

УДК 577.2

ОПТИМИЗАЦИЯ ОЧИСТКИ N-КОНЦЕВЫХ ДОМЕНОВ ТРАНСМЕМБРАННЫХ БЕЛКОВ НА ПРИМЕРЕ NAPI2B

Савенкова Д.В., студентка 4 курса аспирантуры института
фундаментальной медицины и биологии, darina.sava1@gmail.com

Макаренко И.А., студентка 3 курса института фундаментальной
медицины и биологии, ira.mack.01@mail.ru

Научные руководители – Киямова Р.Г., доктор биологических
наук, профессор

Богданов М.В., кандидат биологических наук, профессор
ФГАОУ ВО КФУ

Ключевые слова: очистка, трансмембранный белок,
гидрофобность

*Работа посвящена оптимизации методов очистки N-концевых
доменов гидрофобных трансмембранных белков.*

Введение

Трансмембранные белки (ТМБ) представляют более 60% приоритетных целевых мишеней для разработки лекарственных препаратов на основе моноклональных антител, несмотря на низкую представленность их структур (<1%) [1,2]. Гидрофобность мембранных белков является основным препятствием для их очистки с целью исследования их структуры. На данный момент нет стандартных протоколов для очистки ТМБ, в связи с этим появляется необходимость в оптимизации очистки мембранных белков, а также и их доменов, представляющих собой антигены для таргетной терапии моноклональными антителами. в данной статье представлена оптимизация метода очистки N-концевого домена на примере натрий-зависимого фосфатного транспортера NaPi2b. Данный метод очистки может быть экстраполирован на другие мембранные белки.

Мембранные белки как мишени для таргетной терапии

Разработка лекарств основывается на основном предположении о том, что внутри мембраны нет специфических взаимодействий,

которые можно было бы использовать для разработки лекарственных препаратов. в связи с этим действие большинства таргетных лекарственных препаратов нацелены на мишени, экспонированные на поверхности клеток [3]. Однако для расширения возможностей таргетированной терапии необходимо находить новые мишени в тех участках ТМБ, которые находятся вне активного центра и которые обычно рассматриваются как «не терапевтические» [3,4]. С этой целью необходимо рассматривать динамическую топологию ТМБ как было показано на примерах изменения ориентации N-концевого домена в мембранных белках прокариот EmrE и YidC [5,6], эукариотической скрамблазе PLSCR1 [7], рецепторе прогестерона PGRMC1 [8] и др.

Натрий-зависимый транспортер NaPi2b является трансмембранным гидрофобным гликопротеином с 8 трансмембранными доменами, C- и N концевыми доменами, расположенными в цитоплазме [9]. Интерес к транспортеру NaPi2b связан с тем, что белок сверхэкспрессируется на поверхности клеток ряда опухолей, а N-концевой домен транспортера с учетом динамики топологии мембранных белков представляет собой привлекательную мишень для противоопухолевой терапии. в данной статье показана оптимизация очистки рекомбинантного N-концевого домена транспортера NaPi2b, которая может быть применена для очистки доменов других трансмембранных белков.

Материалы и методы

Материалы и реагенты: Клеточная линия рака яичника человека OVCAR-4, эндогенно экспрессирующая NaPi2b (ATCC, США), компетентные клетки *E.coli* штамма BL21 (DE3), плазида pGEX4T1/N-NaPi2b, кодирующая N-концевой домен транспортера NaPi2b [9], жидкая питательная среда LB (Applichem, Германия), ампициллин (Панэко, Россия), изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) (AppliChem, Германия), моноклональные антитела N (15/1) [9], вторичные антитела козы против мышиных антител, конъюгированные с пероксидазой хрена («Thermo Fisher Scientific», США), глутатион-агароза («Thermo Fisher Scientific», США), маркер PageRuler Plus («Thermo Fisher Scientific», США), Кумасси G-250 (Панэко, Россия).

Буферы: Лизирующий буфер (25 mM Hepes pH- 7,2, 200 mM NaCl, 5% глицерин, ингибиторы протеаз, лизоцим 1 мг/мл); связывающий

буфер (25 мМ Hepes pH- 7,2, 200 мМ NaCl, 5% глицерин); промывочный буфер 1 (25 мМ Hepes pH- 7,2, 0,5 М NaCl, 5% глицерин); промывочный буфер 2 (25 мМ Hepes pH- 7,2, 200 мМ NaCl, 5% глицерин, 0,01% тритона х100); элюирующий буфер (5 мМ Hepes pH- 8, 200 мМ NaCl, 5% глицерин, 10 мМ глутатион)

Трансформация BL21(DE3) и экспрессия рекомбинантного белка: Компетентные клетки *E.coli* штамма *BL21DE3* была трансформированы рекомбинантной плазмидой pGEX4T1/N-NaPi2b с помощью стандартной процедуры. Селекцию трансформированных клонов проводили на питательных средах с ампициллином. Экспрессию рекомбинантного N-концевого домена NaPi2b (NT) проводили в 500мл среды LB с помощью изопропил-β-D-1-тиогаляктопиранозида (ИПТГ) 1 мМ в термостатном шейкере в течение ночи при 18°C. Супернатант получали с помощью центрифугирования при 35000 об/мин в течение 60 минут при 4°C лизатов осадка клеток *E.coli* штамма *BL21DE3*, трансформированных рекомбинантной плазмидой pGEX4T1/N-NaPi2b..

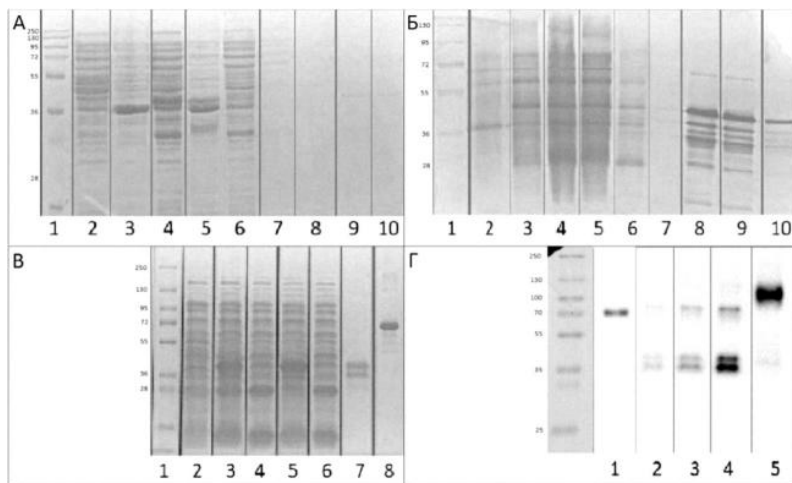


Рис. 1. Электрофореграмма лизатов клеток BL21DE3, экспрессирующих NT и элюций очищенного рекомбинантного NT. (А) Экспрессия NT в 2мл среды. Дорожки: 1) маркер PageRuler Plus; 2) супернатант (-ИПТГ); 3) осадок (-IPTG); 4) супернатант (+ИПТГ);

5) осадок (+ИПТГ); 6) проскок; 7),8) отмывка 1,2; 9),10) элюции NT 1,2. (Б) Экспрессия NT в 100мл среды. Дорожки: 1) маркер PageRuler Plus;

2) тотальный лизат BL21DE3(-ИПТГ); 3) супернатант (+ИПТГ);

4),5) проскок 1,2; 6),7) отмывка 1,2; 8),9),10) элюции NT 1,2 и 3.

(В) Экспрессия NT в 500мл среды. Дорожки: 1) маркер PageRuler Plus; 2) тотальный лизат BL21DE3 (-ИПТГ); 3) тотальный лизат BL21DE3 (+ИПТГ); 4) супернатант (+ИПТГ); 5) отмывка; 6) проскок; 7) элюция NT; 8) бычий сывороточный альбумин (2мкг); (Г) Вестерн блот элюций очищенного NT и лизата OVCAR4. Дорожки: 1) маркер PageRuler Plus; 2).3),4) элюции очищенного NT (25мкг, 50мкг, 100мкг); 5) лизат OVCAR4

Очистка: Колонку заполняли 500 мкл 50% суспензии глутатион-агарозы, промывали 5 мл воды MQ и уравнивали десятью объемами связывающего буфера. Связывание целевого белка с сорбентом проводили в колонке при постоянном помешивании в течение 3 часов при 4°C. Элюцию белка проводили в объеме 500 мкл элюирующего буфера, элюаты хранили на -80°C.

Результаты

С целью подбора условия для очистки рекомбинантного белка была проведена экспрессия N-концевого домена NaPi2b (NT) в разных объемах среды LB (рис.1): 2 мл, 100 мл и 500 мл.

При экспрессии NT в 2 мл среды не наблюдается детекции белка в элюциях (Рис. 1а), что может быть связано с недостаточным количеством образца белка для связывания с сорбентом глутатион-агарозой, ёмкость которой составляет 5мг/мл. в связи с этим объём среды для экспрессии рекомбинантного белка был увеличен до 100 и 500 мл. При экспрессии NT в 100 мл среды в элюциях белка с сорбента наблюдали большое количество примесей (Рис. 1б), что может быть связано с наличием свободной ёмкости в сорбенте при проведении связывания с рекомбинантным белком, в связи с чем с сорбентом могут связываться нецелевые природные белки с GST-тагом с более низкой аффинностью и элюироваться при проведении очистки. Для уменьшения неспецифичного связывания

воспользовались приёмом перегрузки сорбента большим количеством рекомбинатного белка. При превышении ёмкости с сорбентом преимущественно связываются рекомбинатные белки с GST-тагом, так как природным белкам с GST-тагом будет труднее конкурировать за центры связывания на сорбенте. Таким образом, варьируя отношение GST-меченных рекомбинантных белков и объёма сорбента, мы добились значительного повышения чистоты белкового препарата после очистки (Рис. 1в). Для проверки распознавания рекомбинантного белка был проведён Вестерн-блот анализ, по результатам которого был подтверждён специфический сигнал от очищенного NT с помощью моноклональных антител N 15/1 (рис.1г).

Вывод. Были подобраны условия для очистки рекомбинантного N-концевого домена NaPi2b из клеток бактерий *E.coli* штамма *BL21DE3*. Было показано, что при увеличении объема среды для экспрессии рекомбинатного белка и количества сорбента для его очистки элюируемый белок становится намного чище. Данный протокол может быть применен как для очистки полноразмерных гидрофильных белков, так и для доменов гидрофобных трансмембранных белков для последующих прикладных и фундаментальных исследований.

Благодарность. Работа выполнена в рамках программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета и при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 20-14-00166).

Библиографический список:

1. McCusker, E.C. Heterologous GPCR expression: a bottleneck to obtaining crystal structures / E.C. McCusker, S.E. Bane, M.A. O'Malley, A.S. Robinson // *Biotechnol Prog.* - 2007. - V.23(3) - P. 540-547.
2. Katzen, F. Membrane protein expression: no cells required / F. Katzen, T.C. Peterson, W. Kudlicki // *Trends Biotechnol.* - 2009. - V.27(8) - P. 455-460.
3. Yin, H. Drugging Membrane Protein Interactions / H. Yin, A.D. Flynn // *Annu Rev Biomed Eng.* - 2016. - V.18. - P. 51-76.

4. Seurig, M. Dynamic membrane topology in an unassembled membrane protein / M. Seurig, M. Ek, G. Von Heijne, N. Fluman // Nat Chem Biol. - 2019. - V.15(10) - P. 945-948.

5. Bogdanov, M. Mapping of Membrane Protein Topology by Substituted Cysteine Accessibility Method (SCAMTM) / M. Bogdanov // Methods in Molecular Biology. - 2017. - V.1615. - P. 105-128.

6. Nass, K.J. The role of the N-terminal amphipathic helix in bacterial YidC: Insights from functional studies, the crystal structure and molecular dynamics simulations / K.J. Nass, I.M. Ilie, M.J. Saller, A.J.M. Driessen, A. Caflisch, R.A. Kammerer, X.Li // Biochim Biophys Acta Biomembr. - 2022. - V.1864(3) - P. 183825.

7. Herate C. Phospholipid Scramblase 1 Modulates FcR-Mediated Phagocytosis in Differentiated Macrophages / PLoS One. - 2016. - V.11(1).

8. Kim, J.Y. Epitope mapping of anti-PGRMC1 antibodies reveals the non-conventional membrane topology of PGRMC1 on the cell surface / J.Y. Kim, S.Y. Kim, H.S. Choi, S. An, C.J. Ryu // Sci Rep. - 2019. - V.9(1) - P. 653

9. Yin B, Kiyamova, R.G. Monoclonal antibody MX35 detects the membrane transporter NaPi2b (SLC34A2) in human carcinomas / B. Yin, R.G. Kiyamova, R. Chua, O. Caballero, I. Gout, V. Gryshkova, N. Bhaskaran, S. Souchelnytskyi, U. Hellman, V. Filonenko, A. Jungbluth, K. Odunsi, K. Lloyd, L. Old, G. Ritter // Cancer Immun. - 2008. - V.8.

OPTIMIZATION OF PURIFICATION OF N-TERMINAL DOMAINS OF TRANSMEMBRANE PROTEINS BY THE EXAMPLE OF NAPI2B

Savenkova D.V., Makarenko I.A.

Keywords: *purification, transmembrane protein, hydrophobicity.*

The work is devoted to optimization of methods for purification of N-terminal domains of hydrophobic transmembrane proteins.