

## Бесклеточная экспрессия HCN каналов.

Гончаров И.М.<sup>1</sup>, Хабибуллина Н.Ф.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Московский физико-технический институт (государственный университет)

Среди мембранных белков человека, HCN (Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated) каналы оказывают существенное влияние на работу кардиостимулирующей системы сердца и мозга в организме человека [1], [2]. Дисфункция этих мембранных белков способствует ряду заболеваний, таких как: эпилепсия, аритмия сердца, синдром нейропатической боли. Поэтому исследования структурных и функциональных свойств HCN каналов имеет исключительно важную роль с точки зрения медицины и фармакологии [3]. Для характеристики этих свойств и последующего структурного анализа белок необходимо получить в препаративных количествах. С этой целью мы использовали бесклеточную систему экспрессии (БСЭ).

БСЭ имеет ряд преимуществ применительно к нашим исследованиям, по сравнению с другими системами, основанными на клеточной экспрессии. Во-первых, ионные каналы могут быть токсичными для некоторых клеточных систем экспрессии, что будет понижать выход белка. Во-вторых, для продукции мембранных белков в растворимой форме в бесклеточную систему можно добавлять мембраномоделирующие среды (мицеллы детергентов, липосомы, липид-белковые нанодиски), которые будут стабилизировать белок. И наконец, с помощью БСЭ можно получить большой выход белка (1.2-1.5 мг с 1 мл реакционной смеси) [4], [5].

В этой работе использовалась БСЭ, основанная на бактериальном бесклеточном лизате (так называемом “S30 экстракте”), выделенном из *E. coli*. Ранее были разработаны протоколы для получения и очистки ТМ (transmembrane) и CNB (cyclic nucleotide-binding) доменов HCN1 канала. Протоколы были оптимизированы для подготовки образцов к структурно-функциональным исследованиям.

Исследования структурных и функциональных свойств HCN каналов необходимо для дальнейшей разработки лекарственных препаратов против эпилепсии, аритмии сердца и синдрома нейропатической боли.

### Литература

1. Santoro B., et al., Molecular and functional heterogeneity of hyperpolarization-activated pacemaker channels in the mouse CNS. *J. Neurosci* (2000), 20: 5264–5275.

2. Moosmang S., et al., Differential distribution of four hyperpolarization-activated cation channels in mouse brain. *Biol. Chem.* (1999), 380: 975–980.
3. Postea O., Biel M., Exploring HCN channels as novel drug targets, *Nature Reviews Drug Discovery* (2011), 10: 903-914.
4. Fernandez C., Wuthrich K. NMR solution structure determination of membrane proteins reconstituted in detergent micelles. *FEBS Letters* (2003), 555 (1): 144-150.
5. Franzin C., et al., NMR of membrane proteins in micelles and bilayers: the FXYD family proteins. *Methods* (2007), 41 (4): 398-408.