка представляет значительный интерес.

Для получения очищенного белка было создано две генетические конструкции, в которых ген *Arf1* был вставлен в экспрессионную плазмиду *pEKT* в слиянии с *Mac* родопсином. *Mac* родопсин был выбран для слияния с *Arf1* по нескольким причинам: этот белок имеет довольно высокий выход, а также может быть кристаллизован в большом числе различных условий, что увеличивает шансы успешного появления кристаллов слитого белка. В то же время предполагается, что *Arf1*, соединенный с относительно большим трансмембранным белком, останется функциональным. Созданные генетические конструкции были названы “long+helix” и “loose”; первая из них содержала линкер между *MacR* и *Arf1*, вторая была без линкера (рис. 2). Полученная в результате плаزمиды *pEKT-MacR-Arf1* имела полный ген *MacR-Arf1* с *His-tag* кодирующей последовательностью на 3' конце.

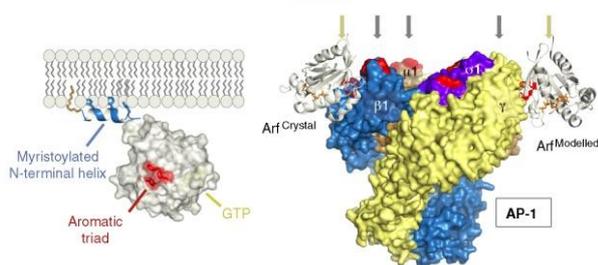


Рис. 1. ADP ribosylation factor 1

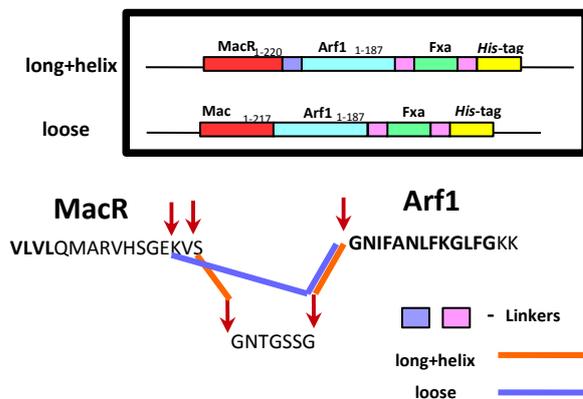


Рис. 2. Генетические конструкции MacR-Arf1

Клетки *E.coli* штамма C41 были трансформированы плазмидой *pEKT-MacR-Arf1* и выращивались при 37 °C в среде с 50 мкг/мл канамицина, экспрессия запускалась методом автоиндукции. После сбора клетки были разрушены при давлении 138 МПа, после чего мембранную фракцию отделяли центрифугированием. *MacR-Arf1* был экстрагирован путем добавления 1 г детергента на 20 г клеток. Для солюбилизации и дальнейшей очистки

использовались DM и DDM. Солюбилизованная фракция наносилась на колонку с Ni-NTA, где *His*-tag специфично связывался с никелем, после чего белок смывался буфером с 500 мМ имидазола. Последним этапом очистки была гель-фильтрация. Мерой чистоты образца, прошедшего этот этап, было peak ratio – отношение величины пика поглощения на длине волны 280 нм к величине пика поглощения на 520 нм, характерного для Мас родопсина. Более точно это отношение было вычислено после измерения спектра поглощения образца на спектрофотометре.

Обе генетические конструкции были успешно экспрессированы и очищены; выход “long+helix” конструкции составил 0,5 мг/л, для “loose” конструкции – 2,8 мг/л. Теоретически рассчитанная величина peak ratio составила 1,6 для обеих конструкций, в эксперименте наилучшее полученное значение составило 1,95. В ходе оптимизации протоколов солюбилизации и очистки были опробованы DM и DDM в качестве детергентов. В DM белок солюбилизовался лучше, и очищенный образец имел лучший peak ratio и больший выход по сравнению с образцом с DDM. Также было изучено влияние двух вариантов добавок в солюбилизованный белок: 10 мкМ GDP с 2 мМ Mg^{2+} и 10 мкМ GTP. Образцы с добавлением GDP и Mg^{2+} были более стабильны, и доля белка, не агрегировавшего в процессе очистки, была существенно выше.

Литература

1. *Cherfils J.* Arf GTPases and their effectors: assembling multivalent membrane-binding platforms // *Curr Opin Struct Biol.* 2014. V. 29, 67.