

*На правах рукописи*

Карбышев Михаил Сергеевич

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА  
ВОЛЬТ-СЕНСОРНОГО ДОМЕНА КАЛИЕВОГО КАНАЛА KvAP И  
к-ТЕРАФОТОКСИНА-Gr3a ПОЛУЧЕННЫХ В БЕСКЛЕТОЧНЫХ  
БЕЛОКСИНТЕЗИРУЮЩИХ СИСТЕМАХ**

03.01.04 – биохимия

**Автореферат**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

**Новосибирск – 2014**

Работа выполнена в Институте биофизической химии при Университете им. И.В. Гёте (Франкфурт на Майне, ФРГ) и ФГБУ «НИИ онкологии» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук (г. Томск).

**Научные руководители:**

доктор биологических наук,  
профессор

Чердынцева Надежда Викторовна

доктор химических наук,  
профессор

Дойч Волькер

**Официальные оппоненты:**

Карпенко Лариса Ивановна, доктор биологических наук, заведующая лабораторией рекомбинантных вакцин ФБУН ГНЦ ВБ "Вектор"

Рябченко Александр Владимирович, кандидат биологических наук, с.н.с. лаборатории молекулярных механизмов межклеточных взаимодействий ФГБУ "НИИ биохимии" СО РАМН

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт фармакологии» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук (г. Томск).

Защита состоится «25» июня 2014 г. в \_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 001.034.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт биохимии» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук по адресу: 630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте <http://niibch.ru/> ФГБУ «НИИ биохимии» СО РАМН

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2014 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета

Русских Галина Сергеевна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность исследования.** Интегральные мембранные белки (МБ) являются одним из наиболее широко представленных классов клеточных белков и кодируются 20-30% от общего числа рамок считывания в геноме клетки [Wallin and Von Heijne, 1998]. Они являются ключевыми звеньями в приеме и передаче различного рода сигналов, как внутри клетки, так и вне ее, что, безусловно, делает данную группу протеинов весьма привлекательными мишенями для разработки новых фармацевтических препаратов. В настоящее время более 50% лекарственных препаратов направлено на взаимодействие с G-белок ассоциированными рецепторами, ионными каналами и транспортными белками – макромолекулами, относящимися к данному классу [Russell et al., 2000].

В частности, было показано, что потенциалуправляемые ионные каналы играют важную роль в процессах пролиферации опухолевых клеток, трансформации и малигнизации опухолей молочной железы, простаты, кишечника и др. [Anderson et al., 2003, Brevet et al., 2008, Laniado et al., 2001, Preussat et al., 2003, Jang et al., 2009]. Изучение терапевтического потенциала полипептидных ингибиторов, например, пептидных токсинов пауков, скорпионов, змей может сыграть ключевую роль в направленном изменении функционирования калиевых каналов [Vecchetti, 2010]. Эти пептиды, обладая высокой селективностью и аффинностью к определенной мишени, могут быть использованы для анализа физиологической роли  $K^+$  каналов в различных типах нормальных и опухолевых тканей, а также служить платформой для разработки лекарственных препаратов [Escoubas and King, 2009, King, 2011].

Сложности, связанные со сравнительно невысокой копийностью, а также несовершенством современных методов выделения и очистки МБ из природных источников, являются основными причинами пробелов в структурно-функциональной характеристике последних [Lundstrom et al. 2009]. Гетерологичные (клеточные) системы экспрессии способные совершить прорыв в области структурного анализа разрабатываются десятилетиями, однако не могут быть применены универсально для всех типов интегральных мембранных белков, несмотря на определенные успехи последних лет в этой области [Lancaster et al., 1999, Luecke et al., 2001, Stroebel et al., 2003]. По-прежнему, наиболее критическим параметром для структурных исследований макромолекул является получение миллиграммовых количеств высокочистых, гомогенных и стабильных препаратов целевого белка.

Весьма богатым потенциалом для решения насущных задач структурной биохимии мембранных белков обладают системы бесклеточного синтеза протеинов (СБСП) сопряженного типа [Berrier et al., 2004, Elbaz et al., 2004, Klammt et al., 2004, Kai et al., 2011]. Совершенствование данного методического подхода, произошедшее в последние годы, позволило достичь препаративных выходов белков-мишеней, до нескольких миллиграммов с миллилитра

реакционной смеси (РС), что является весьма серьезным шагом, позволяющим осуществлять дальнейший анализ макромолекул с применением широкого арсенала биохимических и биофизических методов [Chen et al., 2007, Deniaud et al., 2010, Nguyen et al., 2010]. Следует отметить ряд преимуществ, которыми обладают СБСП по сравнению с конвенционными гетерологичными системами экспрессии МБ (как про-, так и эукариотическими): открытость (существует возможность вносить детергенты, кофакторы и лиганды непосредственно в реакционную смесь - РС) [Katzen et al., 2006], направленность синтеза (можно осуществлять наработку лишь одного белка-мишени или проводить ко-экспрессию генов различных доменов макромолекулярного ансамбля) [Ma et al., 2011], метаболическое мечение (используя флуоресцентно- или изотопно-меченные смеси аминокислот, можно получать полипептиды с необходимыми свойствами) [Klammt et al., 2005, Schwarz et al., 2007, Sobhanifar et al., 2010].

Оптимизация существующих и разработка новых высокопродуктивных СБСП является одной из наиболее значимых задач для структурной биохимии, биотехнологии и фармакологии.

**Цель исследования:** оптимизация условий препаративного получения модельного мембранного белка и его лиганда (пептидного токсина) в бесклеточной белоксинтезирующей системе на основе S30 экстракта полученного из клеток *E. coli* для последующей структурно-функциональной характеристики. Работы проводились с использованием следующих модельных полипептидов:

- вольт-сенсорный домен потенциал-управляемого калиевого канала, KvAP, изолированный из археобактерии *Aeropyrum pernix* (ВСД-KvAP). Рекомбинантный ВСД-KvAP, представляет собой структурный гомолог функционально-сходных доменов потенциал-активируемых калиевых каналов млекопитающих. Изучаемый фрагмент, M14-K159, состоит из четырех трансмембранных сегментов, соединенных растворимыми внеклеточными и внутриклеточными петлями.

- пептидный токсин, каппа-терафотоксин-Gr3a (VSTX1) – специфический ингибитор ионного канала KvAP. Токсин, выделенный из яда паука *Grammostola spatulata*, является коротким полипептидом с молекулярной массой около 4 кДа, пространственная структура которого представлена двумя антипараллельными  $\beta$ -тяжами, стабилизированными тремя дисульфидными связями.

**Задачи исследования:**

1. Оптимизация параметров бесклеточной системы экспрессии на основе S30 экстракта из *E. coli* для получения модельных полипептидов (ВСД-KvAP и VSTX1) в препаративных количествах.
2. Оптимизация условий выделения и очистки исследуемых полипептидов для обеспечения корректного сворачивания.
3. Исследование физико-химических свойств полученных модельных полипептидов.

4. Получение и анализ образцов селективно- и/или тотально изотопно-меченых модельных белков в бактериальной бесклеточной системе для структурных исследований методом ЯМР-спектроскопии.

**Научная новизна.** Разработан оптимизированный комплексный методологический подход для препаративного получения мембранных белков и их пептидных ингибиторов с применением бесклеточной белоксинтезирующей системы. Проведенное исследование структуры полученных изотопно-меченых препаратов ВСД-KvAP и VSTX1 позволило дополнить существующую информацию о строении указанных макромолекул.

**Теоретическая и практическая значимость.** Выполнен анализ физико-химических свойств полученных препаратов ВСД-KvAP и каппа-TRTX-Gr3a, который подтвердил возможность формирования в данной экспрессионной системе структуры макромолекул близкой к нативной. Показанное ранее формирование корректной укладки полипептидных цепей белков-мишеней было подтверждено методом спектроскопии ядерного магнитного резонанса на селективно меченных по  $^{15}\text{N}$ -Ала, Гли, Сер, Трп (для ВСД-KvAP) и  $^{15}\text{N}$ -Цис (для каппа-терафотоксина-Gr3a) и тотально меченных по  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ -меченных образцах. Разработан метод тройного селективного комбинаторного мечения.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Оптимизация СБСП способствует возрастанию продукции модельных полипептидов.
2. Оптимизация методики выделения и очистки полипептидов обеспечивает получение препаратов достаточной чистоты и стабильности для физико-химической характеристики.
3. Метод тройного селективного мечения с различными комбинациями меченых аминокислот позволяет осуществлять соотношение полученных ЯМР-сигналов для 95% аминокислотных остатков МБ, с использованием всего 3 образцов.
4. Полученные по данным ЯМР-спектроскопии, значения химических сдвигов для различных типов атомов в исследуемых образцах, позволяет установить *in silico* степень сходства с решенными ранее структурами.
5. Полученные в СБСП модельные полипептиды способны селективно взаимодействовать и формировать комплексы.

**Апробация работы.** Основные материалы диссертационной работы были доложены и обсуждены на совместной конференции Германского общества биохимии и молекулярной биологии (секция Биомембранология) и Германского общества экспериментальной и клинической фармакологии и токсикологии (Раушхольцхаузен, Германия, 2008); симпозиуме Crystallization and Cell-Free Production of Membrane Proteins (Рингберг на Тегрензее, Германия, 2010); симпозиуме SFB 35-Transmembrane Transporters in Health and Disease (Вена, Австрия, 2010); конференции “Euromar” (Франкфурт на Майне, Германия, 2011).

**Личный вклад автора** состоит в выполнении экспериментальных и теоретических исследований. Основные результаты данной работы получены при непосредственном участии автора на этапе дизайна и проведения экспериментов.

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 6 работ, из них 2 – в зарубежных рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ; 1 – глава в зарубежной монографии; 3 – тезисы международных конференций.

**Соавторство и благодарности.** Автор выражает глубокую благодарность д-ру Ф. Лёру (Департамент структурной биологии и жидкостной ЯМР-спектроскопии, Университет им. И.В. Гёте, ФРГ) и д-ру Н. Абдул-Маннан (Департамент структурной биологии, компании «Vertex Pharmaceuticals Inc.», США) за неоценимую помощь в проведении экспериментов и анализе данных, к.х.н. Фешину Д.Б (Отдел химии белка, МБЦ «Генериум», РФ) за ценное обсуждение.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 123 страницах машинописного текста и состоит из введения, 3 глав (обзор литературы, материал и методы исследования, результаты исследований и их обсуждение), выводов и списка литературы, включающего 244 источников. Работа иллюстрирована 4 таблицами и 23 рисунками.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Создание экспрессионных векторов.** Последовательность ДНК, кодирующая вольт-сенсорный домен KvAP (длиной 474 п.н.), была амплифицирована с помощью ПЦР из вектора pQE60/KvAP (Met 14- Про 258). Полученный ген был клонирован в плазмидный вектор pET-21a (Novagen, США) по сайтам рестрикции *Bam*HI и *Xho*I, которые были введены в последовательность с праймерами 5'-cggagatctatggccagggttaggag и 3'-cggctcgagttgtccgcagcatccg. Таким образом, создан вектор для бесклеточной экспрессии ВСД-KvAP – pET-21a/KvAP-VSD. Полученный вектор был использован в качестве матрицы для амплификации линейных фрагментов ДНК с использованием праймеров - 5'- gatcgagatctcgatcccgcg (P1) и 3'-ggatatagttcctcctttcagc (P4). Последовательность ДНК, кодирующая пептидный токсин VSTX1 (длиной 102 п.н.), была амплифицирована с помощью ПЦР из вектора pBUF5.1/VSTX1. Полученный ген был клонирован в плазмидный вектор pET32a (Novagen, США) по сайтам рестрикции *Bam*HI и *Xho*I, которые были введены в последовательность с использованием праймеров 5'-cgaggatccgaatgcggtaaatttatgtggaatgc и 3'- gcgctcgagtcaaaacgggctggctaacagc. Таким образом, был создан вектор для бесклеточной экспрессии каппа-TRTX-Gr3a – pET-32a/VSTX1.

**Бесклеточная экспрессия.** Постановка реакций в аналитическом формате осуществлялась в камерах «Slide-A-Lyzer mini» (Thermo Scientific, США) 55 мкл, в препаративном в «Slide-A-Lyzer» 0,5-3 мл. Соотношение РС к питающей

смеси (ПС) было определено, как 1:17. Оптимизированная экспрессия проводилась как описано ранее [Kai et al., 2012]. Для синтеза ВСД-KvAP в растворенном виде, к РС и ПС добавляли детергенты (Sigma, ФРГ). Для синтеза TRX-VSTX1 в растворенном виде, к РС и ПС добавляли DsbC (Prospec-Tany Tech.Ltd., США), IAM, GSH и GSSG (AppliChem, ФРГ).

**Количественное определение белка.** Прямую оценку продукции белков осадке СБСП осуществляли путем замещения L-метионина на 50 нМ  $^{35}\text{S}$ -Мет, включение метки в анализировали на многофункциональном сцинтилляционном счетчике LS 6500 (Beckmann, ФРГ). Концентрация белка в исследуемых препаратах была установлена микрометодом с бицинониновой кислотой набором «BCA assay kit» (Pierce, США).

**Рефолдинг белков из осадка СБСП.** Образцы, полученные в ходе экспрессии, центрифугировали при 13000g в течение 10 мин при 4°C для получения осадка, который ресуспендировали в буфере (50 мМ Трис-НСl, 2 мМ ДТТ, 150 мМ NaCl, pH 7,0) содержащем выбранный детергент (5% ДМ, 5% ДДМ, 5%ДФХ, 2% ДСН) и инкубировали на термощейкере при 30°C. Повторяли процедуру осаждения центрифугированием, супернатант и осадок анализировали методом электрофореза (ЭФ).

**Электрофорез и иммуоблоттинг.** ЭФ препаратов осуществляли в 12% или 16% трицин-ДСН-ПААГ. Гели окрашивали раствором Кумасси голубого R-250. Электроперенос реплики геля осуществляли на поливинилденфторидную (PVDF) мембрану «Immobilon P» (Millipore, США). Для иммунодетекции гистидинового тега использовали пероксидазные конъюгаты мАТ мыши (Roche, ФРГ) в разведении 1:4000, для Т7-тега использовали пероксидазные конъюгаты пАТ козы (Abcam, Великобритания) в разведении 1:2500, для VSTX1 использовали пероксидазные конъюгаты пАТ кролика (Vertex Pharmaceuticals Inc., США) в разведении 1:500.

**Металл-хелатная аффинная хроматография.** Полученный в ходе бесклеточного синтеза осадок ресуспендировали в буфере А (20 мМ Трис-НСl, 300 мМ NaCl, 15 мМ имидазола, 2 мМ ДТТ, pH 7,5), содержащем для очистки ВСД-KvAP - 2%ДФХ (Anatrace, США). Иммобилизацию исследуемых полипептидов проводили на сорбенте Ni-NTA (Qiagen, ФРГ), удаление неспецифических примесей проводили буфером А с 50 мМ имидазола. Элюцию целевых белков осуществляли 20 мМ Трис-НСl, 300 мМ NaCl, 300 мМ имидазола, 2 мМ ДТТ, pH 8,0 с 0,75%  $\beta$ -ОГ в случае ВСД-KvAP.

**Гель-проникающая хроматография.** Использовали хроматографическую систему АКТА Explorer 100 (GE Healthcare, США). Исследуемые образцы наносили на колонну Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare, США) уравновешенную буфером (20 мМ Трис-НСl, 150 мМ NaCl и 0,75%  $\beta$ -ОГ или 0,05% ДДМ, pH 7.2).

**Протеолитическое расщепление.** Полученный в ходе бесклеточного синтеза слитый белок TRX-VSTX1 после предварительной очистки на сорбенте Ni-NTA (Qiagen, ФРГ), переводили в буфер для протеолиза (50 мМ Трис-НСl,

pH 8,0, 5 mM NaCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>). К полученному раствору добавляли энтерокиназу (Roche, ФРГ) и инкубировали 48 часов при 27°C.

**Обращено-фазовая ВЭЖХ.** Использовали ВЭЖХ систему Alliance HPLC (Waters, США). Раствор белка, содержащий расщепленные фрагменты слитого белка TRX-VSTX1, наносили на C18 ОФ-ВЭЖХ колонну (10x 100 мм, Phenomenex, США) уравновешенную 0,01% CF<sub>3</sub>COOH (буфер А). Элюцию белков осуществляли восходящим градиентом CH<sub>3</sub>CN в буфере А (0–26% в течение 30 мин и 26–64% в течение 5 мин).

**КД-спектрополяриметрия.** Исследуемые образцы находились в 20 mM калий фосфатном буфере, pH 7,05. Эксперименты проводили на спектрополяриметре J-810 (Jasco, Япония) при 25°C. Расчет содержания элементов вторичной структуры проводился в программе Dichro Web с использованием алгоритма Contin LL.

**ЯМР-спектроскопия.** Регистрацию ЯМР-спектров выполняли на спектрометре Bruker Avance 600 с рабочей частотой по протонам 600 МГц, оборудованном криогенным зондом. Запись спектров ВСД-КvAP осуществляли при 323 К, запись спектров VSTX1 осуществляли при 288 К. Соотнесение сигналов проводилось на основании гетероядерных спектров <sup>15</sup>N-TROSY-HSQC, <sup>15</sup>N-NOESY-HSQC, HNCO, HNCOSA, HNCA, HCCH-TOCSY, COHNCA, 3D BEST-[<sup>15</sup>N,<sup>1</sup>H]-TROSY-HNCA, BEST-[<sup>15</sup>N,<sup>1</sup>H]-TROSY-HN(CO)CA. Получение и первичный анализ спектров выполняли в программе TopSpin 3.0 (Bruker, ФРГ), соотнесение сигналов проводили в программе Sparky 3.2 (UCSF, США).

**Сравнительный анализ химических сдвигов.** Определение значений химических сдвигов, в исследуемых образцах, для различных типов атомов: <sup>1</sup>H<sup>N</sup>, <sup>15</sup>N, <sup>13</sup>C<sup>γ</sup>, <sup>13</sup>C<sup>α</sup>, <sup>13</sup>C<sup>β</sup> было проведено в программе SHIFTX2. Оценку сходства полученных значений выполняли независимо для каждого типа атомов, используя коэффициент корреляции Пирсона (r). Расчёты выполнялись в программе Statistica 6.

**Пулл-даун анализ взаимодействия ВСД-КvAP и VSTX1.** Растворенные в присутствии ДФХ образцы МБ (ВСД-КvAP или DТehА) были иммобилизованы на сорбенте Ni-NTA (Qiagen, ФРГ), уравновешенном буфером А с 15 mM имидазола. Вносили VSTX1 и доводили концентрацию детергента до 1,25 %. Контейнеры с образцами инкубировали на орбитальном шейкере при 4°C. Сорбент переносили в колонки Mini Bio-Spin (Bio-Rad, США), последовательно промывали 10 колоночными объемами (CV) буфера А. Элюцию вели буфером Б (50 mM Трис-НСl, 300 mM NaCl, 300 mM имидазола, 1 % β-ОГ, pH 7,1) отбирая фракции равные 1 CV. Собранные фракции анализировали методом ЭФ в 16% трицин-ДСН-ПААГ с последующим иммуноблоттингом.



## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Получение модельных полипептидов в бесклеточной системе экспрессии на основе S30 экстракта из *E. coli*

**Дизайн ДНК матриц.** Для сборки экспрессионной конструкции в случае ВСД-KvAP был использован модифицированный вектор pET-21a-SHX, в который была клонирована целевая последовательность кДНК по сайтам рестрикции *Bam*HI и *Xho*I и находилась в рамке считывания под контролем сильного промотора T7. Данный вектор был выбран ввиду возможности присоединения к 3'-концу гена ВСД-KvAP нуклеотидной последовательности, кодирующей декагистидиновый тег (Рис. 2). Комбинация тегов (N-концевой T7-тег и C-концевой His-тег), обеспечивает прочное связывание с сорбентом и позволяет подтвердить получение полноразмерного полипептида в СБСП с помощью иммуноблоттинга со специфическими антителами.

Создание экспрессионной конструкции для наработки пептидного токсина базировалось на использовании вектора pET-32a, в который целевая последовательность кДНК была клонирована по сайтам рестрикции *Bam*HI и *Xho*I. Данный вектор, был выбран ввиду возможности присоединения к 5'-концу гена VSTX1 нуклеотидной последовательности, кодирующей тиоредоксин (TRX), гексагистидиновый тег и сайт распознавания энтерокиназы (Рис. 2).

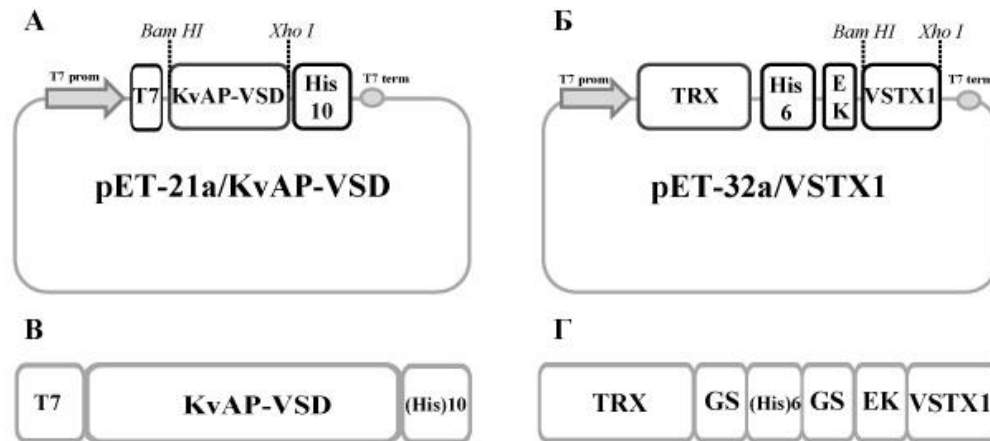


Рис. 2. Экспрессионные вектора pET-21a/KvAP-VSD (А) и pET-32a/VSTX1 (Б) и синтезируемые полипептидные продукты ВСД-KvAP (В) и TRX-VSTX1(Г).  
Примечание: T7 prom – T7 промотор; T7 ter – T7 терминатор; T7- T7-тег; TRX – тиоредоксин; GS – линкер; (His)*n* - гексагистидиновый тег; EK – сайт распознавания энтерокиназы.

Наличие в слитом белке TRX-VSTX1 сайта расщепления энтерокиназы позволяет осуществлять отщепление растворимого VSTX1 непосредственно в

ходе синтеза, либо после иммобилизации на аффинном сорбенте для метал-хелатной хроматографии.

В качестве альтернативы использованию плДНК, особенно для осуществления высокопроизводительного скрининга *in vitro*, все более широкое применение находят линейные ПЦР матрицы [Kralicek et al., 2011]. В данной работе для наработки линейных матриц была использована стратегия быстрой вариации тегов для СБСП заключающаяся в добавлении к 5'-концу коротких АТ-богатых последовательностей [Haberstock et al., 2012]. Данный подход заключается в получении ДНК матрицы путем объединения нескольких ПЦР-продуктов в один общий, посредством перекрывающейся ПЦР и введения в нее сайта для пост-трансляционного отщепления тега PreScission протеазой.

Данным методом получено несколько вариантов линейных ДНК матриц и осуществить синтез ВСД-КvАР с них для сравнения эффекта модификации 5'-конца мРНК (Рис. 4). Выбор сайта перекрывания (участок распознавания PreScission протеазы) был обусловлен тем, что отщепление тега от МБ может производиться в присутствии детергента.

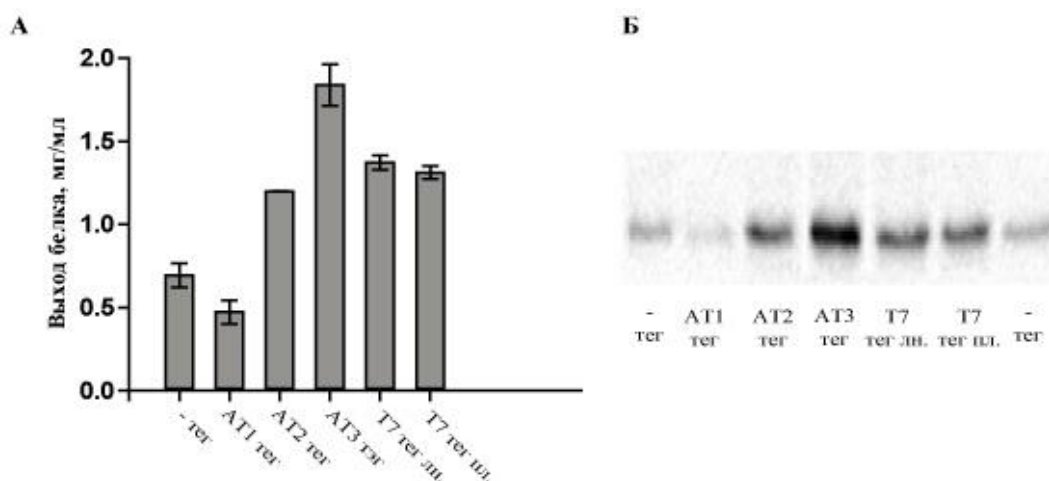


Рис. 4. Сравнение уровней экспрессии ВСД-КvАР с 5'-модифицированных линейных ДНК матриц в РС (А) и в иммуноблоте (Б).

Примечание: - тег – отсутствие тега; АТ1-3 – различные АТ-теги; Т7 тег лн. – линейная ДНК матрица с Т7 тегом, Т7 тег пл. – плДНК матрица с Т7 тегом

Таким образом, в результате проведенного поиска был выбран АТ3 тег, позволивший довести уровень экспрессии до 1,8-2,0 мг/мл, что было достаточно для осуществления дальнейшей структурно-функциональной характеристики целевого белка.

**Получение S30 экстракта из *E. coli*.** Для получения клеточных экстрактов были использованы штаммы *E. coli* A19 (*E. coli* Genetic stock center) и SHuffle (NEB, США). Каждый из штаммов выбран исходя из особенностей стратегии наработки конкретного белка-мишени в СБСП. Для получения экстракта при наработке ВСД-КvАР использовался штамм А19, обладающий генетической

модификацией *ΔrecBCD::Plac-red-kan* обуславливающей замену в клетках *E. coli* рекомбиназной системы *RecBCD* на *exo* и *beta* гены бактериофага  $\lambda$  [Michel-Reydellet et al., 2005]. Эта модификация оказывает значительное стабилизирующее влияние на линейные ДНК матрицы, и позволяет достигать выхода целевого белка сравнимого с выходом при использовании пДНК.

Для продукции TRX-VSTX1 был использован S30 экстракт из штамма Shuffle, специально разработанного для эффективного формирования дисульфидных связей при цитоплазматической экспрессии. Это происходит благодаря конститутивной экспрессии хромосомной копии изомеразы дисульфидной связи DsbC [Bessette et al., 1999, Nozach et al., 2013]. Также данная изомераза способна выступать в роли шаперона, способствуя корректному сворачиванию белков, не содержащих дисульфидных связей [Chen et al., 1999].

**Влияние концентрации ионов  $Mg^{2+}$  и  $K^+$ .** Варьирование концентрации катионов в СБСП оказывает серьезное воздействие на продукцию целевого белка, ввиду вклада ионов магния в протекание многих биологических реакций (в которые вовлечены нуклеотиды) и калия поддерживающего осмотический и кислотно-основной гомеостаз в клетке. Корреляционный поиск проводили путем попарной вариации  $[Mg^{2+}]$  и  $[K^+]$  ионов в системе, результаты которого представлены на Рис. 5.

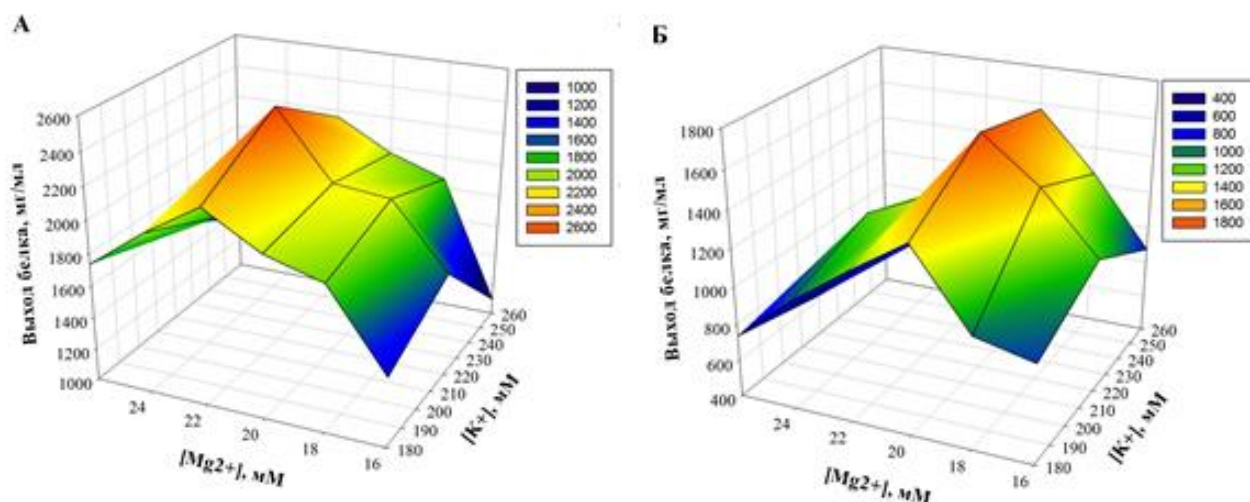


Рис. 5. Корреляционный поиск  $[Mg^{2+}]$  и  $[K^+]$  ионов в СБСП для оптимизации продукции ВСД-KvAP (А) и TRX-VSTX (Б).

В результате проведённых экспериментов по оптимизации продукции ВСД-KvAP, были подобраны оптимальные соотношения концентраций ионов  $Mg^{2+}$  (22 мМ),  $K^+$  (220 мМ), а также линейной ДНК матрицы (0,3 мг/мл). Общее количество ВСД-KvAP, синтезированного в этих условиях, составило 2,2-2,5 мг/мл РС. Для слитого белка TRX-VSTX1 оптимальными соотношениями концентраций ионов являются  $Mg^{2+}$  (20 мМ),  $K^+$  (220 мМ), а также линейной

ДНК матрицы (0,3 мг/мл). Общее количество TRX-VSTX1, синтезированного в этих условиях, составило 1,5-1,8 мг/мл РС.

**Экспрессия гена ВСД-KvAP в присутствии детергентов (D-CF).** Для осуществления синтеза ВСД-KvAP в растворимом виде, были протестированы различные детергенты (Brij-35-98, Тритон X-100, дигитонин, ДДМ, Fos-12). Методом иммуноблоттинга было показано, что присутствие детергентов в СБСП повышает содержание целевого белка в растворимой фракции (Рис. 6).

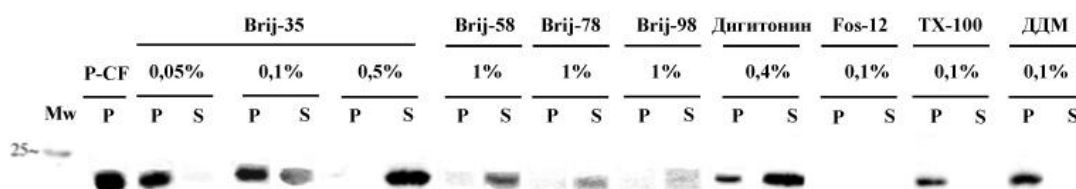


Рис. 6. Иммунодетекция результатов подбора детергентов для синтеза ВСД-KvAP в растворимой форме.

Примечание: Mw – маркер молекулярной массы; P - осадок; S – супернатант;

При повышении концентрации Brij-35 в диапазоне 0,05-0,5%, обнаружено заметное увеличение содержания KvAP в супернатанте. Это объясняется тем, что большее количество гидрофобных частей молекул детергента в РС взаимодействует с гидрофобными участками МБ. Наибольший выход ВСД-KvAP в растворимой форме наблюдался при использовании 0,5% Brij-35 и составлял около 1,2 мг/мл. Данный уровень продукции целевого белка является приемлемым для изучения функциональной активности, но не достаточно высоким в случае получения образцов для ЯМР-спектроскопии. В дальнейшем МБ получали в СБСП при продукции в виде осадка (P-CF).

**Экспрессия гена TRX-VSTX1 в растворимой форме.** Чтобы минимизировать неверное сворачивание (и, как следствие, выпадение в осадок РС) целевого белка, были применены следующие подходы для модификации сульфгидрильного редокс-потенциала СБСП:

- использование IAM для предварительной обработки S30 экстракта и инактивации свободных SH-групп необходимых для функционирования цитоплазматических оксидоредуктаз. Это позволило стабилизировать редокс-потенциал СБСП без существенных потерь белка;
- использование комбинации буферов с различным молярным соотношением GSSG и GSH для регулирования редокс-потенциала.

Комбинация этих двух подходов позволила обеспечить контролируемое и стабилизированное окислительное окружение, результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1

Эффект редокс-потенциала на выходы белка TRX-VSTX1 в СБСП

№	Модифицируемые параметры			Выход TRX-VSTX1 (мг/мл) M ± m, n=3	
	Глутатионовый буфер (мМ)	IAM	DsbC	Общий	Растворимый
1	-	-	-	1,64±0,14	0,19±0,05
2	-	-	+	1,61±0,20	0,20±0,02
3	4 GSSG/1 GSH	-	+	1,24±0,11	0,43±0,04
4	4 GSSG/1 GSH	+	+	0,97±0,10	0,65±0,07
5	5 GSH	+	-	1,32±0,10	0,20±0,05
6	4 GSSG/1 GSH	+	-	1,39±0,17	0,34±0,06

Примечание: конечная концентрация IAM составляла 0,6 мМ; конечная концентрация DsbC составляла 100 мкг/мл.

Показано, что наибольшая продукция TRX-VSTX1 в супернатанте СБСП наблюдается в присутствии комбинации 4 мМ GSSG/1 мМ GSH с добавлением 0,6 мМ IAM и DsbC. Также установлено, что добавление в СБСП DsbC, в дополнение к привнесенному с S30 экстрактом, не оказывает прямого влияния на увеличение выхода растворимой фракции, что указывает на неспособность данной изомеразы стимулировать формирование дисульфидных связей в не модифицированных бесклеточных системах.

### Выделение и очистка модельных полипептидов полученных в бесклеточной белоксинтезирующей системе

**Растворение ВСД-КvАР из осадка СБСП.** В ходе работы был проведен скрининг эффективности ряда детергентов – ДДМ, ДМ, ДФХ, ДСН (Рис. 7).

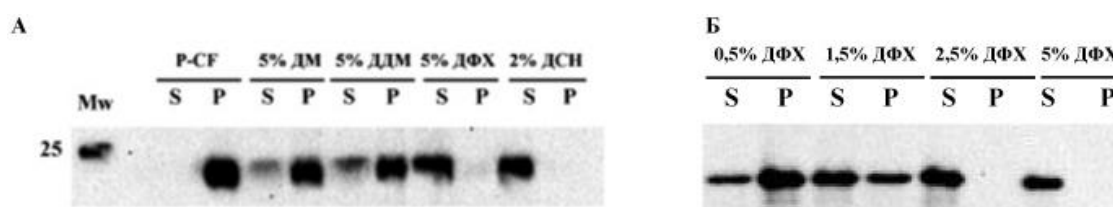


Рис. 7. Оценка эффективности рефолдинга ВСД-КvАР из осадка РС различными детергентами (А) и поиск рабочей концентрации ДФХ.

Примечание: Mw – маркер молекулярной массы; P - осадок; S – супернатант;

Наибольший выход ВСД-КvАР в растворимой форме достигается путем растворения в присутствии двуцепочечного дифосфохолина – 5% ДФХ, а также анионного детергента – 2% ДСН. Ввиду того, что размер мицелл ДСН может

препятствовать последующей аффинной очистке на Ni-NTA [Block et al., 2009] данный детергент не мог быть использован. Для дальнейшей очистки целевого белка был выбран ДФХ, рабочая концентрация которого (Рис. 7Б) составляла – 2,5% .

**Металл-хелатная аффинная хроматография ВСД-KvAP.** Подбор оптимальных условий выделения и очистки целевого белка, обеспечивающих наибольший выход и чистоту препарата заключался в подборе буферных растворов для удаления неспецифических примесей и эффективной элюции МБ с Ni-NTA. Показано, что повышение концентрации имидазола с 50 до 100 мМ не оказывает существенного влияния на удаление неспецифических примесей, однако приводит к потере целевого белка. Повышение концентрации NaCl в отмывочном буфере со 150 до 300 мМ значительно снижает содержание нежелательных примесей (Рис. 8А).

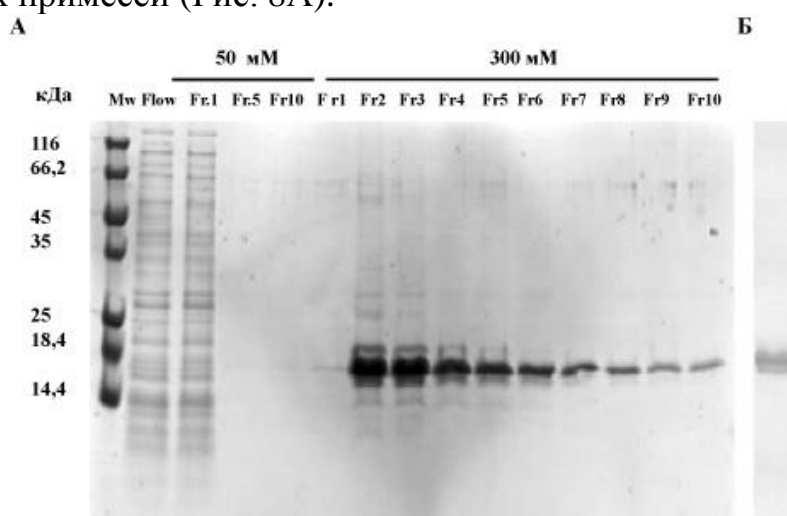


Рис. 8. Диск-электрофорез в 16% ДСН-ПААГ МХАХ фракций ВСД-KvAP (А) и сконцентрированного препарата (Б).

Примечание: Дорожки Mw – маркер молекулярной массы; Flow – проскок; Fr – фракции; 50 - 300 мМ концентрация имидазола в буфере.

Иммобилизация белка на гранулах сорбента в ходе очистки также позволила модифицировать гидрофобное окружение, путем снижения концентрации или полной замены на детергент с более предпочтительными характеристиками. В ходе работы было проведено сравнение эффективности очистки на выбранном хроматографическом сорбенте (Ni-NTA) при смене детергента (Табл. 2).

Таблица 2

Влияние замены детергента на эффективность очистки на сорбенте Ni-NTA

Детергент 1	Детергент 2	Относительные потери (%) <sup>*</sup>	Чистота (%) <sup>**</sup>	Выход (мг/мл) <sup>***</sup>
ДФХ	ДФХ	45	92	1,1-1,4
	ДДМ	12	98	1,9-2,0
	β-ОГ	9	98	1,9-2,3
	Brij-35	60	93	0,8-0,9
	Brij-58	71	89	0,4-0,6
-	-	-	72	2,2-2,5

Примечание: \* – потери белка в не связавшейся фракции и при промывках; \*\* – гель-фильтрация на Superdex 200, \*\*\* – выход в мг белка с 1 мл РС после МХАХ.

Из таблицы 2 видно, что наиболее высокие выходы целевого белка (при стартовой препаративной экспрессии в объеме 1 мл в Р-CF формате) достигаются при использовании комбинаций ДФХ-ДДМ и ДФХ-β-ОГ. Полученные на данном этапе препараты белка концентрировали на «Amicon Stirred Cell» 3 мл (мембрана 15 кДа) для смены буфера и концентрирования (Рис. 8Б).

**Протеолиз белка TRX-VSTX1.** Предварительно супернатанты, содержавшие слитый белок TRX-VSTX1, очищали от белков-контаминантов из РС с помощью МХАХ на Ni-NTA. Чистота полученного после МХАХ полупродукта составляла 82%, что было достаточным для проведения расщепления слитого белка с помощью энтерокиназы (ЭК). Оптимальное количество фермента для достижения максимального выхода VSTX1 было определено путем внесения различных количеств фермента и инкубации смеси при температуре 37°C (Рис. 9А).

Полученную после протеолиза смесь полипептидов разделяли на ОФ-ВЭЖХ (С18-сорбент) в возрастающем градиенте концентрации ацетонитрила (Рис. 9Б). Учитывая высокую гидрофобность пептида VSXT1, для предупреждения спонтанной димеризации и агрегации после элюции, целевую фракцию разделяли на аликвоты и лиофильно высушивали.

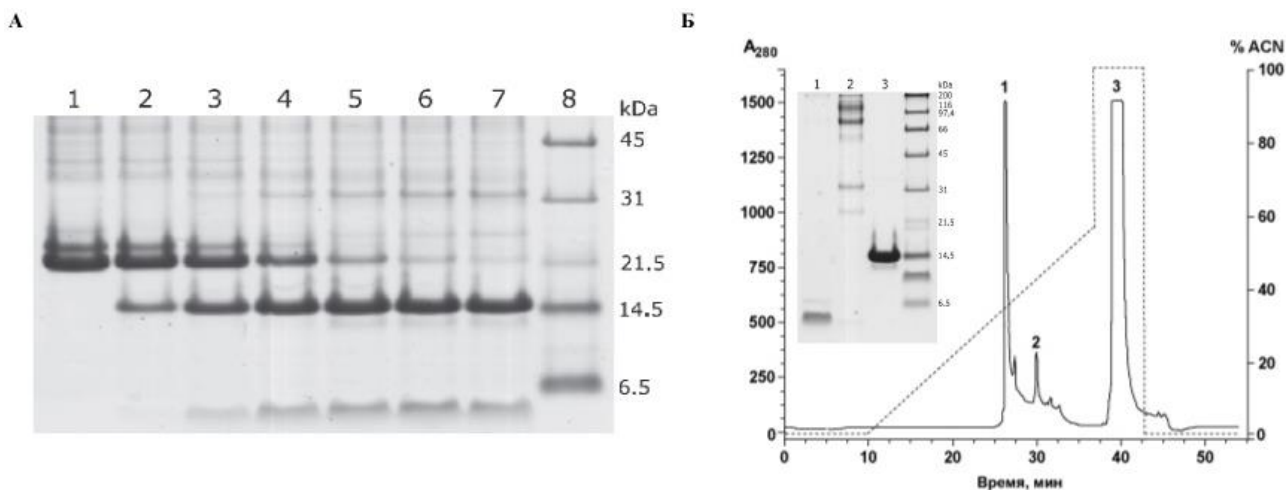


Рис. 9. Диск-электрофорез в 16% ДСН-ПААГ подбора оптимального соотношения ЭК: TRX-VSTX1 (А) и ОФ-ВЭЖХ для выделения очищенного VSTX1 (Б).

Примечание: А: Дорожки 1 – 0 мг ЭК; 2 – 0,1 мг ЭК; 3 – 0,2 мг ЭК; 4 – 0,4 мг ЭК; 5 – 0,6 мг ЭК; 6 – 0,8 мг ЭК; 7 – 1 мг ЭК; Б: 1 – фракция содержащая VSTX1; 2 - фракция содержащая примесные белки; 3 - фракция содержащая TRX; (по данным ДСН-ПААГ).

### Физико-химические характеристики препаратов модельных полипептидов

**Изучение молекулярно-массового распределения.** Были проанализированы образцы целевого белка в присутствии ДДМ и  $\beta$ -ОГ. Показано, что в присутствии *n*-додецил- $\beta$ -D-мальтозида ВСД-KvAP образует стабильные димеры (Рис. 10А), что в дальнейшем негативно сказывается на получаемом ЯМР-спектре, из-за перекрытия сигналов от АК остатков, присутствующих в мономерной и димерной форме белка. Дальнейшее изучение данного МБ проводили исключительно в присутствии 0,75%  $\beta$ -ОГ, в котором димеризация не наблюдалась.

Для определения чистоты и подтверждения идентичности полученного VSTX1, был использован метод ОФ-ВЭЖХ с препаратом природного каптаерафотоксин-Gr3a в качестве образца сравнения. Разделение проводили на колонке Delta Pak C4 в градиенте ацетонитрила. Показано совпадение времени удерживания природного и рекомбинантного пептида (Рис. 10Б).



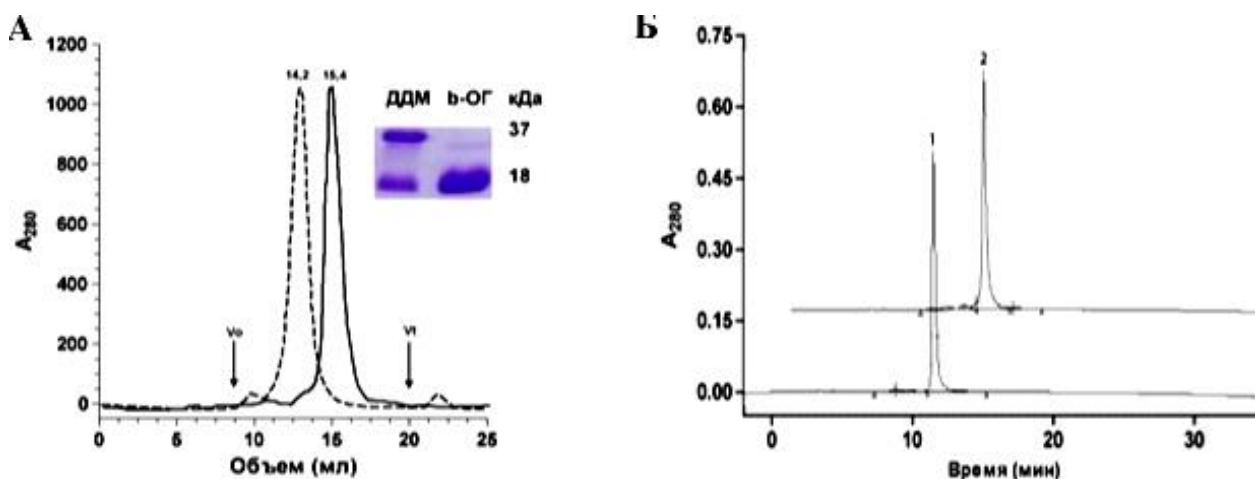


Рис. 10. Профиль хроматографической элюции препаратов ВСД-KvAP (А) и VSTX1 (Б).

Примечание: А: ДДМ – штрихпунктирная линия; b-ОГ – сплошная линия. Б: 1 – природный токсин, 2 – синтезированный в СБСП токсин.

**Анализ вторичной структуры и термостабильности.** Для характеристики препаратов ВСД-KvAP и VSTX1, спектроскопию КД проводили в диапазоне 190-260 нм, анализ полученных спектров осуществляли с применением алгоритма регуляризации [Provencher, Glockner, 1981]. Результаты экспериментов представлены ниже (Рис. 11).

В препарате ВСД-KvAP было определено содержание  $\alpha$ -спиральных структур – 53% (теоретически 55%) и неупорядоченной структуры – 47% (теоретически 45%). Также в препарате VSTX было определено содержание вторичных структур в виде  $\beta$ -листов – 30% (теоретически 33%),  $\beta$ -поворотов – 12% (теоретически 11%), неупорядоченной структуры – 58% (теоретически 56%). Подтверждение наличия упорядоченной вторичной структуры у исследованных препаратов макромолекул позволило перейти к дальнейшей характеристике их методом ЯМР-спектроскопии.

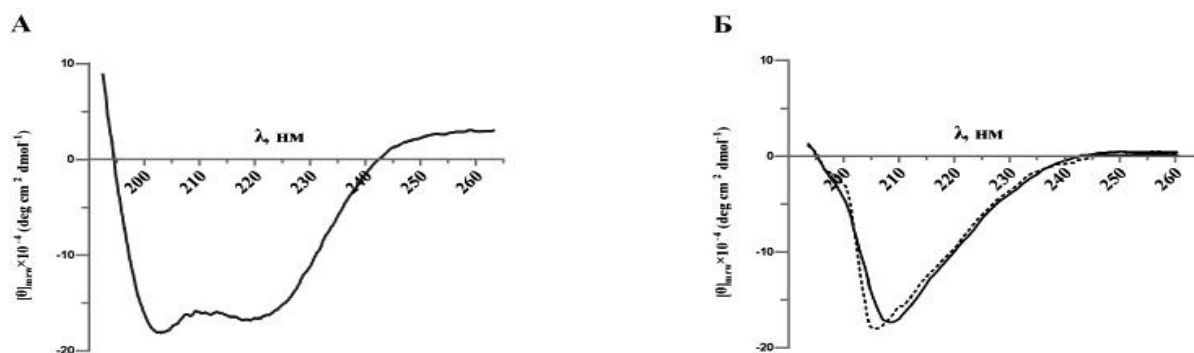


Рис. 11. КД - спектры препаратов ВСД-KvAP (А) и VSTX1 (Б).

Примечание: Б: природный токсин – штрихпунктирная линия, 2 – синтезированный в СБСП токсин – сплошная линия.

Изучение температурной стабильности элементов вторичной структуры в препаратах целевых белков проводили при  $\lambda=220$  нм, оценивали изменение молярной эллиптичности в диапазоне температур 4-90°C. Полученные результаты представлены ниже (Рис. 12).

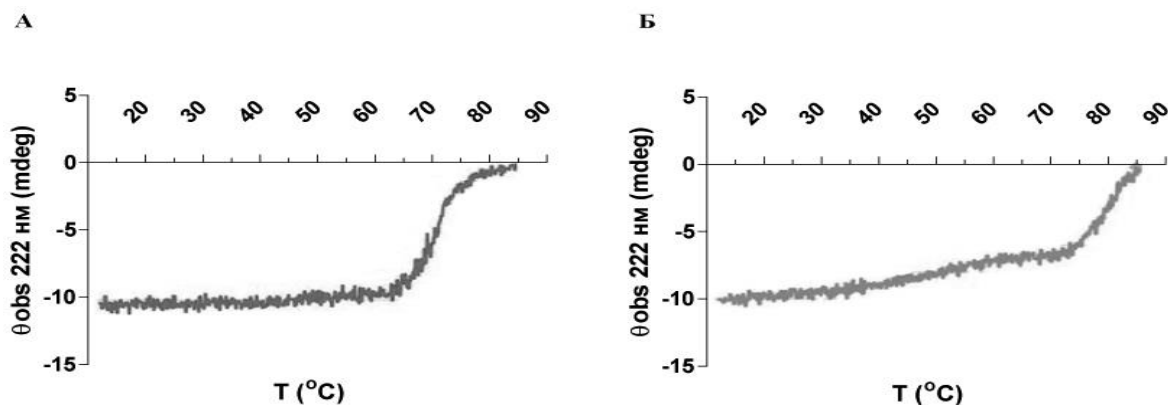


Рис. 12. Кривые плавления препаратов ВСД-KvAP (А) и VSTX1 (Б).

Как следует из Рис. 12, денатурация в препарате ВСД-KvAP в присутствии мицелл  $\beta$ -ОГ происходит в один этап при 62°C. Для препарата VSTX1 было показано наличие двухэтапного перехода при 42°C и 72°C. Это, вероятно, обусловлено наличием дисульфидных связей, стабилизирующих укладку токсина. Охлаждение исследуемых образцов до 4°C продемонстрировало необратимость процессов термальной денатурации исследуемых препаратов.

**ЯМР спектроскопия.** Предварительный анализ структуры ВСД-KvAP был проведен на образце белка  $^{15}\text{N}$ -меченого по остаткам аланина, глицина, серина и триптофана. Выбор данных аминокислот был обусловлен их преимущественным присутствием в ТМ фрагментах [Reckel, Sobhanifar, 2008]. Анализ полученных спектров (Рис. 13А) подтвердил наличие выраженных амидных сигналов от 36 аминокислотных остатков (86% от общего числа  $^{15}\text{N}$ -меченых АК). Дисперсия пиков на 1Д и 2Д HSQC спектрах тотально меченого белка свидетельствовала о формировании упорядоченной структуры полипептидной цепи в присутствии мицелл детергента (Рис. 13Б).

Используя разработанный нами метод комбинаторного тройного селективного мечения [Löhr F et al., 2012], было выполнено соотнесение полученных сигналов для 94% аминокислотных остатков, необходимая информация получена с использованием всего 3 образцов ВСД-KvAP с различными комбинациями меченых аминокислот и основана на анализе данных 3Д HNCA и HN(CO)CA экспериментов. Применение данного подхода не ограничивается исключительно мембранными белками, но может быть также, служить для установления структур макромолекулярных комплексов или функционально неупорядоченных белков. Полученные значения химических сдвигов ( $^1\text{H}^{\text{N}}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}^{\alpha}$ ) для комбинаторно-меченого ВСД-KvAP по

данным 3D HNCA/HN(CO)CA коррелируют с полученными ранее данными [Shenkarev et al., 2010]. Химические сдвиги протонов и азота совпадали с точностью 0,1-0,6 пропромилле. В случае  $^{13}\text{C}^{\alpha}$  установлено совпадение с точностью 1 пропромилле ввиду  $^2\text{H}/^1\text{H}$  сдвигов, так как предыдущее исследование проводилось на perdeuterированном белке. Значимые различия в резонансных частотах были выявлены на участке Иле141-Асп146, что объясняется тем, что в данной работе С-концевые остатки (Арг148, Сер149) были заменены на His10-тег. Также, примененный подход позволил детектировать сигналы от Мет1-Асп3, которые не были отнесены ранее.

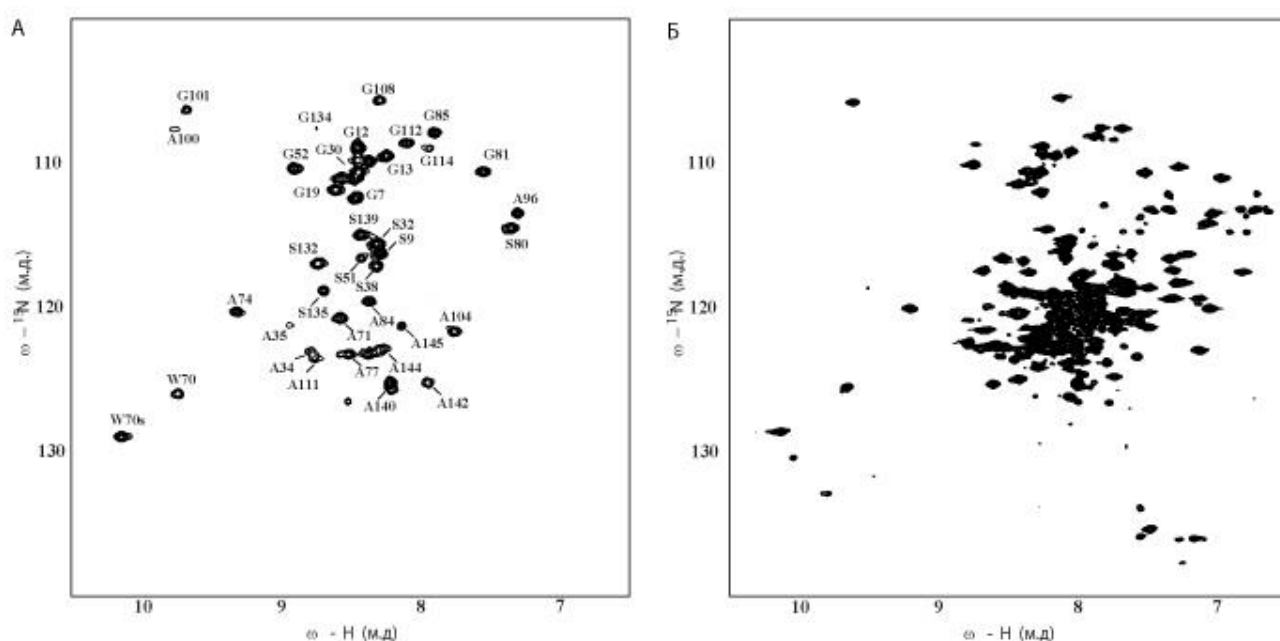


Рис. 13. 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC-спектры образца ВСД-KvAP в мицеллах b-ОГ селективно  $^{15}\text{N}$ -Ала, Гли, Сер, Трп меченого (А) и totally  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -меченого (Б).

Предварительный анализ конформационных особенностей VSTX1 был проведен на образце  $^{15}\text{N}$ -меченого по остаткам цистеина пептида (Рис. 14А). Запись  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC ЯМР-спектров осуществляли при температуре 310 К, лиофильно высушенный образец растворяли в 20 мМ ацетатном буфере с рН 5,8, содержащем 5%  $\text{D}_2\text{O}$  и 10 мМ DSS. Те же параметры измерений были использованы для получения спектров totally  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -меченого пептида (Рис. 14Б). Соотнесение NH сигналов  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC было, выполнено основываясь на данных измерений 3D NOESY-HSQC. Из-за высокой подвижности N-конца пептида, сигналы от Глу1 и Цис2 выявлены не были.

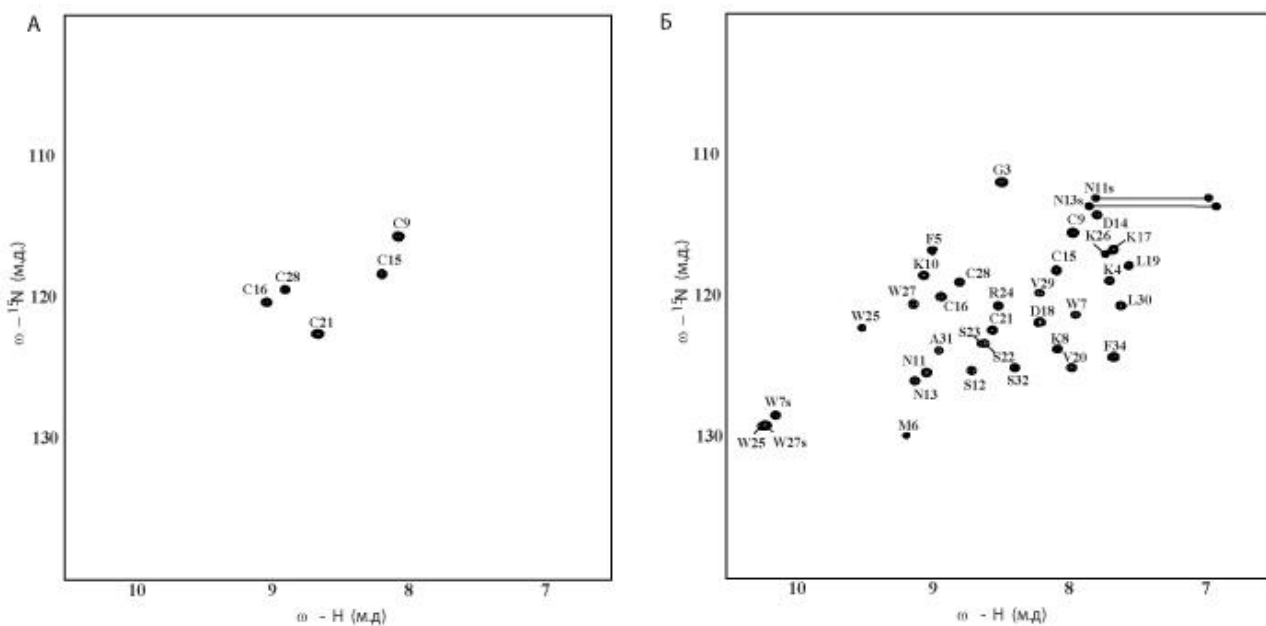


Рис. 14. 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -HSQC-спектры образца каппа-терафотоксина-Gr3a селективно  $^{15}\text{N}$ -Цис меченого (А) и тотально  $^{13}\text{C}/^{15}\text{N}$ -меченого (Б).

**Сравнительный анализ химических сдвигов.** Принимая во внимание отсутствие необходимости, проводить расчёт трехмерной структуры исследуемых макромолекул *de novo*, был выполнен сравнительный анализ значений химических сдвигов различных групп атомов, который позволил быстро и достоверно определить степень соответствия трехмерных структур белков, основываясь на данных из Банка данных белковых структур (PDB). Этот подход подтвердил свою состоятельность ранее для одного из модельных белков [Парамонов А.С., 2009].

В данной работе сравнение полученных экспериментально, с применением ЯМР-спектроскопии, значений химических сдвигов было проведено с помощью более совершенного алгоритма, реализованного в программе SHIFTX2, позволяющего получить результаты с более высокой точностью и низким уровнем среднеквадратичной ошибки. Для получения значений химических сдвигов и последующего сравнения, была выбрана структура изолированного ВСД (номер по PDB 2KYH), установленная методом жидкостной ЯМР-спектроскопии [Butterwick, 2010] в присутствии ДФХ. Этот же подход был применен для оценки сходства значений экспериментально полученных химических сдвигов для пептидного токсина VSTX1 относительно единственной решенной структуры (номер по PDB 1S6X), депонированной в которая также была установлена методом жидкостной ЯМР-спектроскопии. Результаты данного анализа представлены ниже (Рис. 15).

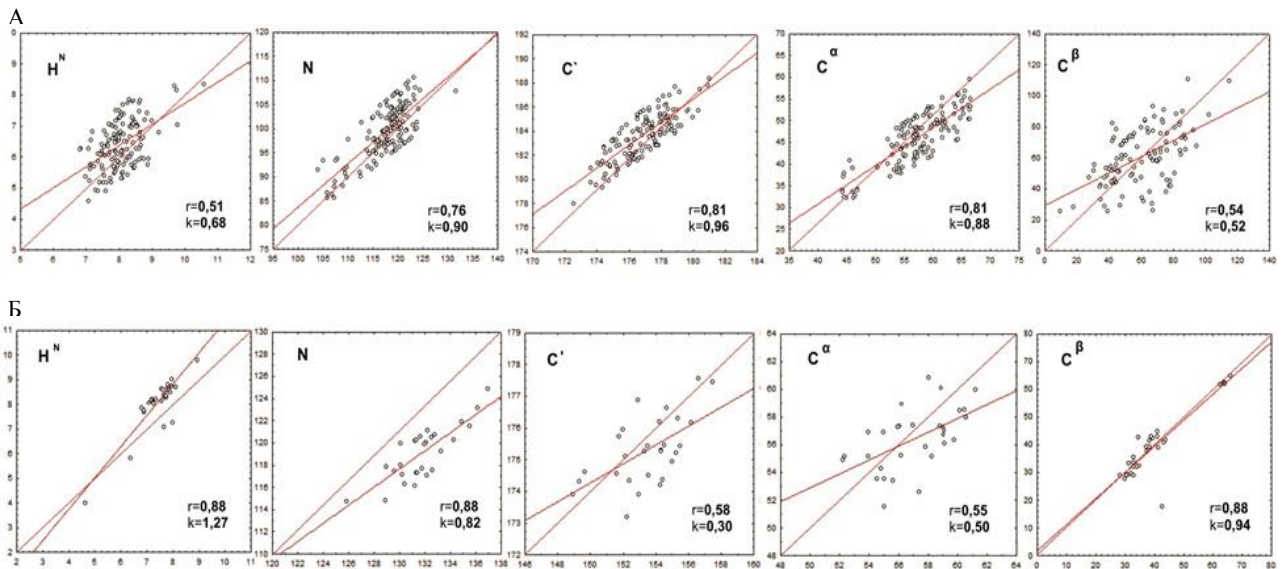


Рис. 15. Корреляционные диаграммы значений химических сдвигов ВСД-KvAP (А) и VSTX1 (Б).

Примечание: Горизонтальная ось - рассчитанные значения химических сдвигов; вертикальная ось – полученные экспериментально значения химических сдвигов.

Основываясь на шкале Чеддока для оценки линейного коэффициента корреляции было установлено, что значения химических сдвигов всех групп атомов ВСД-KvAP и VSTX-1 демонстрируют заметную или высокую степень сходства с рассчитанными данными. Что также косвенно указывает на сходство конформации исследуемой макромолекулы в разных детергентах, несмотря на существенные различия в условиях проведения ЯМР-экспериментов. Полученные данные подтверждают возможность получения в СБСП препаратов белков, структурно сходных с представленными в PDB молекулами.

**Пулл-даун анализ взаимодействия ВСД-KvAP и VSTX1.** Для предварительной оценки наличия специфического взаимодействия по принципу «лиганд-рецептор» в исследуемой паре модельных полипептидов был использован метод пулл-даун анализа. Данный подход позволил однозначно и достаточно быстро подтвердить способность исследуемых полипептидов образовывать стабильные комплексы, посредством взаимодействия корректно свернутых доменов, формирующих необходимые для связывания интерфейсы. Ввиду высокой гидрофобности исследуемого пептида и его сродства к МБ, для контроля отсутствия неспецифического взаимодействия, были проведены эксперименты с укороченной формой теллуритного транспортера - TehA из *E.coli*, который также состоял из четырех трансмембранных альфа-спиральных доменов.

С помощью иммунохимической детекции со специфическими антителами было установлено, что элюция, образовавшихся *in vitro* комплексов «токсин-ионный канал», характерна для фракций, получаемых при промывки сорбента буфером с 300 мМ имидазола.

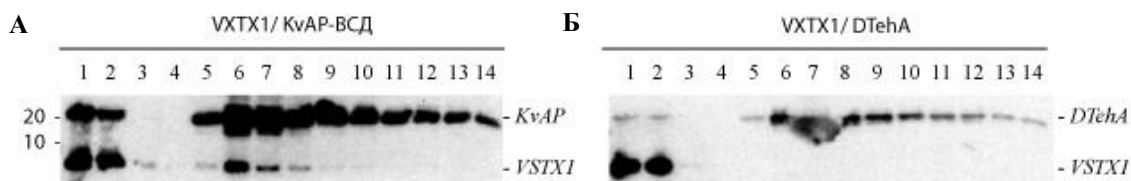


Рис. 16. Пулл-даун анализ взаимодействия исследуемых макромолекул.  
Примечание: А – взаимодействие BCD-KvAP и VSTX1; Б – взаимодействие DTeA и VSTX1.  
Цифрами показаны номера фракций 1 – 3-не связавшаяся, 4– 14 – элюция с 300 мМ имидазола.

Таким образом, экспериментально было подтверждено (Рис. 16) что полученные в бесклеточных белоксинтезирующих системах - BCD-KvAP и VSTX1 способны с высокой специфичностью взаимодействовать и образовывать стабильный комплекс.

Проведенные в рамках данной диссертационной работы исследования демонстрируют возможность эффективной препаративной продукции модельных полипептидов в СБСП. Показано, что наибольшие выходы очищенного препарата BCD-KvAP достигаются в Р-СF формате экспрессии с последующей ренатурацией из осадка ДФХ и переводом в  $\beta$ -ОГ. Также было установлено, что наибольшая продукция растворимого TRX-VSTX1 в супернатанте РС наблюдается в присутствии кофакторов GSSG, GSH и IAM. Эффективность формирования околонативной структуры исследуемых полипептидов в СБСП была подтверждена методом ЯМР-спектроскопии. Разработанные и применённые методы селективного и комбинаторного изотопного мечения мембранного белка (BCD-KvAP) и его селективного пептида-ингибитора (VSTX1) позволили получить информацию о структуре данных макромолекул в весьма короткие сроки. Таким образом, выполненные исследования могут являться основой для разработки системы высокопроизводительного скрининга на основе СБСП для уточнения механизмов взаимодействия потенциал-управляемых ионных каналов и ингибиторов пептидной природы.

## ВЫВОДЫ

1. В оптимизированной системе бесклеточной экспрессии на основе S30 экстракта *E. coli* получены модельные полипептиды с высокими выходами: для BCD-KvAP – 2,2-2,4 мг/мл РС и для VSTX1 – 0,6-0,7 мг/мл в супернатанте РС.

2. Разработаны методики выделения и очистки BCD-KvAP и VSTX1. Получены препараты достаточной чистоты и стабильности для осуществления дальнейших исследований.

3. Изучены физико-химические свойства полученных препаратов модельных полипептидов. Выбран оптимальный для структурных

исследований ВСД-KvAP детергент –  $\beta$ -октил-глюкозид. Подтверждено формирование в СБСП корректной укладки VSTX1.

4. С использованием бактериальной бесклеточной белоксинтезирующей системы было осуществлено селективное, комбинаторное и тотальное изотопное мечение исследуемых полипептидов непосредственно в ходе синтеза.

5. Проведенные исследования образцов ВСД-KvAP и каппа-терафотоксина-Gr3a, методом ЯМР-спектроскопии, позволили выполнить *in silico* сравнение структуры изучаемых макромолекул, с представленными в PDB и подтвердить высокую степень сходства.

6. Для полученных в СБСП модельных полипептидов, экспериментально подтверждена способность к образованию стабильных комплексов.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Bernhard F Cell-free expression of membrane proteins / Bernhard F, Schwarz D, Junge F, Schneider B, **Karbyshev M**, Reckel S, Durst F, Sobhanifar S, Doetsch V // Conference Proceedings of the German Society of Biochemistry and Molecular Biology, Study Group Biomembranes and the German Society of Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology. Rauschholzhausen (Germany). 2008. P. 14.

2. Sobhanifar S Cell-free expression and stable isotope labeling strategies for membrane proteins / Sobhanifar S, Reckel S, Junge F, Schwarz D, Kai L, **Karbyshev M**, Löhr F, Bernhard F, Dötsch V // J Biomol NMR. – 2010. – Vol. 46, № 1. – P. 33-43.

3. Bernhard F Protocol development for the cell-free production of high quality membrane proteins / Bernhard F, Roos C, Kai L, Proverbio D, **Karbyshev M**, Lagguere A, Ma Y, Junge F, Dötsch V. // Proceedings of SFB 35 Symposium 2010 Transmembrane Transporters in Health and Disease. Vienna (Austria). 2010. P. 24.

4. Löhr F Combinatorial triple-selective labeling as a tool to assist backbone resonance assignment in membrane proteins / Löhr F, Reckel S, **Karbyshev M**, Connolly PJ, Abdul-Manan N, Moore JM, Dötsch V // Euromar 2011 and 33 Discussion Meeting of the MR Spectroscopy Division of the GDCh. Frankfurt am Main (Germany). 2011. P. 180.

5. Löhr F Combinatorial triple-selective labeling as a tool to assist membrane protein backbone resonance assignment / Löhr F, Reckel S, **Karbyshev M**, Connolly PJ, Abdul-Manan N, Bernhard F, Moore JM, Dötsch V. // J Biomol NMR. – 2012. – Vol. 52, № 3. – P. 197-210.

6. Kai L Systems for the cell-free synthesis of proteins / Kai L, Roos C, Haberstock S, Proverbio D, Ma Y, Junge F, **Karbyshev M**, Dötsch V, Bernhard F. // Methods Mol Biol. – 2012. – Vol. 800, P. 201-225.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

(His) <sub>n</sub> – гистидиновый тег	КД – круговой дихроизм
ACN – ацетонитрил	кДа – килодальтон
BMRB – банк данных	мАТ – моноклональные антитела
бимолекулярной ЯМР спектроскопии	МБ – мембранные белки
DSS – 4,4-диметил-4-силапентан-1-сульфоновая кислота	МХАХ – металл-хелатная аффинная хроматография
GSH – восстановленный глутатион	ОФ-ВЭЖХ - обращенно-фазовая ВЭЖХ
GSSG – окисленный глутатион	ПААГ – полиакриламидный гель
IAM – йодацетамид	пАТ – поликлональные антитела
P-CF – продукция в осадок СБСП	пДНК – плазмидная ДНК
TRX – тиоредоксин	ПС – питающая смесь
β-ОГ – β - октил-глюкозид	ПЦР – полимеразная цепная реакция
АТФ – аденозинтрифосфат	ПЭГ – полиэтиленгликоль
БС – бесклеточный синтез	РС – реакционная смесь
БСА – бычий сывороточный альбумин	СБСП – системы бесклеточного синтеза полипептидов
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография	ТМ – трансмембранный (регион)
ГТФ – гуанидинтрифосфат	ТХ-100 – Тритон X-100
ГФХ – гексаноилфосфатидилхолин	УТФ – уридинтрифосфат
ДДМ – n-додецил-β-D-мальтозид	ЦТФ – цитидинтрифосфат
ДМ – n-децил-β-D-мальтозид	ЭК – энтерокиназа EC 3.4.21.9
ДСН – додецилсульфат натрия,	ЭФ – электрофорез
ДТТ – 1,4 дитиотреитол	ЯМР – ядерный магнитный резонанс
ДФХ – дифосфатидилхолин	





Тираж XXX экз.  
Изготовлено в XXXX  
634050, г.Томск, XXXX  
тел.: 8 (3822) XX-XX-XX