



УДК 577.112.82.088.53:543.422.25

ПОЛУЧЕНИЕ В *E. coli* И ^{19}F -ЯМР ИССЛЕДОВАНИЕ 5-ФТОРТРИПТОФАНСОДЕРЖАЩЕГО N-КОНЦЕВОГО ДОМЕНА α -СУБЪЕДИНИЦЫ АЦЕТИЛХОЛИНОВОГО РЕЦЕПТОРА *Torpedo californica*

© 2003 г. Т. А. Алексеев[#], Н. И. Дергоусова, Е. Д. Шибанова, Е. А. Азеева,
Е. В. Крюкова, Т. А. Балашова, П. В. Дубовский, А. С. Арсеньев, В. И. Цетлин

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 ГСП,
Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 05.06.2002 г. Принята к печати 30.07.2002 г.

С использованием соответствующего фрагмента кДНК и выращивания клеток *Escherichia coli* на синтетической среде с добавкой 5-фтортриптофана получен белок, отвечающий экстрацеллюлярному домену (остатки 1–209) α -субъединицы никотинового ацетилхолинового рецептора из электрического органа *Torpedo californica*. Наличие фрагмента (His)₆, предшествующего последовательности 1–209, позволило провести очистку белка, выделенного из тел включения, на Ni-NTA-агарозе. Анализ гидролизата белка с помощью ^{19}F -ЯМР показал, что включение остатков 5-фтортриптофана составило ~50%. Спектр белка, подвергнутого восстановлению в денатурирующих условиях и последующему реокислению в разбавленном растворе в присутствии 0.05% SDS, характеризуется достаточным разрешением, что позволило провести частичное отнесение сигналов ^{19}F с использованием мутанта Trp60Phe. Способность полученных доменов специфически связывать α -нейротоксина змей показана с использованием радиодированного α -бунгаротоксина и трифторацетилированного α -кобратоксина.

Ключевые слова: ацетилхолиновый рецептор, рефолдинг, ЯМР-спектр, α -субъединица, фторсодержащий домен рецептора.

ВВЕДЕНИЕ

Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (АХР) – лигандуправляемые каналы и подразделяются на две основные группы: рецепторы мышечного типа и нейрональные (см. обзоры [1–3]). Выводы о пространственной организации всего класса АХР до недавнего времени в значительной мере основывались на данных криоэлектронной микроскопии АХР мышечного типа (см. [4] и приведенные там ссылки), выделяемого в значительных количествах из электрического органа ската *Torpedo californica*. Установлено, что субъединицы этого рецептора (две α - и по одной β -, γ - и δ -субъединице) образуют пентамерный комплекс, вдоль оси которого располагается пронизывающий мембрану ионный канал. Согласно существующим представлениям, каждая субъединица имеет экстрацеллюлярный домен (ЭД), трансмембранный участок, а также цитоплазматический домен. К настояще-

му времени получена информация о форме трансмембранных фрагментов, выстилающих канал, а также об элементах вторичной и третичной структуры ЭД [4]. Установление пространственной структуры более высокого разрешения с помощью РСА натолкнулось на трудности получения кристаллов цельного рецептора. В связи с этим представляется целесообразным провести вначале детальный структурный анализ отдельных функциональных доменов АХР.

В ЭД АХР происходит связывание ацетилхолина, а также различных других агонистов и антагонистов. Следует отметить, что ЭД α -субъединиц (или их фрагменты) были достаточно давно получены с помощью гетерологичной экспрессии в *Escherichia coli* (см., например, [5]), как правило, в виде тел включения. Изучение пространственных и функциональных характеристик этих белков требовало проведения их денатурации с последующей ренатурацией. С помощью спектроскопии КД в ряде зарубежных лабораторий, а также в нашем институте была определена вторичная структура белков, отвечающих ЭД α -субъединиц мышечного АХР мыши [6] и рецептора *T. californica* [7–9], изучено связывание этими доменами токсинов [6–9] и моноклональных

Сокращения: IPTG – изопропил- β -D-тиогактопиранозид; α -Bgt – α -бунгаротоксин; NTA – нитрилотриацетат; Trp(F) – 5-фтортриптофан; АХР – ацетилхолиновый рецептор; РСА – рентгеноструктурный анализ; ЭД – экстрацеллюлярный домен.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 330-73-74; эл. почта: t_alex@freemail.ru).

антител [8, 10]. При этом стала очевидной необходимость оптимизации условий сборки белка, предотвращения образования агрегатов при достижении достаточно высоких концентраций белка, необходимых для изучения пространственной структуры методом РСА или ЯМР. В этой связи мы решили ввести в ЭД α -субъединицы АХР *T. californica* (остатки 1–209) атомы фтора в составе остатков Trp(F), с целью использовать спектроскопию ^{19}F -ЯМР для анализа получаемых продуктов и контроля за рефолдингом. Выбор Trp(F) объясняется тем, что в ЭД имеется восемь остатков Trp (в положениях 60, 67, 86, 118, 149, 176, 184 и 187), которые охватывают значительную часть аминокислотной последовательности ЭД.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

*Получение N-концевого домена α -субъединицы ацетилхолинового рецептора *T. californica* и его мутанта Trp60Phe, содержащих остатки 5-фтортриптофана*

В работе были использованы конструкции, созданные на основе векторов pQE30-серии, использованных ранее для получения соответствующего белка, не содержащего атомов фтора [8]. В этом белке последовательности собственно α -субъединицы предшествует $(\text{His})_6$ -фрагмент, позволяющий проводить очистку белка на Ni-NTA-агарозе. Этот фрагмент, очевидно, не влияет существенно на структурно-функциональные свойства белка, поскольку его токсинсвязывающая способность и спектры КД были практически такими же, как и для белка, несущего $(\text{His})_6$ -маркер на C-конце последовательности 1–209 [8].

Методом сайт-направленного мутагенеза была проведена замена Trp60Phe. ДНК, полученная в результате ПЦР, была клонирована в вектор pQE30. Правильность полученных конструкций подтверждена секвенированием по методу Сенгера.

Поскольку фтораминокислоты токсичны для клеток *E. coli* (см. обзоры [11, 12]), потребовался подбор штаммов и условий выращивания, которые позволили бы добиться компромисса между приемлемыми выходами биомассы и достаточно высокими уровнями включения остатков Trp(F) (рис. 1). В результате было найдено оптимальное количество добавляемого в среду Trp(F) (порядка 100 мкМ) и выбраны подходящие клетки (AD494), в которых выходы биомассы достигали ~60 мг/л культуры, а включение Trp(F) в расчете на восемь остатков триптофана в ЭД составляло ~50%. В отдельных опытах были достигнуты и более высокие уровни включения (60–75%), однако отмечались и случаи, когда включение Trp(F) практически отсутствовало. Включение ~50% достигалось наиболее часто, и именно с такими

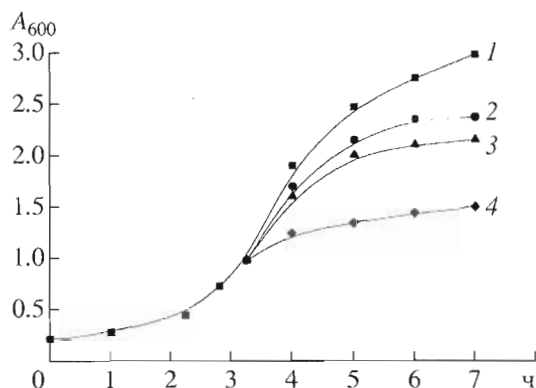


Рис. 1. Рост клеток *E. coli* AD494 в отсутствие (1) и в присутствии в питательной среде Trp(F) в концентрациях 10^{-5} (2), 10^{-4} (3), 10^{-3} М (4).

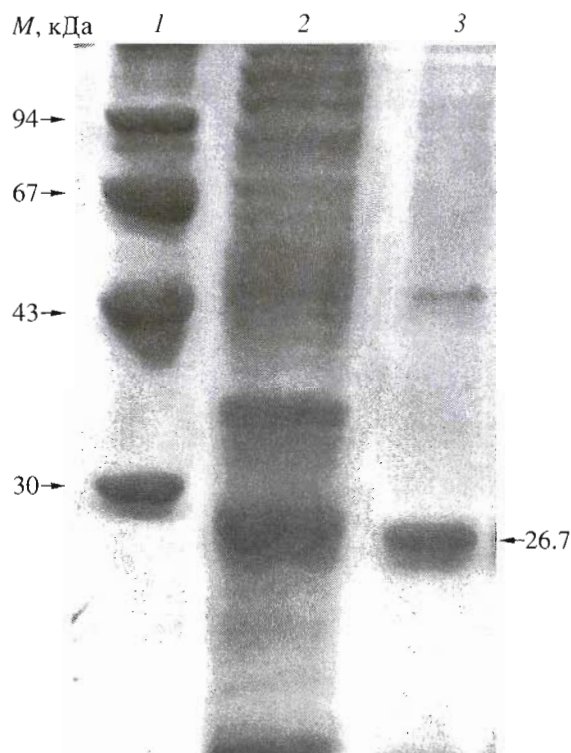


Рис. 2. Контроль за очисткой Trp(F)-содержащего белка $\alpha(1-209)\text{F}$ с помощью электрофореза в 12% полиакриламидном геле в восстанавливающих условиях (100 мМ β -меркаптоэтанол): 1 – белковые стандарты, 2 – клеточный лизат, 3 – белок, выделенный аффинной хроматографией на Ni-NTA-агарозе.

образцами выполнена большая часть ^{19}F -ЯМР-исследований.

Весь целевой белок получен в телах включения. В результате их промывки, последующего растворения в денатурирующих условиях и аффинной хроматографии на Ni-NTA-агарозе был выделен целевой белок, чистота которого составляла ~90% (рис. 2). Аналогичным образом был

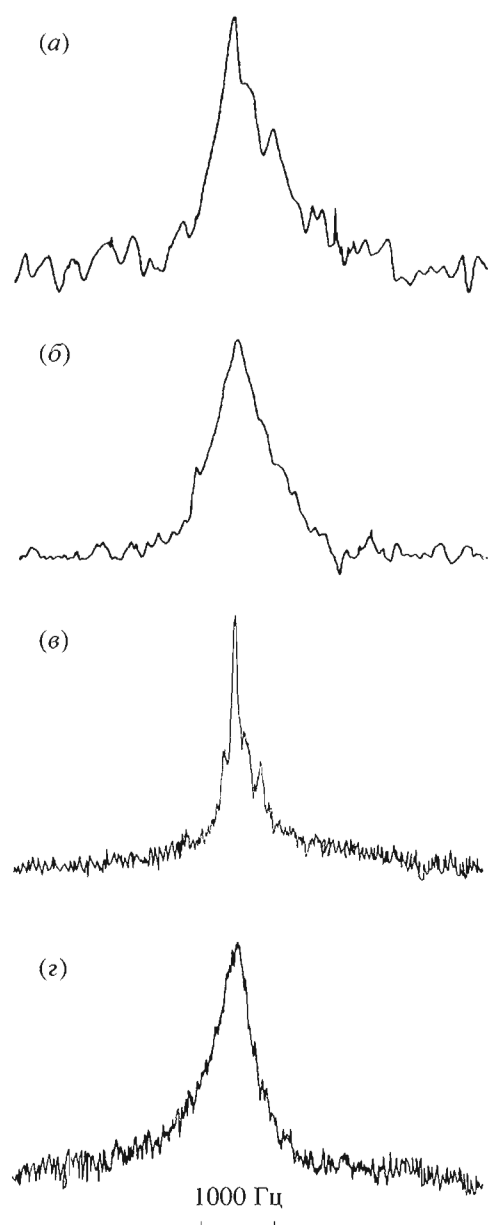


Рис. 3. Спектры ^{19}F -ЯМР белка $\alpha(1-209)\text{F}$ в 6 М моче­вине (а), в водном растворе (б), в присутствии 2% SDS и 100 мМ β -меркаптоэтанола (в), в 50 мМ Трис-НСl-буфере, рН 8,0, в присутствии 0,05% SDS (г). Концен­трация белка $\sim 3,5$ мг/мл.

получен Trp60Phe-мутант. Белок ($M_r \sim 26700$), отвечающий ЭД природной α -субъединицы, и Trp60Phe-мутант обозначены соответственно как $\alpha(1-209)\text{F}$ и [Trp60Phe]- $\alpha(1-209)\text{F}$.

^{19}F -ЯМР-исследования

Для определения уровня включения остатков Trp(F) проводили кислотный гидролиз полученных белков в условиях минимальной деструкции остатков триптофана [13] и сравнивали со спектрами

^{19}F -ЯМР водных растворов свободного 5-фтортриптофана, а также 5-фтортриптофана, инкубированного в условиях гидролиза. С учетом наличия в белках восьми остатков триптофана, степень включения для различных препаратов составляла 50–75%.

На рис. 3а приведен ^{19}F -ЯМР-спектр белка $\alpha(1-209)\text{F}$ в 6 М моче­вине. После удаления моче­вины с помощью диализа характер спектра мало меняется (рис. 3б): оба спектра представляют собой широкий сигнал (полуширина 700 Гц), очевидно, являющийся суперпозицией сигналов от разных остатков Trp(F) в белке с достаточно малой дисперсией химических сдвигов ($\sim 1,0$ м.д.). Поскольку ранее в аналогичном домене гель-хро­матография образцов в водных средах выявила, наряду с мономером, присутствие димеров и форм с более высокими молекулярными массами [8], можно предположить, что одной из причин широких сигналов является агрегация белка. В более жестких денатурирующих условиях (2% SDS, 100 мМ β -меркаптоэтанол) сигналы становятся более узкими и разрешаются в спектре (рис. 3в). В последнем случае имитируются условия электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии SDS, в которых белок находится преимущественно в мономерной форме (см. рис. 2).

Данные гель-хроматографии показали, что существенного снижения доли агрегатов можно добиться и с помощью значительно меньших концентраций SDS, не превышающих 0,1%. Подобные концентрации SDS не являются полностью денатурирующими. Это следует из полученных ранее спектров КД в водных буферах и в присутствии 0,2% SDS для домена 1–209, не содержащего атомов фтора [8], а также из литературных данных о том, что добавки небольших количеств SDS ($\sim 0,02\%$) к выделенной в денатурирующих условиях α -субъединице рецептора *T. californica* или к синтетическим фрагментам ЭД способствовали ренатурации и улучшению связывания α -бунгаротоксина [14, 15]. Поэтому казалось целесообразным снять спектр ^{19}F -ЯМР при концентрации SDS $\leq 0,1\%$. В присутствии 0,05% SDS (рис. 3г) сигнал в спектре ^{19}F -ЯМР становится более узким по сравнению со спектрами, приведенными на рис. 3а и 3б, однако характер спектра существенным образом не изменяется.

Мы решили проследить, какое влияние на вид спектров окажет варьирование условий рефолдинга. С этой целью образец, для которого был получен спектр, представленный на рис. 3г, был подвергнут восстановлению в денатурирующих условиях, после чего была проведена ренатурация при высоком разбавлении в присутствии 0,05% SDS. При этом убыль свободных SH-групп контролировали по методу Элмана [13]. Как

видно из рис. 4а, полученный образец дает значительно лучше разрешенный спектр.

Представлялось целесообразным проверить возможность упрощения спектра при использовании мутантов, имеющих меньшее число остатков Trp(F). На рис. 4б приведен спектр белка [Trp60Phe]- $\alpha(1-209)\text{F}$, который получен аналогично домену “дикого типа”, т.е. выделен с помощью аффинной хроматографии на Ni-NTA-агарозе, а затем подвергнут восстановлению в денатурирующих условиях и последующему рефолдингу в присутствии 0.05% SDS. В этом спектре имеются отличия от спектра исходного белка, которые могут быть обусловлены как исчезновением сигнала остатка Trp(F)60, так и снятием его возможного влияния на химические сдвиги сигналов других пространственно сближенных с ним остатков Trp(F) (подобные эффекты наблюдались, например, ранее для трифторацетилированных производных нейротоксина II [16]).

Спектры белков $\alpha(1-209)\text{F}$ и [Trp60Phe]- $\alpha(1-209)\text{F}$ в присутствии 2% SDS и α -меркаптоэтанола (рис. 5а, 5б), т.е. в условиях, когда эти белки, согласно данным электрофореза (рис. 2), находятся преимущественно в виде мономеров, сходны и состоят из четырех перекрывающихся сигналов. Регистрация спектров в одинаковых условиях позволила сравнить их интегральные интенсивности и получить дифференциальный спектр (рис. 5в). С учетом количества остатков триптофана в белке и в предположении

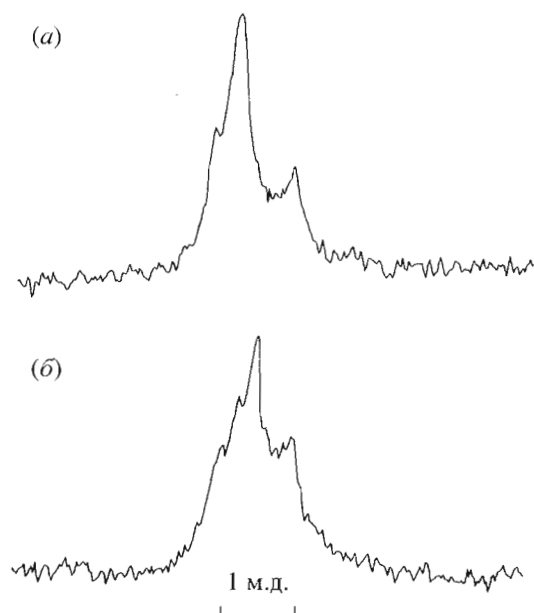


Рис. 4. Спектры ^{19}F -ЯМР белков $\alpha(1-209)\text{F}$ (а) и [Trp60Phe]- $\alpha(1-209)\text{F}$ (б) после повторной сборки в присутствии 0.05% SDS (50 мМ Трис-НСl, рН 8.0).

равномерного включения фтора в разные остатки триптофана, можно полагать, что сигнал в спектре рис. 5в отвечает остатку Trp(F)60. Следует отметить, что повторный рефолдинг в присутствии 0.05% SDS, о полезном эффекте которого свидетельствуют приведенные данные ^{19}F -ЯМР

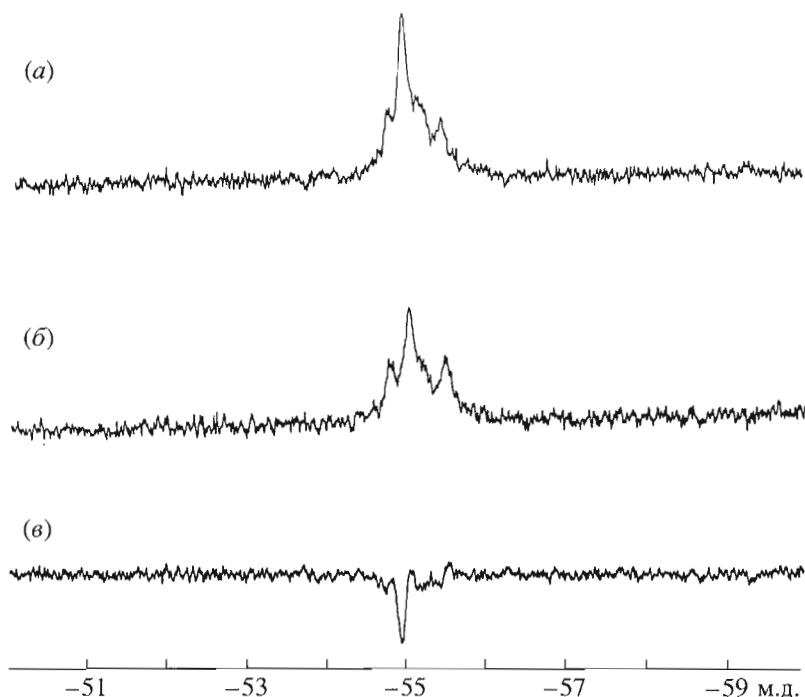


Рис. 5. Спектры ^{19}F -ЯМР белков $\alpha(1-209)\text{F}$ (а) и [Trp60Phe]- $\alpha(1-209)\text{F}$ (б), снятые в присутствии 2% SDS и 100 мМ β -меркаптоэтанола. (в) – разностный спектр (б) и (а). Химические сдвиги указаны относительно CF_3COOH (10^{-5} М).

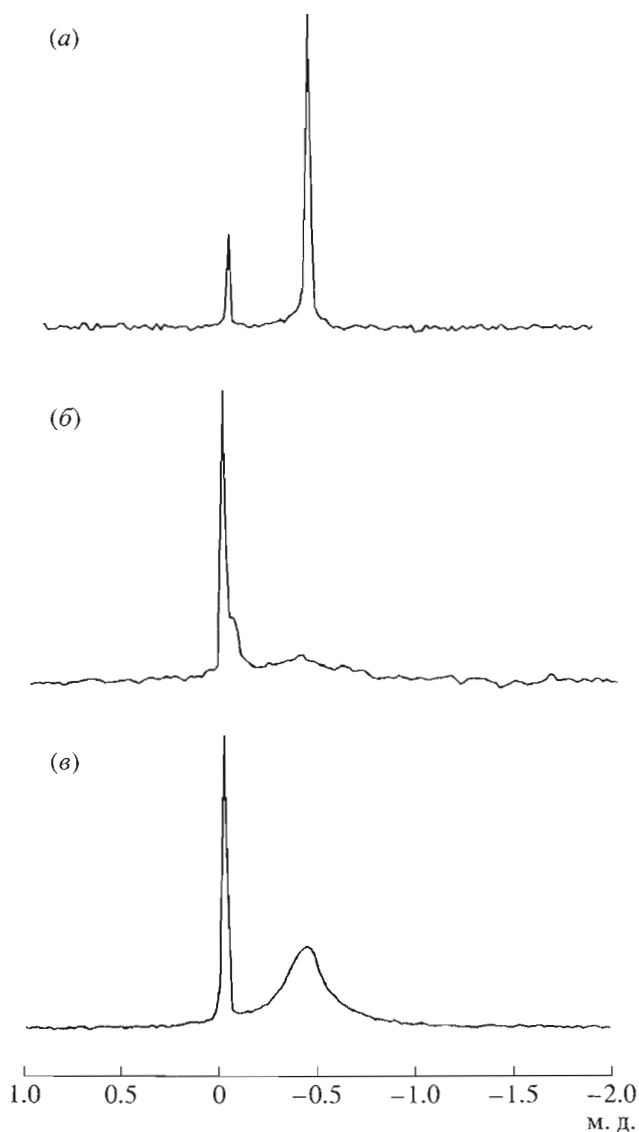


Рис. 6. Спектр ^{19}F -ЯМР $[\text{CF}_3\text{CO-Lys}^{23}]$ - α -кобратоксина в свободном виде (а) и в присутствии белка $\alpha(1-209)\text{F}$ в соотношении 1 : 1 (б) и 1 : 2 (в) (приведена область сигналов CF_3CO -группы). (а) водный раствор токсина 0.3 мг/мл, химический сдвиг указан относительно CF_3COOH (10^{-5} М); острый сигнал при 0.0 м.д. здесь и на спектрах (б) и (в) принадлежит следам протонов CF_3COO^- в токсине, лиофилизованном после ВЭЖХ в градиенте ацетонитрила в присутствии 0.1% CF_3COOH .

(рис. 3г), был недавно использован нами при получении мономерной формы ЭД $\alpha 7$ -субъединицы нейронального АХР [17] (для этого ЭД характерна в еще большей степени, чем для ЭД α -субъединицы АХР *Torpedo*, склонность к агрегации).

Опыты с использованием радиоактивно меченного α -бунгаротоксина (α -Bgt) показали, что ^{19}F -содержащий домен $\alpha(1-209)\text{F}$ и его Trp60Phe-мутант связывают токсин с $K_d \sim 100$ нМ (данные не приведены), подобно полученному ра-

нее соответствующему белку, не содержащему атомов фтора [8]. Взаимодействие белков с α -нейротоксинами было проанализировано также методом ^{19}F -ЯМР с регистрацией как сигнала трифторацетилированного производного α -кобратоксина (рис. 6), так и сигналов Trp(F)-содержащего белка $\alpha(1-209)\text{F}$ в свободном состоянии и в комплексе. Преимущество ^{19}F -ЯМР-титрования по сравнению с радиолигандным анализом состоит в отсутствии необходимости удалять промывками избыток токсина, что может приводить к занижению определяемого числа центров связывания, если прочность комплекса недостаточно высока.

Практически полное уширение сигнала ^{19}F трифторацетильной группы $[\text{CF}_3\text{CO-Lys}^{23}]$ - α -кобратоксина (полученного, как описано в работе [18]) при соотношении токсин-домен 1 : 1 (рис. 6б) и появление его вновь при соотношении 2 : 1 (рис. 6в) указывает на образование стехиометрического комплекса. Однако добавление одного эквивалента токсина к раствору домена вызывало лишь очень небольшие изменения в области сигналов остатков Trp(F) (данные не приведены).

Полученные в настоящей работе результаты можно просуммировать следующим образом: нам удалось включить остатки 5-фтортриптофана в экстрацеллюлярный домен α -субъединицы ацетилхолинового рецептора *T. californica* и найти условия, в которых ^{19}F -ЯМР-спектр соответствующего белка характеризуется достаточным разрешением. Показана принципиальная возможность отнесения сигналов в ^{19}F -ЯМР-спектрах фторированного белка с использованием мутантов. Согласно данным радиолигандного анализа для иодированных и ^{19}F -ЯМР для трифторацетилированных производных, полученные домены обладают способностью специфически связывать α -нейротоксины змей. Для того чтобы на основании сигналов остатков 5-фтортриптофана в спектрах ^{19}F -ЯМР можно было получить информацию о пространственной структуре экстрацеллюлярного домена и участках этого домена, вовлеченных в связывание α -нейротоксинов и других лигандов, потребуются дальнейшие усилия по увеличению степени включения фторсодержащих аминокислот и оптимизации условий ренатурации белка.

Актуальность получения и исследования ЭД субъединиц фармакологически различных типов АХР подтверждают появившиеся во время выполнения настоящей работы рентгеноструктурные данные для ацетилхолинсвязывающего белка из улитки *Lymnaea stagnalis*, который может рассматриваться как прототип ЭД АХР [19], а также новое сообщение [20] о получении ЭД α -субъединицы мышечного АХР человека для функциональных и структурных исследований.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клонирование кДНК, соответствующей N-концевому домену (аминокислотные остатки 1–209) α -субъединицы ацетилхолинового рецептора *T. californica*. Соответствующий фрагмент кДНК получали методом ПЦР, используя в качестве матрицы кДНК полноразмерной α -субъединицы [8]. Для амплификации были использованы два олигонуклеотидных праймера (5' → 3'):

AA AAA GGA TCC GAA CAT GAA ACA CGT TTG GTT GCT AAT (N-концевой) и AAA AAD AGC TTA ACG CTG CAT GAT TTT ATG GTA GGT GAT A (C-концевой). Полученный в результате ПЦР фрагмент ДНК обрабатывали рестриктазами *Bam*HI/*Hind*III (сайты подчеркнуты) и лигировали в плазмидный вектор pQE-30 (Qiagen), обработанный соответствующими ферментами рестрикции.

Мутагенез. Замену остатка Trp на Phe в 60-положении проводили методом ПЦР, используя в качестве матрицы вектор $\alpha(1-209)$ pQE [8]. Последовательности мутагенных праймеров содержат рестриктный сайт *Cl*AI (подчеркнуто):

GG CAG CAA TTT ATC GAT GTG AGG CTT CGC (прямой), GCG AAG CCT CAC ATC GAT AAA TTG CTG CC (обратный).

Праймеры содержат замены нуклеотидов: вместо триплета TGG, кодирующего Trp60, находится последовательность TTT (Phe) (прямой праймер) и соответственно вместо CCA – последовательность AAA (обратный праймер).

В качестве фланкирующих использовали те же праймеры, что и для получения немутантного рекомбинантного белка. Полученный в результате ПЦР фрагмент ДНК лигировали в плазмидный вектор pQE-30 по рестриктным сайтам *Bam*HI/*Hind*III.

Последовательности полученных клонированных фрагментов были секвенированы по методу Сенгера. Клонирование и мутагенез проводили в клетках *E. coli* штамма JM109. Для экспрессии использовали штамм AD494.

Получение белков $\alpha(1-209)$ F и [Trp60Phe]- $\alpha(1-209)$ F. Клетки *E. coli* AD494, содержащие рекомбинантную плазмиду $\alpha(1-209)$ pQE [8], выращивали в среде LB до оптического поглощения $A_{600} = 1$. Полученную биомассу центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 мин и осадок два раза промывали средой M9. Клетки суспендировали в M9 из расчета получить оптическое поглощение $A_{600} = 1$, затем добавляли 20 мг 5F-L-триптофана с конечной концентрацией 100 мкМ, биотин и тиамин по 0.1 мг (100 мкл р-ра 1 мг/мл) на 200 мл клеточной суспензии. Выращивали 15 мин при 37°C, затем вносили IPTG до 1 мМ и еще через 4 ч центрифугировали. Осадок клеток суспендировали в 4 мл буфера (10 мМ Трис-НСl, рН 8.0, 1 мМ EDTA), добавляли 1 мг лизоцима

(100 мкл р-ра 10 мг/мл), выдерживали 30 мин на льду, затем инкубировали 30 мин при 37°C с 4 мг дезоксихолевой кислоты (суспензия в 1 мл воды) и еще 10 мин с MgCl₂ (конечная концентрация 20 мМ) и 20 мкг ДНК-азы. К полученной суспензии добавляли 20 мл буфера А1 (10 мМ Трис-НСl, рН 8.0) и обработали ультразвуком (5 имп. по 1 мин). Центрифугировали 10 мин при 10000 об/мин и осадок промыли 20 мл буфера А1. Затем осадок растворяли в 10 мл буфера А2 (50 мМ Трис-НСl, рН 8.0, 0.2 М NaCl, 5 мМ имидазол, 8 М мочевины) и нанесли на 5 мл Ni-NTA-агарозы. Промыли тем же буфером, а затем специфически связанный белок смыли элюирующим буфером А2 с 1 М имидазолом.

Рефолдинг полученного таким образом белка $\alpha(1-209)$ F проводили с помощью медленного диализа против 50 мМ Трис-НСl-буфера, рН 8.0, в котором ступенчато понижали концентрацию мочевины (в условиях, использованных ранее [8] для белка, не содержащего фторированных аминокислот).

Мутантный белок [Trp60Phe]- $\alpha(1-209)$ F получен аналогичным образом.

Повторный рефолдинг белков $\alpha(1-209)$ F и [Trp60Phe]- $\alpha(1-209)$ F. Образцы белков (1.0 мг/мл) в 5 мл буфера (50 мМ Трис-НСl, рН 8.0) диализовали против 50 мМ Трис-НСl, рН 9.5 с 8 М мочевиной, затем добавляли дитиотреит до конечной концентрации 100 мМ и инкубировали 10 ч при 20°C. После этого раствор медленно по каплям при постоянном помешивании вносили в 50 мл 50 мМ Трис-НСl-буфера, рН 8.0, содержащего 0.05% SDS, и оставили на 20 ч при 7°C. Белок концентрировали ультрафильтрацией на мембране UM10 и подвергли диализу против 20 мМ Трис-НСl, рН 8.0, с 0.05% SDS.

Радиолигандный анализ взаимодействия доменов с α -нейротоксинами. К растворам белков (концентрация 500 нМ) в 50 мМ Трис-НСl-буфере, рН 8.0, добавляли [^{125}I]- α -Bgt [8] в том же буфере до конечной концентрации 50–2000 нМ и инкубировали 1 ч при 30°C. Т.е. растворы белка, которые содержали 0.05% SDS, перед проведением радиолигандного анализа разбавляли водным буфером так, что конечная концентрация SDS не превышала 0.001% и не оказывала влияния на связывание. Для определения неспецифического связывания в инкубационную смесь добавляли 1000-кратный избыток немеченого α -Bgt (Sigma). Далее смесь наносили на фильтры DE-81, которые затем промывали тем же буфером в присутствии 0.1% Тритон X-100, высушивали на воздухе и измеряли их радиоактивность на γ -счетчике.

ЯМР-исследования. Одномерные спектры ^{19}F -ЯМР получены на спектрометре Avance DRX 500 (Bruker, Германия) с рабочей частотой на фторе 470.56 МГц без развязки спин-спинового взаимо-

действия ^{19}F - ^1H при температуре 30°C . Для восстановления равновесного состояния системы ядерных спинов была использована задержка $\sim d_1$ 2.0 с. Данные ЯМР обрабатывали с помощью стандартного программного обеспечения XWINNMR 2.6 (Bruker). Концентрации белков в растворах для снятия спектров лежали в диапазоне 1.5–3.5 мг/мл.

Авторы выражают признательность за ценные советы д-ру К. Метфесселю.

Работа поддержана фирмой Байер (Лeverкузен, Германия), а также грантами РФФИ № 00-04-55024 и Миннауки № 96-03-08.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Changeux J.P., Edelstein S.J.* // *Neuron*. 1998. V. 21. P. 959–980.
2. *Lindstrom J.* // *Handbook Exper. Pharmacol.* 2000. V. 144. P. 101–162.
3. *Hucho F., Tsetlin V., Machold J.* // *Eur. J. Biochem.* 1996. V. 239. P. 539–557.
4. *Miyazawa A., Fujiyoshi Y., Stowell M., Unwin N.* // *J. Mol. Biol.* 1999. V. 288(4). P. 765–786.
5. *Barkas T., Mauron A., Roth B., Alliod C., Tzartos S., Ballivet M.* // *Science*. 1987. V. 235. P. 77–80.
6. *West A.P., Bjorkman P.J., Dougherty D.A., Lester H.A.* // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. P. 25468–25473.
7. *Кривошеин А.В., Куделина И.А., Алексеев Т.А., Шевалье А.Ф., Уткин Ю.Н., Цетлин В.И.* // *Биоорганическая химия*. 1998. Т. 24. С. 930–932.
8. *Alexeev T., Krivoshein A., Shevalier A., Kudelina I., Telyakova O., Vincent A., Utkin Y., Hucho F., Tsetlin V.* // *Eur. J. Biochem.* 1999. V. 259. P. 310–319.
9. *Schrattenholz A., Pfeiffer S., Pejovic V., Rudolph R., Godovac-Zimmermann J., Maelicke A.* // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273(49). P. 32393–32399.
10. *Tsouloufis T., Mamalaki A., Remoundos M., Tzartos S.J.* // *Int. Immunol.* 2000. V. 12. P. 1255–1265.
11. *Gerig J.T.* // *Fluorine Magnetic Resonance in Biochemistry*. 1978.
12. *Gerig J.T.* // *Progress in NMR Spectroscopy*. 1994. V. 26. P. 293–370.
13. *Практическая химия белка / Ред. А. Дарбре. М.: Мир, 1989. 623 с.*
14. *Tzartos S.J., Changeux J.P.* // *EMBO J.* 1983. V. 2. P. 381–387.
15. *Donnelly-Roberts D.L., Lentz T.L.* // *Mol. Brain. Res.* 1993. V. 19. P. 55–61.
16. *Arseniev A.S., Utkin Yu.N., Pashkov V.S., Tsetlin V.I., Ivanov V.T., Bystrov V.F., Ovchinnikov Yu.A.* // *FEBS Lett.* 1981. V. 136. P. 269–274.
17. *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. V. 269. P. 2801–2809.
18. *Кондаков В.И., Арсеньев А.С., Уткин Ю.Н., Карлсон Е., Гуревич А.З., Цетлин В.И., Быстров В.Ф., Иванов В.Т.* // *Биоорганическая химия*. 1984. Т. 10. С. 869–890.
19. *Brejc K., van Dijk W.J., Klaassen R.V., Schuurmans M., van Der Oost J., Smit A.B., Sixma T.K.* // *Nature*. 2001. V. 411. P. 269–276.
20. *Yao Y., Wang J., Viroonchatapan N., Samson A., Chill J., Rothe E., Anglister J., Wang Z.Z.* // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 12613–12621.

5-Fluorotryptophan-Containing N-Terminal Domain of the α -Subunit of the *Torpedo californica* Acetylcholine Receptor: Preparation in *Escherichia coli* and ^{19}F NMR Study

T. A. Alexeev[#], N. I. Dergousova, E. D. Shibanova, E. A. Azeeva, E. V. Kryukova, T. A. Balashova, P. V. Dubovskii, A. S. Arseniev, and V. I. Tsetlin

[#] Phone: +7 (095) 330-7374; e-mail: t_alex@freemail.ru

Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP Moscow, 117997 Russia

A protein corresponding to the extracellular 1–209 domain of the α -subunit of the nicotine acetylcholine receptor from the electric organ of *Torpedo californica* was prepared using the corresponding cDNA domain by culturing *Escherichia coli* cells on a synthetic medium supplemented with 5-fluoro-L-tryptophan. The presence of a (His)₆ fragment preceding the 1–209 sequence allowed purification of the protein isolated from inclusion bodies by affinity chromatography on Ni-NTA Agarose. The incorporation of 5-fluorotryptophan residues was found by ^{19}F NMR to be $\sim 50\%$. The spectrum of the protein reduced under denaturing conditions and subsequently reoxidized in a dilute solution under denaturing conditions in the presence of 0.05% SDS was sufficiently resolved, which allowed partial assignment of ^{19}F resonances using the Trp60Phe mutant protein. The ability of the prepared domains to specifically bind snake α -neurotoxins was demonstrated with the use of radioiodinated α -bungarotoxin and trifluoroacetylated α -cobratoxin. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2003, vol. 29, no. 4; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: acetylcholine receptor, refolding, NMR spectrum; α -subunit, fluorine-containing receptor domain