



УДК 577.29

РАЗРАБОТКА И ОПТИМИЗАЦИЯ СОПРЯЖЕННОЙ БЕСКЛЕТОЧНОЙ СИСТЕМЫ СИНТЕЗА ТРАНСМЕМБРАННОГО ДОМЕНА РЕЦЕПТОРНОЙ ТИРОЗИНКИНАЗЫ ErbB3

© 2010 г. Н. Ф. Хабибуллина^{*,**}, Е. Н. Люкманова^{**,#}, Г. С. Копейна^{**},
З. О. Шенкарев^{**}, А. С. Арсеньев^{**}, Д. А. Долгих^{*,**,#}, М. П. Кирпичников^{*,**}

^{*}Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, ГСП-1, Воробьевы горы;

^{**}Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 09.02.2010 г. Принята к печати 15.02.2010 г.

Разработана сопряженная система бесклеточного синтеза на основе бактериального экстракта S30 из *E. coli* для продукции трансмембранного домена рецепторной тирозинкиназы человека ErbB3 (остатки с 632 по 675). Исследованы условия синтеза домена в растворимом виде в присутствии различных детергентов и в виде нерастворимого осадка трансляционной смеси. Подобраны условия очистки рекомбинантного домена, полученного с применением обоих подходов. Конечный выход целевого белка в оптимальных условиях составил 1.8–2.0 мг/мл трансляционной смеси.

Ключевые слова: сопряженная бесклеточная система синтеза; мембранные белки; тирозинкиназы.

ВВЕДЕНИЕ

По современным прогнозам, примерно половина всех мембранных белков (МБ) человека представляют собой потенциальные мишени для разработки новых лекарственных препаратов [1–3]. Несмотря на большое разнообразие и огромную практическую важность МБ, прогресс в их исследованиях затруднен [4, 5], ввиду того, что МБ обладают природной структурой только в присутствии биологической мембраны или подходящей мембраномоделирующей среды. В последнее время для продукции рекомбинантных белков все большую популярность приобретают сопряженные бесклеточные системы синтеза (СБСС) [6–10]. На сегодняшний день выходы целевых белков в этих системах достигают нескольких миллиграммов с миллилитра трансляционной смеси (ТС), что дает возможность получать белковые препараты в количествах, необходимых для биологических, биохимических и биофизических исследований. СБСС имеют несколько преимуществ перед системами, основанными на клеточной продукции [4]. Главным

преимуществом является возможность добавления в ТС различных кофакторов, ингибиторов, лигандов, способствующих синтезу белка в нативной конформации. Для продукции МБ в ТС добавляют компоненты, поддерживающие МБ в растворимой форме, такие, как мицеллы детергентов, липосомы, или липопротеиновые частицы [2, 4, 5, 11–14]. Кроме того, СБСС позволяют легко получать белки, селективно меченные по определенным аминокислотным остаткам стабильными или радиоактивными изотопами [9, 15].

Семейство рецепторов эпидермального фактора роста человека состоит из 4 трансмембранных тирозинкиназ: ErbB1, ErbB2, ErbB3, ErbB4 [16]. Эти белки содержат варибельный внеклеточный N-концевой домен, отвечающий за связывание лигандов, мембранный домен, образованный одной ТМ-спиралью, и цитоплазматическую часть, в которую входят околосмембранный домен, каталитический тирозинкиназный домен и C-концевая регуляторная область [17]. За счет взаимодействия тирозинкиназных и ТМ-доменов рецепторы семейства ErbB формируют в мембране клетки каталитически неактивные гомо- или гетеродимерные комплексы. При связывании лиганда эти димеры рецепторов подвергаются конформационным перестройкам, ведущим к активации одного из внутриклеточных тирозинкиназных доменов [18–20].

Дисфункция рецепторных тирозинкиназ, в силу их влияния на процессы клеточного роста и развития, часто является причиной злокачественной трансформации клеток [17]. Внутриклеточный ти-

Сокращения: Vrij-35 – додецилполиоксиэтилен-35; Vrij-58 – гексадецилполиоксиэтилен-58; Vrij-78 – октадецилполиоксиэтилен-78; Vrij-98 – октадецилполиоксиэтилен-98; SDS – додецилсульфат натрия; Тритон X-100 – 4-(1,1,3,3-тетраметилбутил)фенил-полиэтиленгликоль; МБ – мембранный белок; СБСС – сопряженная бесклеточная система синтеза; ТМ – трансмембранный; ТМ-ErbB3 – трансмембранный домен рецепторной тирозинкиназы ErbB3; ТС – трансляционная смесь.

[#] Авторы для связи (тел.: (495) 335-28-88; факс: (495) 330-69-83; эл. почта: ekaterina-lyukmanova@yandex.ru, dolgikh@nmr.ru).

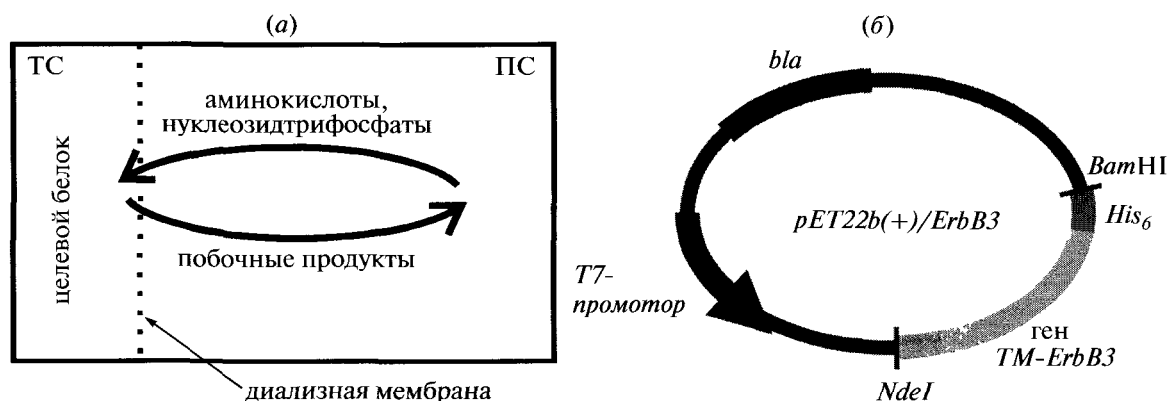


Рис. 1. Схематическое изображение устройства сопряженной бесклеточной системы синтеза диализного типа (а) и вектора *pET-22b(+)/TM-ErbB3* (б)

розинкиназный домен рецептора ErbB3 не имеет самостоятельной ферментативной активности, тем не менее, так как рецепторы этого типа могут функционировать в виде гетеродимеров с другими представителями семейства ErbB [20], структурно-функциональные исследования ТМ-домена ErbB3 представляют интерес с точки зрения создания новых биомедицинских препаратов, нацеленных на контролируемую регуляцию работы рецепторов семейства эпидермального фактора роста.

Ранее для получения трансмембранных доменов рецепторных тирозинкиназ использовали химический синтез [17, 21] и систему бактериальной экспрессии [22]. В бактериальных системах ТМ-домен рецепторной тирозинкиназы ErbB2 продуцировали в виде слитной конструкции с тиоредоксином [22]. Выделение и очистку ТМ-доменов осуществляли в несколько этапов: за очисткой гибридного белка следовал его ферментативный гидролиз, затем осуществляли очистку самого ТМ-домена [22]. Бактериальная продукция ТМ-домена ErbB3, в отличие от продукции ТМ-доменов других тирозинкиназ, оказалась малоэффективной, и выход целевого белка был недостаточен для проведения структурно-функциональных исследований этого домена (неопубликованные данные).

В данной работе для продукции ТМ-домена рецепторной тирозинкиназы человека ErbB3 (ТМ-ErbB3) опробован альтернативный путь, использующий СБСС на основе бактериального экстракта S30 из *E. coli*. В этой системе продуцировали индивидуальный ТМ-ErbB3, без использования специальных белков-партнеров. Показано, что добавление в ТС детергентов (Brij-35, Brij-58, Brij-78, Brij-98, Тритон X-100) способствует получению ТМ-домена в растворимом виде. Проведен сравнительный анализ эффективности продукции ТМ-ErbB3 в отсутствие и в присутствии различных детергентов. В найденных оптимальных условиях разработаны протоколы выделения и одноэтапной очистки целевого продукта.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оптимизация сопряженной бесклеточной системы синтеза ТМ-ErbB3. В работе использована СБСС диализного типа на основе бактериального экстракта S30 *E. coli*, в которой питающая (ПС) и трансляционная (ТС) смеси были разделены полупроницаемой мембраной (рис. 1а) [23]. В качестве матрицы использовали плазмидный вектор *pET-22b(+)/TM-ErbB3*, содержащий последовательность, кодирующую трансмембранный домен рецепторной тирозинкиназы человека ErbB3 (остатки с 632 по 675, MQTLVLIQKTHLTMALTVIAGLVVIFMMLGGTFLYWRGRRIQNKRRNNNNN) с дополнительными шестью остатками His на С-конце для последующей очистки целевого белка с помощью металл-аффинной хроматографии (рис. 1б).

Использование СБСС требует подбора оптимальных условий работы для каждого вновь полученного экстракта. При этом обычно оптимизируют концентрации ионов магния и калия, а также вектора, содержащего ген целевого белка [24]. В данной работе проводили пошаговую оптимизацию синтеза ТМ-ErbB3: сначала в диапазоне от 9 до 14 мМ оптимизировали концентрацию ацетата магния, при фиксированной концентрации калия (110 мМ) и вектора (0.2 мг/мл), затем в диапазоне от 70 до 120 мМ оптимизировали концентрацию ацетата калия при найденной оптимальной концентрации магния и концентрации вектора 0.2 мг/мл. Оптимизацию концентрации вектора *pET-22b(+)/TM-ErbB3* проводили в диапазоне от 0.1 до 0.5 мг/мл при найденных условиях по магнию и калию. В результате анализа эффективности синтеза ТМ-ErbB3 было установлено, что для полученного экстракта S30 оптимальными концентрациями ионов магния, калия и вектора являются 11 мМ, 80 мМ и 0.3 мг/мл, соответственно (рис. 2а–в).

Синтез ТМ-ErbB3 в виде осадка трансляционной смеси. Мембранные белки могут быть получены в СБСС либо в виде осадка трансляционной

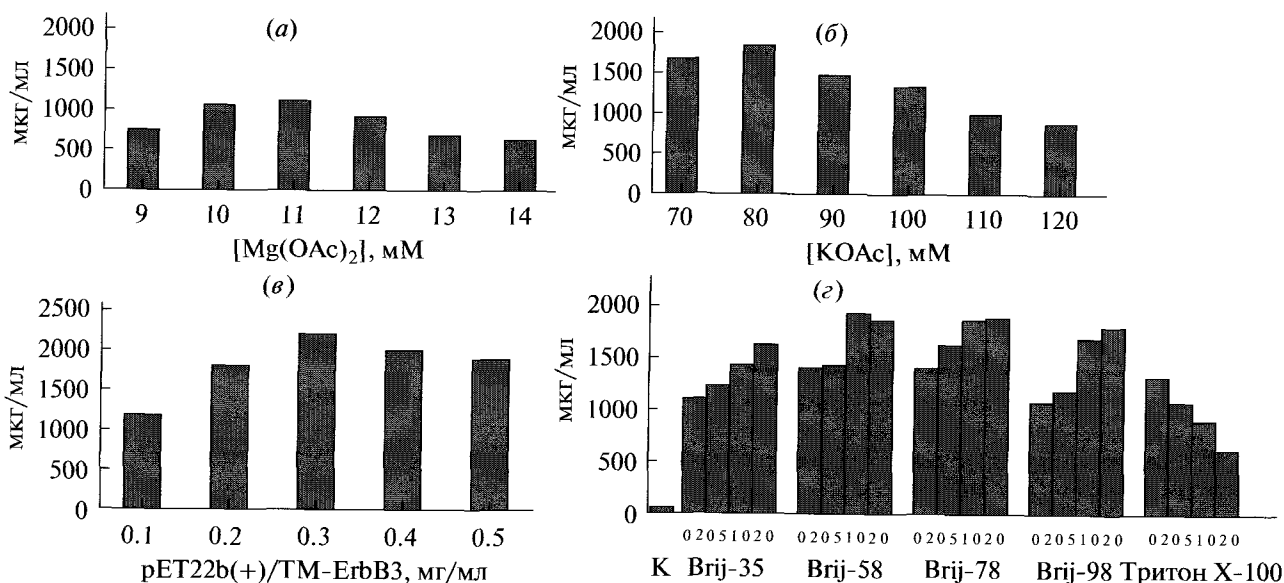


Рис. 2. Анализ эффективности синтеза общего количества ТМ-ЕrbВ3 в зависимости от концентрации ионов магния (а), ионов калия (б), вектора *pET-22b(+)/TM-ErbB3* (в), а также анализ эффективности синтеза растворимой формы ТМ-ЕrbВ3 в зависимости от концентрации детергентов Brij-35, Brij-58, Brij-78, Brij-98 и Тритона X-100 (г). Уровень синтеза растворимой формы ТМ-ЕrbВ3 в отсутствие детергентов обозначен символом «К». Каждое приведенное значение получено на основе усреднения результатов 2–3 повторных экспериментов, системная ошибка составляет не более 16%. Количественное содержание препарата ТМ-ЕrbВ3 оценивали по сравнению с количеством очищенного препарата ТМ-ЕrbВ3, синтезированного в присутствии 1% Brij-58.

смеси, либо в растворимой форме в присутствии мембраномоделирующей среды, например, мицелл детергентов. На первом этапе работы был осуществлен синтез ТМ-ЕrbВ3 в отсутствие детергентов. Было показано, что в этом случае белок накапливается в виде водонерастворимого осадка ТС (таблица). Выделение и очистку ТМ-домена осуществляли путем растворения осадка ТС в SDS и последующей металл-аффинной хроматографии в присутствии SDS (рис. 3, дорожки 1–5). Полученный препарат ТМ-ЕrbВ3 обладал высокой степенью чистоты (>95%) и не содержал высокомолекулярных агрегатов (рис. 4б). Выход целевого продукта составил ~2.0 мг/мл. Масс-спектрометрический анализ полученного препарата ТМ-ЕrbВ3 показал, что масса синтезированного белка (5972.2 Да) соответствует расчетной. Анализ препарата ТМ-ЕrbВ3, солюбилизованного в мицеллах SDS, методами КД-спектроскопии показал, что содержание спиральных элементов во вторичной структуре белка составляет примерно ~50% (рис. 4а), что хорошо согласуется с

данными, полученными ранее для других ТМ-доменов рецепторных тирозинкиназ семейства ErbB (~60%). Незначительное снижение доли спиральной структуры в случае ТМ-ЕrbВ3, видимо, связано с наличием в полученном белке дополнительного остатка метионина на N-конце и шести остатков гистидина на C-конце молекулы.

Синтез ТМ-ЕrbВ3 в растворимой форме в присутствии мицелл детергентов. Открытый характер СБСС позволяет добавлять в трансляционную смесь различные вещества и агенты, способствующие повышению растворимости синтезированных молекул [9]. В частности, неионные детергенты, которые создают искусственное мембраномоделирующее окружение, необходимое для стабилизации структуры МБ в растворе [5, 9]. Однако не все детергенты подходят для использования в СБСС [8]. Так, например, додецилфосфохолин (DPC, детергент, часто используемый для структурных исследований МБ [25–27]) зачастую ингибирует работу СБСС, что приводит к значительному снижению эффективности синтеза МБ [8]. Поэтому для продукции мем-

Растворимость ТМ-ЕrbВ3, синтезированного в отсутствие и в присутствии различных детергентов

Детергент, 1%	–	Brij-35	Brij-58	Brij-78	Brij-98	Тритон X-100
Доля растворимого ТМ-ЕrbВ3 от общего количества синтезированного домена, %	2	74	95	94	86	95

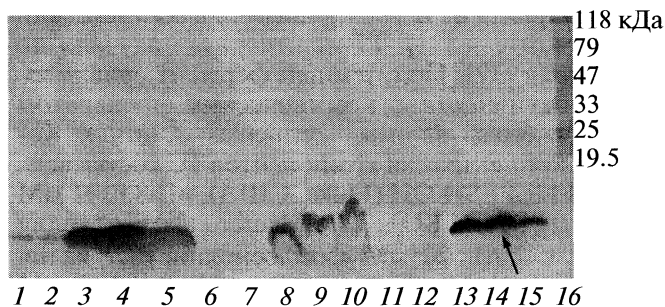


Рис. 3. Анализ с помощью иммуноблота очистки ТМ-ErbB3 из осадка ТС в присутствии 1% SDS (1–5) и очистки растворимого ТМ-ErbB3, синтезированного в присутствии 1% Brij-58, без замены детергента (6–10) и с заменой Brij-58 на SDS (11–15): – просок (1, 6, 11); промывка буфером А (2, 7, 12); элюция имидазолом 100 (3, 8, 13), 300 (4, 9, 14) и 500 мМ (5, 10, 15), 16 – маркер молекулярных масс. Препарат ТМ-ErbB3 показан стрелкой.

бренных белков в бесклеточных системах синтеза требуется тщательный подбор детергентов.

Для синтеза ТМ-ErbB3 в растворимом виде был опробован ряд неионных детергентов (Brij-35, Brij-58, Brij-78, Brij-98, Тритон X-100). Анализ эффективности синтеза белка показал, что добавление детергентов значительно повышает долю ТМ-домена, находящегося в растворимой фракции ТС (таблица, рис. 2а). При этом для детергентов Brij-35, Brij-58, Brij-78, Brij-98 было показано, что повышение концентрации детергентов с 1 до 2% не приводило к значительному повышению доли растворимого ТМ-ErbB3 (рис. 2а). Наибольший выход растворимого домена наблюдался при использовании детергентов Brij-58 и Brij-78, для которых доля растворимого белка также была максимальной (таблица). Использование детергента Тритона X-100, хотя и способствовало увеличению растворимости ТМ-ErbB3 (таблица), заметно понижало общий выход синтезированного продукта. При этом выход целевого продукта монотонно снижался при увеличении концентрации Тритона X-100 от 0.2 до 2.0% (рис. 2а).

Возможность очистки растворимого ТМ-ErbB3 исследована на примере препарата, полученного в присутствии Brij-58. Очистку осуществляли с помощью металл-аффинной хроматографии двумя способами: в присутствии Brij-58 и с заменой этого детергента в ходе хроматографии на SDS (рис. 3, дорожки 6–10 и 11–15 соответственно). Несмотря на разные протоколы очистки, полученные препараты растворимого ТМ-ErbB3 обладали схожими физико-химическими свойствами, высокой степенью чистоты и не содержали высокомолекулярных агрегатов. Выход ТМ-домена в обоих случаях составил ~ 1.8 мг/мл ТС. КД-спектры препаратов ТМ-ErbB3 в окружении мицелл Brij-58 и SDS были схожи со спектром домена, полученного из осадка ТС (данные не приводятся). Полученные дан-



Рис. 4. КД-спектр (а) и электрофоретический анализ (б) препарата ТМ-ErbB3, полученного из осадка ТС и очищенного с помощью металл-аффинной хроматографии (1 – маркер молекулярных масс, 2 – препарат ТМ-ErbB3).

ные указывают на то, что вторичная структура ТМ-ErbB3 не зависит от способа его получения.

Успешное применение детергентов типа Brij для получения ТМ-ErbB3 в растворимом виде хорошо согласуется с результатами других исследований. Так, ранее эти детергенты применяли для продукции в СБСС ряда G-белок-сопряженных рецепторов [4, 8, 28]. В этих работах продемонстрирован успешный синтез вазопрессиновых рецепторов второго типа свиньи и человека, а также эндотелинового рецептора типа Б человека с выходами 6 мг/мл ТС для рецептора свиньи и 3 мг/мл ТС для рецепторов человека в присутствии Brij-58 и Brij-78 с концентрациями 2 и 1% соответственно. Для *b* субъединицы F₁F₀ АТФ-синтетазы *E. coli* показано, что наибольший выход белка в растворимом виде (0.6 мг/мл) также наблюдался в присутствии Brij-58 и Brij-78 [29]. При этом Тритон X-100 и дигитонин оказывали значительно более слабый эффект на повышение растворимости белка, а применение детергента Твин-20 вообще не способствовало растворимости *b* субъединицы F₁F₀ АТФ-синтетазы *E. coli* [30]. Следует отметить, что детергент Тритон X-100 ранее применялся для синтеза мембранного белка Тsx, переносчика нуклеозидов наружной мембраны *E. coli* [8]. Добавление 0.1% детергента Тритона X-100 позволило получить Тsx в растворимом виде с выходом 1 мг/мл ТС [8]. Однако при дальнейшем увеличении концентрации детергента наблюдалось падение уровня синтезированного белка. Эти результаты хорошо согласуются с данными, полученными в настоящей работе.

Таким образом, нами разработана высокоэффективная система бесклеточного синтеза трансмем-

бранного домена рецепторной тирозинкиназы человека ErbB3. Опробованы различные подходы для продукции этого белка. Показано, что ТМ-ErbB3 можно получать с примерно одинаковой эффективностью как в виде осадка ТС, так и в растворимом виде в присутствии ряда детергентов. Сравнение с помощью электрофореза, масс-спектрометрии и КД-спектроскопии очищенных препаратов ТМ-ErbB3, полученных разными способами, не выявило каких-либо существенных отличий в физико-химических свойствах полученного белка. Это указывает на то, что оба подхода равнозначно могут быть использованы для продукции ТМ доменов мембранных белков. Разработанная система открывает новые возможности для структурно-функциональных исследований ТМ-ErbB3.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение плазмиды для бесклеточного синтеза ТМ-ErbB3. Ген, кодирующий ТМ-ErbB3, был извлечен из ранее разработанной конструкции для бактериальной экспрессии в *E. coli* методом ПЦР с помощью олигонуклеотидов (5'–3'): CGCGCATATGCA-GACCCTGGTTCTGAT и GCGGGATCCTTAC-TAGTGATGGTGGTGATGGTG ACGTTTGT. Далее ген, кодирующий ТМ-ErbB3, был клонирован в коммерческий вектор *pET-22b(+)* (Novagen, США) по сайтам рестрикции NdeI и BamHI. Полученный вектор получил название *pET-22b(+)/TM-ErbB3*.

Наработка плазмиды *pET-22b(+)/TM-ErbB3* в препаративных количествах. Для дальнейшей работы плазмиду *pET-22b(+)/TM-ErbB3* нарабатывали в 0.6–0.8 л питательной среды LB, содержащей ампициллин с концентрацией 100 мкг/л. Выделение и очистку плазмиды проводили с помощью набора Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Германия). После выделения по протоколу фирмы-производителя проводили фенольную депротейнизацию плазмиды, добавляя 1 объем смеси фенол–хлороформ–изоамиловый спирт (25 : 24 : 1) от объема препарата плазмиды, затем центрифугировали при 14000 об/мин в течение 10 мин. Водную фазу отбирали и обрабатывали равным объемом хлороформа, после чего центрифугировали как описано выше. Снова отбирали водную фазу и добавляли к ней 1/10 объема 3 М NaOAc pH 5.0 (Sigma, США) и 2.5 объема 96% этанола, оставляли инкубироваться в течение 1 ч при температуре –70°C. Затем центрифугировали 20 мин при 14000 об/мин и +4°C. Осадок дважды промывали 70% этанолом, а затем 96% этанолом. После этого осадок высушивали на воздухе и растворяли в воде. Концентрацию плазмидной ДНК определяли по поглощению при 260 нм.

Продукция ТМ-ErbB3 в сопряженной бесклеточной системе синтеза. Для получения бактериального экстракта S30 из *E. coli* (штамм A19) использован протокол, основанный на работах [30, 31]. Синтез в бесклеточной системе на основе

S30-экстракта из *E. coli* проводили в соответствии с протоколами [31]. Т7-полимеразу получали по протоколу [32]. Полученный фермент сравнивали по активности с коммерческим препаратом Т7-полимеразы фирмы «Fermentas» (Литва). Конечная концентрация компонентов ТС составляла: 100 мМ HEPES-KOH (Fluka, США), pH 8.0, 11 мМ Mg(OAc)₂, 80 мМ KOAc, 20 мМ ацетилфосфат калия (Sigma, США), 20 мМ фосфоенолпируват калия (Aldrich, США), набор из аминокислот (1.3 мМ каждая), за исключением Arg, Cys, Met, Trp, Asp, Glu, концентрация каждой из которых составляла 2.3 мМ [8], 0.15 мг/мл фолиевой кислоты (Sigma), 1 мМ каждый из 4-рибонуклеозидтрифосфатов, ингибитор протеиназ (X1 Complete protease inhibitor[®], Roche Diagnostics, Германия), 0.05% NaN₃, 2% полиэтиленгликоль 8000 (Sigma); 0.3 ед./мкл ингибитора рибонуклеаз RiboLock (Fermentas, Литва), 0.04 мг/мл пируваткиназы (Fermentas, Литва), 5.5 мкг/мл Т7-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 смеси экстракта S30 из *E. coli*.

Для синтеза ТМ-ErbB3 в растворимой форме в ТС добавляли детергенты Brij-35, Brij-58, Brij-78, Brij-98, Тритон X-100 (Sigma, США) до конечной весовой концентрации 1%. Питающая смесь имела такой же состав, как и ТС, за исключением высокомолекулярных компонентов, таких, как экстракт S30, плазмиды, ферменты, ингибитор рибонуклеаз. ТС помещали в диализный мешок объемом 1.5 мл из полупроницаемой целлюлозной мембраны (размер пор 12 кДа, Sigma, США), который погружали в ПС. Объемное соотношение ТС–ПС составляло 1 : 15. Синтез ТМ-ErbB3 осуществляли в пробирках объемом 50 мл, используя инкубатор HB-Minidizer (UVP, США) со скоростью вращения пробирок 12 об/мин. Инкубацию проводили в течение 20–22 ч при 30°C. После синтеза трансляционную смесь, содержащую ТМ-ErbB3, извлекали из диализного мешка и подвергали дальнейшим манипуляциям.

Анализ эффективности синтеза ТМ-ErbB3. Белки разделяли в 12% ПААГ в Трис-трициновой буферной системе с 0.1% SDS и переносили на нитроцеллюлозную мембрану Trans-Blot[®] Transfer Medium (Bio-Rad, США) с помощью камеры Semi-Dry Electrobloetter (BioTecMed ApS, Дания). В качестве маркера молекулярных масс использовали заранее окрашенный маркер (Prestained Protein Molecular Weight marker (19.5–118 кДа, Fermentas, Литва). Мембраны инкубировали с моноклональными антителами мыши (His-tag[®] Monoclonal antibody, Novagen, США), полученными против гексагистидинового последовательности, а затем со вторичными антителами козы (goat anti-mouse IgG alkaline phosphatase conjugate, Novagen, США), конъюгированными с пероксидазой хрена. Белковые полосы проявляли, выдерживая мембрану в течение 5 мин в растворе субстратов

BCIP/NBT (5-бromo-4-хлоро-3-индолилфосфат/нитросиний тетразол). После проявления мембрану промывали дистиллированной водой. Проявленные мембраны сканировали на планшетном сканере, полученные изображения обрабатывали с помощью программы OptiQuant версии 3.00 (Packard Instrument Company, США).

Выделение и очистка препарата TM-ErbB3. В случае, когда белок получали в виде осадка, ТС после синтеза центрифугировали в течение 15 мин при 14000 об/мин. Осадок растворяли в буфере А (20 мМ Трис-НСl, 250 мМ NaCl, 1 мМ NaN₃, рН 8.0) с добавлением 1% SDS в расчете 3 мл буфера на 1 мг белка. Далее раствор осветляли центрифугированием в течение 10 мин при 14000 об/мин. Сорбент Ni-Sepharose Fast Flow (GE Healthcare, Швеция) уравновешивали в буфере А в присутствии 1% SDS. Образец инкубировали с сорбентом в течение 1 ч при комнатной температуре, после чего смолу с иммобилизованным препаратом белка переносили в колонку PM-10 (GE Healthcare, Швеция). Колонку промывали 10 объемами буфера А, содержащим 1% SDS с добавлением 10 мМ имидазола. Элюцию белка проводили ступенчато буфером А, содержащим 1% SDS и имидазол в концентрации 100, 300 и 500 мМ.

В случае, когда белок получали в растворимой форме в присутствии Vrij-58, ТС осветляли с помощью центрифугирования в течение 10 мин при 14000 об/мин. Затем супернатант инкубировали 1 ч при комнатной температуре со смолой Ni-Sepharose Fast Flow, уравновешенной в буфере А с добавлением либо 1% Vrij-58, либо 1% SDS. Дальнейшую очистку TM-ErbB3 осуществляли так же, как в случае белка, полученного в виде осадка, проводя все манипуляции в присутствии соответствующего детергента. Концентрацию белка в полученных после хроматографии фракциях определяли спектрофотометрически по поглощению при 280 нм, используя молярный коэффициент поглощения (ϵ_{280} 6990).

Масс-спектрометрический анализ препарата TM-ErbB3. Для масс-спектрометрического анализа препарата TM-ErbB3, полученного в виде осадка ТС, осадок ТС был растворен в 70% муравьиной кислоте. Препарат TM-ErbB3, полученный в присутствии Vrij-58, был очищен с помощью металл-аффинной хроматографии и пересаживал с помощью 10% трихлоруксусной кислоты. Полученный осадок растворяли в 70% муравьиной кислоте. Масс-спектры обоих препаратов получены на времяпролетном масс-спектрометре UltraFlex TOF/TOF фирмы «Bruker Daltonics» (Германия), оснащенном источником ионизации MALDI. В линейном режиме детектировали положительно заряженные ионы.

КД-спектроскопический анализ вторичной структуры TM-ErbB3. Спектры КД получены при комнатной температуре на спектрометре J-810 (Jasco, Япония). Концентрация исследуемых белков в образцах составляла 0.05 мМ. Буфер для исследования

содержал 20 мМ Трис-НСl, 250 мМ NaCl, 1% детергента, рН 8.0. Расчет содержания элементов вторичной структуры проводился в программе Dichro Web с использованием алгоритма Contin LL.

Данная работа была выполнена в рамках реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы и при частичной финансовой поддержке Российской академии наук (программа «Клеточная и молекулярная биология»), Российского фонда фундаментальных исследований и гранта Президента РФ МК-8404.2010.4. Авторы выражают глубокую признательность Я.С. Ермолюку за предоставленный вектор, содержащий ген TM-ErbB3, а также О.В. Воронцовой за помощь в проведении экспериментов методами КД-спектроскопии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Liu J., Rost B. // *Protein Sci.* 2001. V. 10. P. 1970–1979.
2. Cappuccio J.A., Hinz A.K., Kuhn E.A., Fletcher J.E., Arroyo E.S., Henderson P.T., Blanchette C.D., Walsworth V.L., Corzett M.H., Law R.J., Pesavento J.B., Segelke B.W., Sulchek T.A., Chromy B.A., Katzen F., Peterson T., Bench G., Kudlicki W., Hoepflich P.D., Coleman M.A. // *Methods Mol. Biol.* 2009. V. 498. P. 273–296.
3. Lundstrom K. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2006. V. 63. P. 2597–2607.
4. Klammt C., Schwarz D., Löhr F., Schneider B., Dötsch V., Bernhard F. // *FEBS J.* 2006. V. 273(18). P. 4141–4153.
5. Berrier C., Park K., Abes S., Bibonne A., Betton J.-M., Ghazi A. // *Biochemistry.* 2004. V. 43. P. 12585–12591.
6. Chandra H., Srivastava S. // *Proteomics.* 2010. V. 10. P. 1–14.
7. Schneider B., Junge F., Shirokov V.A., Durst F., Schwarz D., Dötsch V., Bernhard F. // *Methods Mol. Biol.* 2010. V. 601. P. 165–186.
8. Klammt C., Schwarz D., Fendler K., Haase W., Dötsch V., Bernhard F. // *FEBS J.* 2005. V. 272. P. 6024–6038.
9. Sobhanifar S., Reckel S., Friederike J., Schwarz D., Kai L., Karbyshev M., Löhr F., Bernhard F., Dötsch V. // *J. Biomol. NMR.* 2009. V. 46. P. 33–43.
10. Shirokov V.A., Kommer A., Kolb V.A., Spirin A.S. // *Methods Mol. Biol.* 2007. V. 375. P. 19–55.
11. Shimono K., Goto M., Kikukawa T., Miyauchi S., Shirouzu M., Kamo N., Yokoyama S. // *Protein Sci.* 2009. V. 18(10). P. 2160–2171.
12. Kalmbach R., Chizhov I., Schumacher M.C., Friedrich T., Bamberg E., Engelhard M. // *J. Mol. Biol.* 2007. V. 371(3). P. 639–648.
13. Katzen F., Fletcher J.E., Yang J.P., Kang D., Peterson T.C., Cappuccio J.A., Blanchette C.D., Sulchek T., Chromy B.A., Hoepflich P.D., Coleman M.A., Kudlicki W. // *J. Proteome Res.* 2008. V. 7(8). P. 3535–3542.
14. Cappuccio J.A., Blanchette C.D., Sulchek T.A., Arroyo E.S., Kralj J.M., Hinz A.K., Kuhn E.A.,

- Chromy B.A., Segelke B.W., Rothschild K.J., Fletcher J.E., Katzen F., Peterson T.C., Kudlicki W.A., Bench G., Hoepflich P.D., Coleman M.A.* // *Mol. Cell Proteomics*. 2008. V. 7(11). P. 2246–2253.
15. *Ichihara Y., Sogawa K., Takahashi K.* // *J. Biochem*. 1985. V. 98(2). P. 483–492.
16. *Baulida J., Kraus M.H., Alimandi M., Di Fiore P.P., Carpenter G.* // *J. Biol. Chem*. 1996. V. 271. P. 5251–5257.
17. *Bennasroune A., Fickova M., Gardin A., Dirrig-Grosch S., Aunis D, Crémel G., Hubert P.* // *Mol. Biol. Cell*. 2004. V. 15. P. 3464–3474.
18. *Sweeney C., Carraway III K.L.* // *British J. Cancer*. 2004. V. 90. P. 289–293.
19. *Tanner K.G., Kyte J.* // *J. Biol. Chem*. 1999. V. 274(50). P. 35985–35990.
20. *Sorkin A., Goh L.K.* // *Exp. Cell Res*. 2008. V. 314(17). P. 3093–3106.
21. *Duneau J., Vegh A., Sturgis J.* // *Biochemistry*. 2007. V. 46. P. 2010–2019.
22. *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(11). P. 6950–6956.
23. *Kim D.-M., Choi C.-Y.* // *Biotechnol. Prog*. 1996. V. 12. P. 645–649.
24. *Klammt C., Schwarz D., Dötsch V., Bernhard F.* // *Meth. Mol. Biol*. 2007. V. 375. P. 57–78.
25. *Franzin C.M., Gong X.M., Thai K., Yu J., Marassi F.M.* // *Methods*. 2007. V. 41. P. 398–408.
26. *Hwang P.M., Kay L.E.* // *Methods Enzymol*. 2005. V. 394. P. 335–350.
27. *Shenkarev Z.O., Paramonov A.S., Lyukmanova E.N., Shingarova L.N., Yakimov S.A., Dubinny M., Chupin V.V., Kirpichnikov M.P., Blommers M.J.J., Arseniev A.S.* // *J. Am. Chem. Soc*. 2010. V. 132. P. 5630–5637.
28. *Klammt C., Schwarz D., Eifler N., Engel A., Piehler J., Haase W., Hahn S., Dötsch V., Bernhard F.* // *J. Struct. Biol*. 2007. V. 158. P. 482–493.
29. *Lian J., Ma Y., Cai J., Wu M., Wang J., Wang X., Xu Z.* // *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2009. V. 85. P. 303–311.
30. *Zubay G.* // *Annu. Rev. Genet*. 1973. P. 7267–7287.
31. *Spirin A.S., Swartz J.R.* // *Weinheim [Germany]: Wiley-VCH*, 2008.
32. *Li Y., Wang E., Wang Y.* // *Prot. Exp. Purif*. 1999. V. 16. P. 355–358.

The Development and Optimization of Coupled Cell-Free Expression System for Production of the Transmembrane Domain of the Receptor Tyrosine Kinase ErbB3

N. F. Khabibullina^{a,b}, E. N. Lyukmanova^{b,*}, G. S. Kopeina^b, Z. O. Shenkarev^b,
A. S. Arseniev^b, D. A. Dolgikh^{a,b,*}, M. P. Kirpichnikov^{a,b}

*Phone: +7 (495) 335-28-88; fax: +7 (495) 330-69-83;

e-mail: ekaterina-lyukmanova@yandex.ru, dolgikh@nmr.ru

^a Lomonosov Moscow State University, 119991, Moscow, GSP-1, Vorob'evy gory

^b Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, 117997 Moscow, ul. Miklukho–Maklaya 16/10

The cell-free expression system based on bacterial extract S30 from *E. coli* for production of the transmembrane domain of human receptor tyrosine kinase ErbB3 (residues 632–675) was developed. The synthesis of the domain in the soluble form in the presence of detergents and in the form of the translation mixture precipitate was studied. The protocols of purification of the recombinant domain obtained by both methods were developed. The final yield of target protein in optimal conditions was 1.8–2.0 mg per 1 ml of translation mixture.

Key words: cell-free expression system, membrane proteins, tyrosine kinases