

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ТРАНСМЕМБРАННОГО ДОМЕНА БЕЛКА-ПРЕДШЕСТВЕННИКА АМИЛОИДА, АССОЦИИРОВАННОГО С БОЛЕЗНЬЮ АЛЬЦГЕЙМЕРА

© 2009 г. О. В. Бочарова[#], К. Д. Надеждин, Э. В. Бочаров, А. С. Арсеньев

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 07.05.2009 г. Принята к печати 17.06.2009 г.

Более половины мутаций мембранного белка амилоидного предшественника (amyloid precursor protein – APP), обнаруженных при семейных формах болезни Альцгеймера, приходится на его трансмембранный (ТМ) домен. Патогенные мутации, как предполагают, влияют на латеральную димеризацию ТМ-домена APP в мембране, изменяя конформацию димера и/или его стабильность, что вызывает альтернативное расщепление APP в мембране и в итоге появление нейротоксичного амилоидного бета-пептида. Для детального исследования специфических белок-белковых и белок-липидных взаимодействий ТМ-домена была создана конструкция для получения рекомбинантного белка в *E. coli*. Рекомбинантный белок содержит ТМ-домен APP (APP_{tm}(686–726)) с прилегающими внемембранными N- и C-концевыми участками. Отработана методика получения изотопно-меченных белков в количествах, необходимых для структурно-динамических исследований с помощью гетероядерной ЯМР-спектроскопии. На основе спектров ¹H-¹⁵N-HSQC подобраны условия солюбилизации APP_{tm}(686–726) в детергентных мицеллах и липидных бицеллах, имитирующих бислоюную мембрану.

Ключевые слова: болезнь Альцгеймера; белок-предшественник амилоида; трансмембранный домен; ЯМР-спектроскопия.

ВВЕДЕНИЕ

Нейродегенеративная болезнь, впервые описанная немецким врачом А. Альцгеймером в 1907 г. как дегенеративное заболевание головного мозга, проявляющееся прогрессирующим снижением интеллекта, является одной из распространенных форм приобретенного слабоумия. Функциональные нарушения в организме по мере развития заболевания сопровождаются патологическими изменениями в зонах коры головного мозга, приводящими в итоге к параличу и смерти. Ежегодно болезнью Альцгеймера заболевает до 5 млн человек, что ставит ее на четвертое место в ряду причин смерти в промышленно развитых странах [1, 2]. Клинические проявления болезни объясняются избирательной дегенерацией нейронов в участках коры

Сокращения: APP – белок-предшественник амилоида (amyloid precursor protein); ТМ – трансмембранный; APP_{tm} – ТМ-домен APP_{686–726}; IPTG – изопропил-β-D-тиогаляктозид; DPC – додецилфосфохолин; DMPC – димиристоилфосфатидилхолин; DHPC – дигексаноилфосфатидилхолин; Ttx – тиоредоксин; ¹H-¹⁵N-HSQC – гетероядерная одноквантовая корреляция; TFE – трифторэтанол; MXAX – металлохелатная аффинная хроматография.

[#] Автор для связи (тел.: (495) 330-74-83*127; факс: (495) 335-50-33; эл. почта: o.bocharova@gmail.com).

головного мозга, ответственных за когнитивное восприятие и память [1]. Вне нервных клеток, в местах контакта нейронов, накапливается амилоидный пептид, который собирается в упорядоченные тяжи, фибриллы, образующие так называемые амилоидные бляшки [1]. Наличие гидрофобных белковых агрегатов приводит к нарушению передачи нервного импульса, что в свою очередь ведет к гибели «дефектных» нервных клеток [1, 3, 4]. Амилоидный бета-пептид (A β) является продуктом последовательного расщепления белка амилоидного предшественника (APP – amyloid precursor protein) бета- и гамма-секретазами [1, 5]. A β вырабатывается в небольших количествах в организме и имеет длину от 38 до 43 а.о., при этом наиболее распространенные изоформы имеют 40 и 42 а.о. [1, 3, 4]. В норме количественное соотношение пептидов A β ₁₋₄₂/A β ₁₋₄₀ низкое – около 1/9, но при болезни Альцгеймера это соотношение сильно возрастает, что приводит к образованию амилоидных бляшек [1, 3, 4]. В то же время ряд экспериментальных данных свидетельствует о том, что олигомерные формы A β (в том числе внутриклеточные) могут обладать нейротоксичным эффектом еще до формирования фибрилл и бляшек [1, 3, 4].

APP димеризуется в плазматической мембране и имеет многодоменную структуру интегрального белка, содержащего район, богатый цистеином, "кислый" фрагмент и два предполагаемых участка гликозилирования по остаткам аспарагина во внеклеточном домене, один трансмембранный (ТМ) домен и С-концевой внутриклеточный домен [5]. Более половины всех мутаций APP при семейных формах болезни Альцгеймера приходится именно на его ТМ-домен [6]. На сегодняшний день выдвинута гипотеза о том, что данные патогенные мутации влияют на латеральную димеризацию ТМ-домена APP в мембране, изменяя конформацию димера и/или его стабильность, что является вероятной причиной альтернативного расщепления APP гамма-секретазой в мембране и преобладания патогенного A β ₁₋₄₂ над A β ₁₋₄₀ [6–8]. Показано, что ТМ-домен APP и его примембранные участки специфически взаимодействуют с мембранным окружением, в частности с холестерином, что также может влиять на димеризацию ТМ-домена и расщепление APP секретазами [9, 10]. Таким образом, установление пространственной организации ТМ-домена APP и изучение механизмов, управляющих его димеризацией, является актуальной задачей молекулярной биологии и медицины.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение рекомбинантного трансмембранного домена APP₆₈₆₋₇₂₆ (APP_{tm}). Для наработки APP_{tm} в бактериях была создана гибридная конструкция (рис. 1), в которой в качестве белка-носителя использовали тиоредоксин *E. coli* – белок с молекулярной массой ~ 12

кДа. Между последовательностями тиоредоксина и APPtm встраивалась последовательность из шести остатков гистидина (His₆-tag) для очистки гибридного белка и сайт узнавания тромбином (LVPRGS). Тромбин сохраняет ферментативную активность и специфичность в присутствии детергентов, необходимых для солюбилизации и последующего протеолиза гибридного белка; другим его важным достоинством является дешевизна и доступность. После расщепления этим ферментом на N-конце APPtm остается дипептид GS, что, по нашим предыдущим данным [11], не должно влиять на специфическое взаимодействие TM-доменов белков. Аминокислотная последовательность полученного TM-фрагмента APP показана на рис. 1.

Оптимизация условий экспрессии. Для наработки гибридного белка использовали клетки штамма *E. coli* BL21(DE3)pLysS, обеспечивающие низкий фоновый уровень индукции гена, что является важным фактором при экспрессии генов токсичных для клеток белков, таких, как TM-пептиды. Известно, что один из способов получения растворимой формы рекомбинантного белка – культивация клеток при низких температурах. Также известно, что высокая скорость роста до индукции не всегда приводит к накоплению целевого белка при последующем понижении температуры [12]. Исходя из этого, подбор оптимальной концентрации индуктора проводили на клеточных культурах, растущих при 28°C до индукции и при 13°C после добавления индуктора. Максимальный уровень синтеза рекомбинантного Ttx-APPtm наблюдали в присутствии 50 мкМ IPTG при культивации как на бедной среде M9, так и на богатой ТВ (рис. 2). На богатой среде гибридный белок накапливался в максимальных количествах в течение первых суток роста (выход 200 мг/л культуры), а на бедной среде M9 (включая рост на ¹⁵N- и ¹³C-содержащих средах с добавлением totally меченых ¹⁵NH₄Cl и (¹³C)глюкозы) – через 60–70 ч (выход 60 мг/л культуры).

Очистка APPtm. Первой стадией очистки Ttx-APPtm являлась металлохелатная (MX) аффинная хроматография на колонке с Ni-хелатирующей сефарозой. Все буферные растворы, используемые в процессе очистки, содержали 1% Тритона X-100. Такая концентрация не мешала расщеплению гибридного белка тромбином и способствовала поддержанию APPtm в растворимой форме после отщепления белка-носителя. Гибридный белок прекрасно связывался с MX-сорбентом и элюировался 150 мМ имидазолом (рис. 3a). Интересно отметить, что в полученном образце присутствует небольшое количество димеров Ttx-APPtm (рис. 3a, дорожки 5–10).

Было установлено, что оптимальным для протеолиза является соотношение E/S 1 ед. акт. на 1 мг гибридного белка, и наиболее эффективно гидролиз проходит после снижения концентрации NaCl и имидазола в реакционной смеси до 50 и 30 мМ, соответственно. На рис. 3б

показан результат расщепления гибридного белка тромбином с последующей вычитающей хроматографией на колонке с Ni-хелатирующей сефарозой. После отделения Тритона X-100 (см. «Эксперимент. часть») от полученного таким образом образца APPtm была проведена проверка его чистоты. Для этого изотопно-меченный препарат APPtm растворяли в смеси хлороформ–метанол–вода (5 : 5 : 1) и проверяли наличие примесей с помощью ЯМР-спектроскопии. Полученные спектры ^1H - ^{15}N -HSQC рекомбинантного ^{15}N -меченного APPtm (см. ниже рис. 5a) свидетельствовали о наличии 10–12 мол.% примеси пептидной природы (наличие минорных кросс-пиков в спектре ЯМР).

Для получения более чистого образца, препарат APPtm подвергали обращенно-фазовой ВЭЖХ (офВЭЖХ) на колонке Resource PRC. Образец APPtm наносили на колонку в смеси трифторэтанол (TFE)/вода в соотношении 4/6, содержащей также 0.1% трифторуксусной кислоты (TFA). Типичный профиль элюции при офВЭЖХ пептида показан на рис. 4. Пик 2 соответствовал элюции APPtm, что было подтверждено анализом молекулярной массы (4445 Да для немеченого образца) с помощью времяпролетной MALDI-масс-спектрометрии (данные не показаны). В спектре ЯМР (рис. 5б) наблюдаемое число кросс-пиков соответствовало ожидаемому, исходя из аминокислотной последовательности APPtm.

APPtm в детергентных мицеллах и липидных бицеллах. Современная гетероядерная спектроскопия ЯМР позволяет установить структуру и детально описать внутримолекулярную динамику мембранных белков и их комплексов в окружении, близком природному. Однако для этого необходим подбор среды, имитирующей нативную клеточную мембрану. Наиболее распространенной средой для изучения мембранных белков методом гетероядерной спектроскопии ЯМР высокого разрешения являются мицеллы, состоящие из детергентов или коротких липидов, и липидные бицеллы, состоящие из смеси коротких и длинных липидов [13, 14]. Ранее на основе комплексного подхода [15] нами была исследована специфическая димеризация ТМ-доменов белков из разных семейств [11, 12, 16, 17] с использованием мицелл и бицелл различного состава. В данной работе для солюбилизации в качестве среды были также выбраны мицеллы и бицеллы различного состава.

По данным ^1H - ^{15}N -ЯМР, детергентные мицеллы из додецилфосфохолина (DPC) и липидные бицеллы из димиристоилфосфатидилхолина (DMPC)/ дигексаноилфосфатидилхолина DHPC (1 : 4 моль : моль) оказались приемлемыми для солюбилизации APPtm как в мономерном, так и (предположительно) в димерном состоянии с целью проведению дальнейших структурных исследований. В спектрах ^1H - ^{15}N -HSQC (рис. 5в, г) тотально ^{15}N -меченного пептида APPtm общее количество кросс-пиков от амидных групп совпадало с ожидаемым в соответствии с

первичной структурой APP_{tm}. Наблюдалось все пять сигналов от остатков глицинов и сигналы от боковых цепей Gln⁶⁸⁶ и Asn⁶⁹⁸. Характерная дисперсия химических сдвигов кросс-пиков в спектрах ¹H-¹⁵N-HSQC и варьирование полуширины кросс-пиков по протонному направлению от 15 Гц для предположительно экспонированных в воду *N*- и *C*-концевых подвижных участков до 25 Гц для ТМ-сегмента указывают на то, что ТМ-домен APP_{tm} встроен в мицеллу или бицеллу и имеет альфа-спиральную конформацию. Помимо этого, при изменении молярного соотношения пептид/детергент или пептид/липид в диапазоне от 80 до 30, что соответствует от 1 до 2 молекул пептида на мицеллу или бицеллу, наблюдалось дублирование сигналов в спектрах ЯМР, по-видимому, из-за конформационных переходов мономер-димер.

Таким образом, предложенная стратегия экспрессии, очистки и солюбилизации позволяет получать ТМ-домен белка амилоидного предшественника, встроенного в мембраноподобное окружение, в количестве, достаточном для структурно-динамических исследований спектроскопией ЯМР высокого разрешения. Данная стратегия в дальнейшем будет использована для получения и изучения описанных в литературе мутантов APP по ТМ-домену, ассоциированных с болезнью Альцгеймера.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Штаммы и плазмиды. В работе использовали штаммы *E. coli* XL-1 Blue (Stratagene, США) и BL21(DE3)pLysS (Novagene, США). Плазмидная ДНК pGEMEX/TRX была любезно предоставлена А.А. Шульгой (лаборатория инженерии белка ИБХ РАН).

Ферменты. В работе использовали эндонуклеазы рестрикции, Pfu-полимеразу, ДНК-лигазу фага T4 производства Fermentas (Литва), тромбин “Технология-стандарт” (Россия).

Олигонуклеотиды и секвенирование генов. Олигонуклеотиды синтезированы фирмой «Evrogen» (Москва) на установке ABI 3900 (Applied Biosystems, США). Определение нуклеотидной последовательности ДНК проводили в Центре коллективного пользования “Геном” (ИМБ РАН) на автоматическом секвенаторе ABI3100 (Applied Biosystems, США).

Масс-спектрометрический анализ образца APP_{tm} был проведен в лаборатории нейрорецепторов и нейрорегуляторов ИБХ РАН с помощью метода матрично-активируемой лазерной десорбции-ионизации (МАЛДИ) на МАЛДИ-времяпролетном масс-спектрометре MALDI-LR (Micromass, Великобритания).

Реактивы. В работе использовали неорганические соли и органические растворители следующих фирм-производителей: Fluka (Швейцария), Sigma (США), Gerbu (Германия), Merk (Германия); бакто-триптон, дрожжевой экстракт, бакто-агар (Becton, Dickinson and Co., США); ампициллин, хлорамфеникол (Sigma, США); 99% $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$, 99% (^{13}C)глюкозу (Cambridge Isotope Laboratories, США); маркеры молекулярных масс белковых молекул и ДНК (Fermentas, Латвия). Для выделения ДНК из агарозных гелей и плазмидной ДНК использовали наборы фирмы «Qiagen» (США).

Липиды и детергенты. В работе использовали DPC (Anatrace, США), DMPC (Avanti Polar Lipids, США), DHPC (Sigma, США).

Хроматографические колонки и смолы. Ni-хелатирующая сефароза, колонка для оФВЭЖХ Resource PRC производства GE Healthcare Bio-Sciences (Швеция).

Конструирование экспрессионной плазмиды pGEMEX/TRX-APPtm. Матрицу для амплификации гена APPtm собирали при помощи ПЦР с использованием фланкирующих праймеров. Для последующей рекомбинации и клонирования на 5'-конце гена был предусмотрен сайт узнавания тромбином, а на 3'-конце – сайт рестрикции BamHI. Ген тиоредоксина амплифицировали с использованием вектора pGEMEX/TRX, включая сайт узнавания тромбином. Полученные в результате двух ПЦР продукты рекомбинировали, гидролизовали эндонуклеазами рестрикции RsrII и BamHI и лигировали с обработанным теми же рестриктазами вектором. ДНК выделенных клонов анализировали с помощью ПЦР и сиквенировали в пределах вставки.

Препаративная экспрессия pGEMEX/TRX-APPtm. Клетки штамма *E. coli* BL21(DE3)pLysS трансформировали плазмидным вектором pGEMEX/TRX-APPtm, высевали на чашку Петри с ампициллином и хлорамфениколом и инкубировали при 37°C в течение ночи. Культуру клеток инокулировали свежими колониями из расчета 1 колония на 1 мл среды Terrific Broth (TB) или минимальной M9 [18, 19]. Культуру выращивали в колбах Эрленмейера объемом 2 л по 250 мл среды на колбу при температуре 28°C и 250 об/мин на орбитальном шейкере до достижения значений оптической плотности при 550 нм 0.8 или 1.5 ОЕ (для TB и M9 сред, соответственно). Далее добавляли IPTG до конечной концентрации 0.05 мМ и инкубировали в течение 24 или 72 ч (для бедной и богатой сред, соответственно) при температуре 13°C и 250 об/мин.

Выделение и очистка APPtm. Клетки с 200 мл TB или 500 мл M9 собирали центрифугированием и лизировали в 50 мл буфера А (50 мМ Трис-НСl pH 8.0, 4 М мочевины,

0.25 М NaCl, 1% Тритона X-100, 10 мМ имидазол, 10 мМ β-меркаптоэтанол, 0.1 мМ фенилметилсульфонилфторид). Суспензию обрабатывали 7 раз на ультразвуковом дезинтеграторе Bandelin Sonopuls Ultrasonic Homogenizer HD 2200 мощностью 150 Вт в течение 30 с интервалами по 5 мин между циклами, на льду, и центрифугировали в течение 20 мин, при 15000 g. Колонку с Ni-сефарозой уравнивали буфером А и наносили лизат. Колонку отмывали от не связавшегося с нею белка и мочевины буфером Б (буфер А без мочевины) и буфером В (буфер Б с 30 мМ имидазолом). Белок элюировали буфером Е (буфер Б с 150 мМ имидазолом). Элюат разбавляли в 5 раз буфером Д (50 мМ Трис-НСl рН 8.0, 1% Тритона X-100, 20 мМ β-меркаптоэтанол) для последующего гидролиза и хроматографии. Анализ фракций элюата осуществляли при помощи электрофореза в 12% ПААГ [20].

Расщепление гибридного белка тромбином проводили при комнатной температуре в течение 16–18 ч из расчета 1 ед. фермента на 1 мг гибридного белка. После центрифугирования в течение 20 мин при 15000 g продукты гидролиза наносили на колонку с Ni-сефарозой, уравновешенную буфером В. Не связавшийся с колонкой APPtm осаждали добавлением 1/10 объема ТСА. После 15-минутной инкубации при –20°C содержимое пробирки центрифугировали при 12000 g в течение 15 мин. Для удаления Тритона X-100 белковый осадок трижды отмывали ацетоном, инкубируя по 15 мин при –20°C, после чего осадок высушивали под вакуумом в эксикаторе.

Для последующей очистки методом офВЭЖХ полученный осадок растворяли в смеси TFE/вода в соотношении 4 : 6, содержащей 0.1% TFA и наносили на колонку Resource PRC, уравновешенную буфером А2 (2% ацетонитрил, 0.1% TFA в воде). Колонку промывали буфером А2 и элюировали белок градиентом буфера Б2 (0.1% TFA в ацетонитриле) в А2. Анализ фракций элюата осуществляли при помощи электрофореза в 12% ПААГ.

Солюбилизация APPtm в мембраноподобном окружении для ЯМР-исследований.

Для проверки чистоты и конечной идентификации полученные препараты рекомбинантного ¹⁵N-APPtm растворяли в 500 мкл смеси хлороформ–метанол–вода 5 : 5 : 1 до получения гомогенного раствора с концентрацией пептида 0.3–1.0 мМ. Для последующих структурных ЯМР-исследований APPtm в качестве мембраномоделирующей среды были выбраны детергентные мицеллы из DPC и липидные бицеллы из DMPC/DHPC с мольным соотношением липидов, равным 1/4. Сухие препараты DPC или DMPC/DHPC вместе с белком растворяли в смеси TFE–вода 1 : 1, озвучивали в течение нескольких минут в ультразвуковой бане, добиваясь полного растворения всех компонентов и прозрачности раствора и лиофилизовывали в течение ночи. Сухую смесь в дальнейшем растворяли в 10–20 мМ ацетатном буфере (рН 5.0, 5% D₂O).

Для предотвращения заражения образца бактериями добавляли 0.05 мМ NaN_3 , а для ингибирования фосфолипаз – 1 мМ EDTA. Для большей однородности размера мицелл и бицелл проводили несколько циклов охлаждения (для бицелл DMPC/DHPC необходимо охлаждение ниже точки фазового перехода $\sim 10^\circ\text{C}$) и нагревания до $40\text{--}45^\circ\text{C}$, и озвучивали в ультразвуковой бане для достижения полной прозрачности раствора. Общая концентрация детергентов (липидов) рассчитывалась из расчета 1 молекула APPtm на 80 (30–40) молекул детергента (липидов), что обеспечивает содержание 1 или 2 пептида на мицеллу (бицеллу), соответственно. Все образцы готовились из расчета 0.3–1 мМ APPtm в 400 мкл раствора мицелл или бицелл с условием, чтобы концентрация детергентов и липидов была в несколько раз выше критической концентрации мицеллообразования.

Двумерные спектры ^1H - ^{15}N -HSQC получены на ЯМР-спектрометре AVANCE 700 криодатчиком (Bruker) с рабочей частотой на протонах 700 МГц. Для подбора условий была поставлена серия ЯМР-экспериментов с варьированием pH и температуры образца APPtm в мицеллах и бицеллах. Лучшие спектры были получены при pH 4.5–5.5 и температуре $40\text{--}50^\circ\text{C}$. Обработку спектров проводили в программе TOP-SPIN (Bruker).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят А.А. Шульгу (лаборатория инженерии белка ИБХ РАН) за предоставление плазмидной ДНК pGEMEX/TRX, сотрудников лаборатории инженерии белка ИБХ РАН М.В. Гончарук и С.А. Гончарук за консультации при создании экспрессионной конструкции, а также А.А. Василевского (лаборатория нейрорецепторов и нейрорегуляторов ИБХ РАН) за проведенный масс-спектрометрический анализ образца APPtm.

Работа выполнена при поддержке Федерального агентства по науке и инновациям, Российского фонда фундаментальных исследований и программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Григоренко А.П., Рогов Е.И. // Молекуляр. биология. 2007. Т. 41. С. 331–345.
2. Sonkusare S.K., Kaul C.L., Ramarao P. // Pharmacol. Res. 2005. V. 51. P. 1–17.
3. Rauk A. // Dalton Trans. 2008. V. 14. P. 1273–1282.
4. Selkoe D.J. // Nature. 2003. V. 426. P. 900–904.
5. Thinakaran G., Koo E.H. // J. Biol. Chem. 2008. V. 283. P. 29615–29619.
6. Gorman P.M., Kim S., Guo M., Melnyk R.A., McLaurin J., Fraser P.E., Bowie J.U., Chakrabarty A. // BMC Neuroscience. 2008. V. 9. P. 17–27.
7. Munter L.M., Voigt P., Harmeier A., Kaden D., Gottschalk K.E., Weise C., Pipkorn R., Schaefer M., Langosch D., Multhaup G. // EMBO J. 2007. V. 26. P. 1702–1712.
8. Kienlen-Campard P., Tasiaux B., van Hees J., Li M., Huysseune S., Sato T., Fei J.Z., Aimoto S., Courtoy P.J., Smith S.O., Constantinescu S.N., Octave J.N. // J. Biol. Chem. 2008. V. 283. P. 7733–7744.
9. Marenchino M., Williamson P.T., Murri S., Zandomenighi G., Wunderli-Allenspach H., Meier B.H., Krämer S.D. // Biophys. J. 2008. V. 95. P. 1460–1473.
10. Beel A.J., Mobley C.K., Kim H.J., Tian F., Hadziselimovic A., Jap B., Prestegard J.H., Sanders C.R. // Biochemistry. 2008. V. 47. P. 9428–9446.
11. Bocharov E.V., Mineev K.S., Volynsky P.E., Ermolyuk Ya.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. P. 6950–6956.
12. Bocharov E.V., Pustovalova Y.E., Pavlov K.V., Volynsky P.E., Goncharuk M.V., Ermolyuk Y.S., Karpunin D.V., Shulga A.A., Kirpichnikov M.P., Efremov R.G., Maslennikov I.V., Arseniev A.S. // J. Biol. Chem. 2007. V. 282. P. 16256–16266.
13. Krueger-Koplin R.D., Sorgen P.L., Krueger-Koplin S.T., Rivera-Torres I.O., Cahill S.M., Hicks D.B., Grinius L., Krulwich T.A., Girvin M.E. // J. Biomol. NMR. 2004. V. 28. P. 43–57.
14. Page R.C., Moore J.D., Nguyen H.B., Sharma M., Chase R., Gao F.P., Mobley C.K., Sanders C.R., Ma L., Sönnichsen F.D., Lee S., Howell S.C., Opella S.J., Cross T.A. // J. Struct. Funct. Genomics. 2006. V. 7. P. 51–64.
15. Volynsky P.E., Bocharov E.V., Nolde D.E., Vereschaga Ya.A., Mayzel M.L., Mineev K.S., Mineeva E.A., Pustovalova Yu.E., Gagnidze I.E., Efremov R.G., Arseniev A.S. // Biophysics. 2006. V. 51. P. S23–S27.
16. Bocharov E.V., Mayzel M.L., Volynsky P.E., Goncharuk M.V., Ermolyuk Y.S., Schulga A.A., Artemenko E.O., Efremov R.G., Arseniev A.S. // J. Biol. Chem. 2008. V. 283. P. 29385–29395.
17. Artemenko E.O., Egorova N.S., Arseniev A.S., Feofanov A.V. // Biochim. Biophys. Acta. 2008. V. 1778. P. 2361–2367.
18. Miller J.H. // Experiments in Molecular Genetics. N.Y.; Cold Spring Harbor, 1972. P. 433.
19. Sambrook J., Russell D. W. // Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor. N.Y.; Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001.
20. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.

Подписи к рис. ст. Бочаровой и др.

Рис. 1. Схема строения и аминокислотная последовательность гибридного белка APPtm. Серые блоки – последовательности тиоредоксина (Trx) и сайт узнавания тромбином, соответственно. Стрелкой показано место расщепления тромбином, подчеркнута ТМ часть APP.

Рис. 2. Электрофорез клеточного лизата в 12% ПААГ. Дорожки 1–3 – накопление белка на среде М9 после индукции 10, 50 и 250 мкМ IPTG после 30 ч культивирования; 4 – контрольная неиндуцированная культура; 5, 6 – накопление белка на среде ТВ после индукции 10, 50 и 250 мкМ IPTG после 70 ч культивирования; 7 – маркеры молекулярных масс. Полоса, соответствующая гибриднему белку, отмечена стрелкой.

Рис. 3. Очистка APPtm с помощью металлохелатной аффинной хроматографии (электрофорез в 12% ПААГ в Трис-глициновой (а) и Трис-трициновой (б) буферных системах). (а) Дорожка 1 – клеточный лизат; 2 – не связавшийся со смолой белок; 3 – промывка смолы 30 мМ имидазолом; 4 – маркеры молекулярного веса, сверху вниз: 116, 66.2, 45, 35, 25, 18.4 кДа; 5–10 – фракции, элюированные 150 мМ имидазолом. (б) Очистка APPtm после расщепления гибридного белка Trx-APPtm тромбином. Дорожка 1 – маркеры молекулярных масс; 2 – гибридный белок через 5 мин после добавления фермента; 3 – продукты гидролиза гибридного белка (тиоредоксин и APPtm) после 16 ч инкубации с тромбином; 4 – сконцентрированный APPtm, не связавшийся с МХ-колоной; 5 – тиоредоксин, снятый с МХ-колоны буфером с 50 мМ EDTA.

Рис. 4. Очистка APPtm с помощью офВЭЖХ. 1 – область элюции 17–25 мин, содержащая примесные белки; 2 – пик, соответствующий элюции APPtm. Пунктиром показан градиент (1% за 10 мин) буфера Б2, правая шкала.

Рис. 5. Гетероядерные ЯМР-спектры ^1H - ^{15}N -HSQC рекомбинантного тотально ^{15}N -меченного пептида APPtm в мембраноподобных средах: (а) после вычитающей хроматографии (на Ni-хелатирующей сефарозе) в смеси хлороформ–метанол–вода, 5 : 5 : 1 при 30°C; (б) после офВЭЖХ (на колонке Resource PRC) в смеси хлороформ–метанол–вода, 5 : 5 : 1 при 30°C; (в) в водном растворе бицелл DMPC/DHPC (1 : 4) с молярным отношением пептид–липид, равным 1 : 70 (соответствует встраиванию примерно одной молекулы APPtm в бицеллу), pH 4.5, 45°C; (г) в водном растворе мицелл DPC молярным отношением пептид–детергент, равным 1 : 30 (соответствует встраиванию примерно двум молекулам APPtm в мицеллу), pH 4.9, 45°C. Пунктирным овалом выделена область, в которой наблюдаются сигналы от ^{15}NH -групп 5 остатков глицина APPtm. Пунктирной линией соединены кросс-пики от $^{15}\text{NH}_2$ боковых групп остатков Gln⁶⁸⁶ и Asn⁶⁹⁸.



Рис. 1. Схема строения и аминокислотная последовательность гибридного белка APP_{tm}. Серые блоки – последовательности тиоредоксина (Trx) и сайт узнавания тромбином, соответственно. Стрелкой показано место расщепления тромбином, подчеркнута ТМ часть APP.

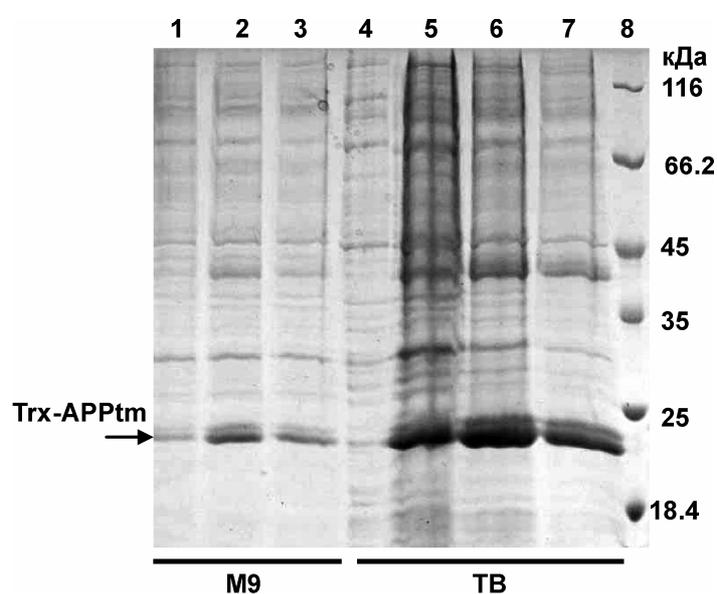


Рис. 2. Электрофорез клеточного лизата в 12% ПААГ. Дорожки 1–3 – накопление белка на среде M9 после индукции 10, 50 и 250 мкМ IPTG после 30 ч культивирования; 4 – контрольная неиндуцированная культура; 5, 6 – накопление белка на среде TB после индукции 10, 50 и 250 мкМ IPTG после 70 ч культивирования; 7 – маркеры молекулярных масс. Полоса, соответствующая гибриднему белку, отмечена стрелкой.

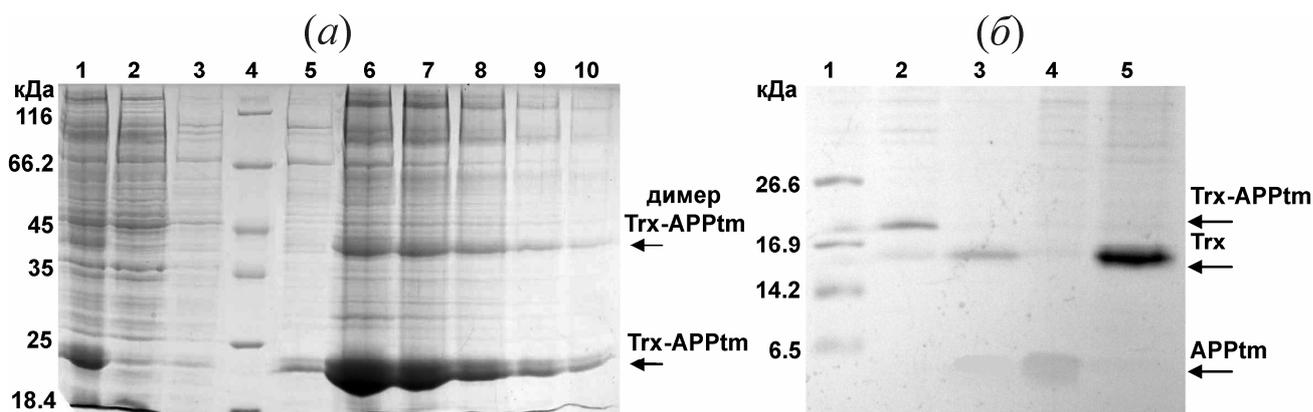


Рис. 3. Очистка APPtm с помощью металлохелатной аффинной хроматографии (электрофорез в 12% ПААГ в Трис-глициновой (а) и Трис-трициновой (б) буферных системах). (а) Дорожка 1 – клеточный лизат; 2 – не связавшийся со смолой белок; 3 – промывка смолы 30 мМ имидазолом; 4 – маркеры молекулярного веса, сверху вниз: 116, 66.2, 45, 35, 25, 18.4 кДа; 5–10 – фракции, элюированные 150 мМ имидазолом. (б) Очистка APPtm после расщепления гибридного белка Trx-APPtm тромбином. Дорожка 1 – маркеры молекулярных масс; 2 – гибридный белок через 5 мин после добавления фермента; 3 – продукты гидролиза гибридного белка (тиоредоксин и APPtm) после 16 ч инкубации с тромбином; 4 – сконцентрированный APPtm, не связавшийся с МХ-колонкой; 5 – тиоредоксин, снятый с МХ-колонки буфером с 50 мМ EDTA.

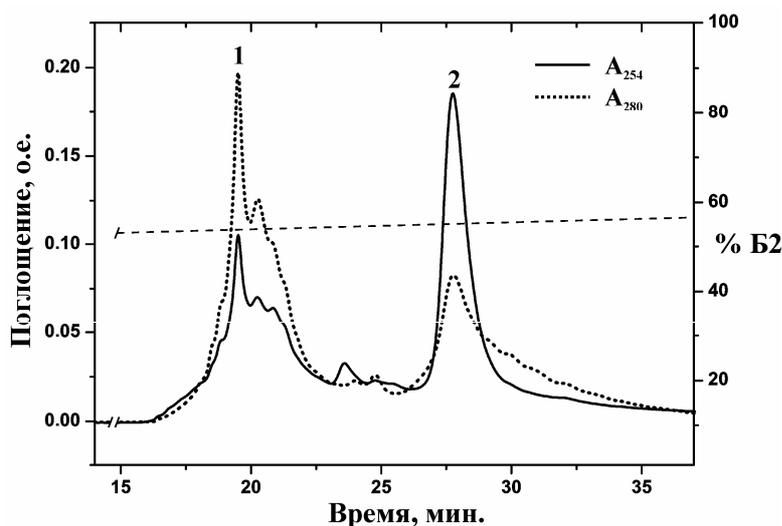


Рис. 4. Очистка APPtm с помощью офВЭЖХ. 1 – область элюции 17–25 мин, содержащая примесные белки; 2 – пик, соответствующий элюции APPtm. Пунктиром показан градиент (1% за 10 мин) буфера Б2, правая шкала.

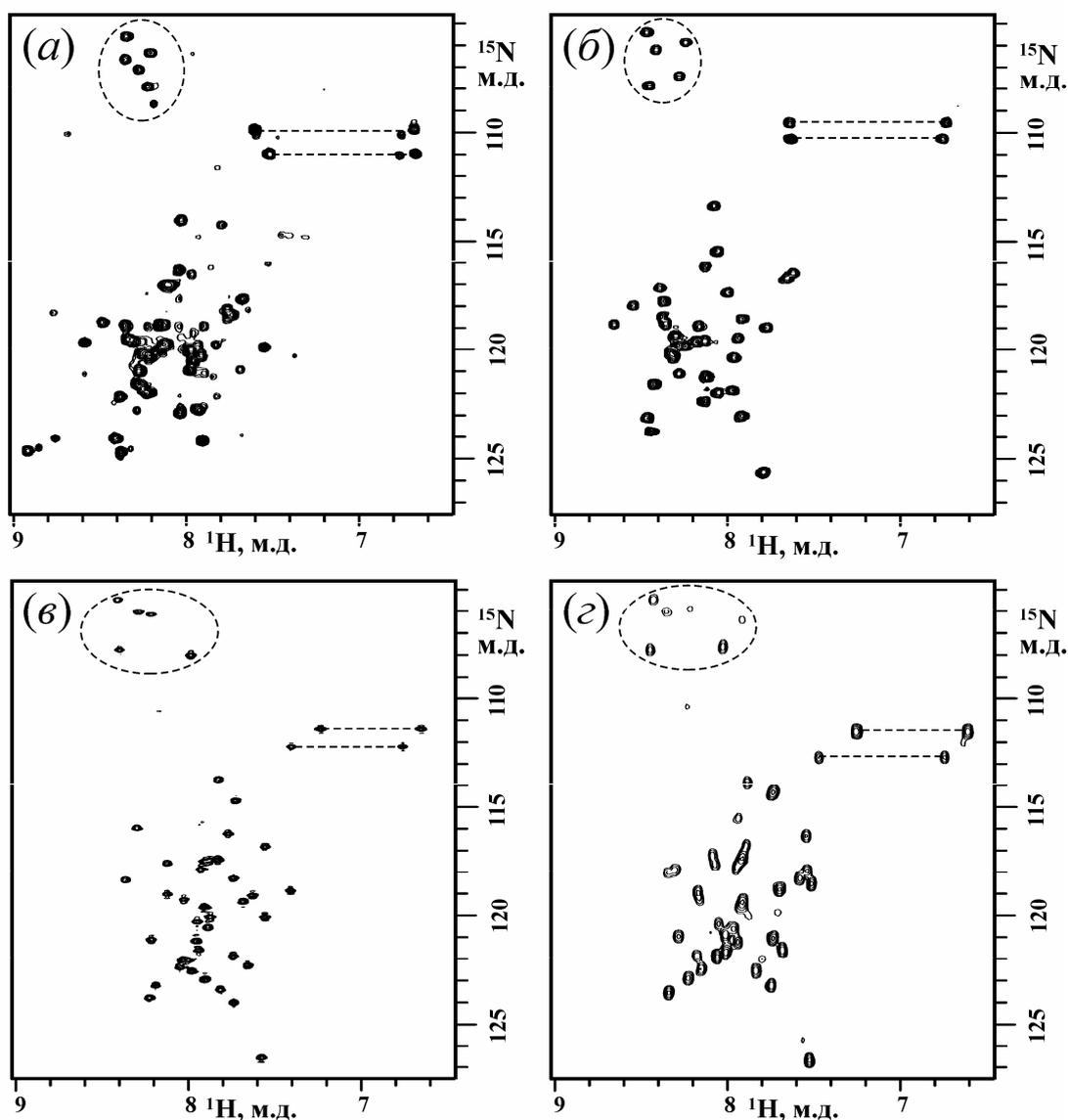


Рис. 5. Гетероядерные ЯМР-спектры ^1H - ^{15}N -HSQC рекомбинантного totally ^{15}N -меченного пептида APPtm в мембраноподобных средах: (а) после вычитающей хроматографии (на Ni-хелатирующей сефарозе) в смеси хлороформ–метанол–вода, 5 : 5 : 1 при 30°C; (б) после офВЭЖХ (на колонке Resource PRC) в смеси хлороформ–метанол–вода, 5 : 5 : 1 при 30°C; (в) в водном растворе бицелл DMPC/DHPC (1 : 4) с молярным отношением пептид–липид, равным 1 : 70 (соответствует встраиванию примерно одной молекулы APPtm в бицеллу), pH 4.5, 45°C; (г) в водном растворе мицелл DPC молярным отношением пептид–детергент, равным 1 : 30 (соответствует встраиванию примерно двум молекулам APPtm в мицеллу), pH 4.9, 45°C. Пунктирным овалом выделена область, в которой наблюдаются сигналы от ^{15}NH -групп 5 остатков глицина APPtm. Пунктирной линией соединены кросс-пики от $^{15}\text{NH}_2$ боковых групп остатков Gln⁶⁸⁶ и Asn⁶⁹⁸.