

Метод получения аффинных сорбентов для выделения фолдированных адренергических рецепторов.

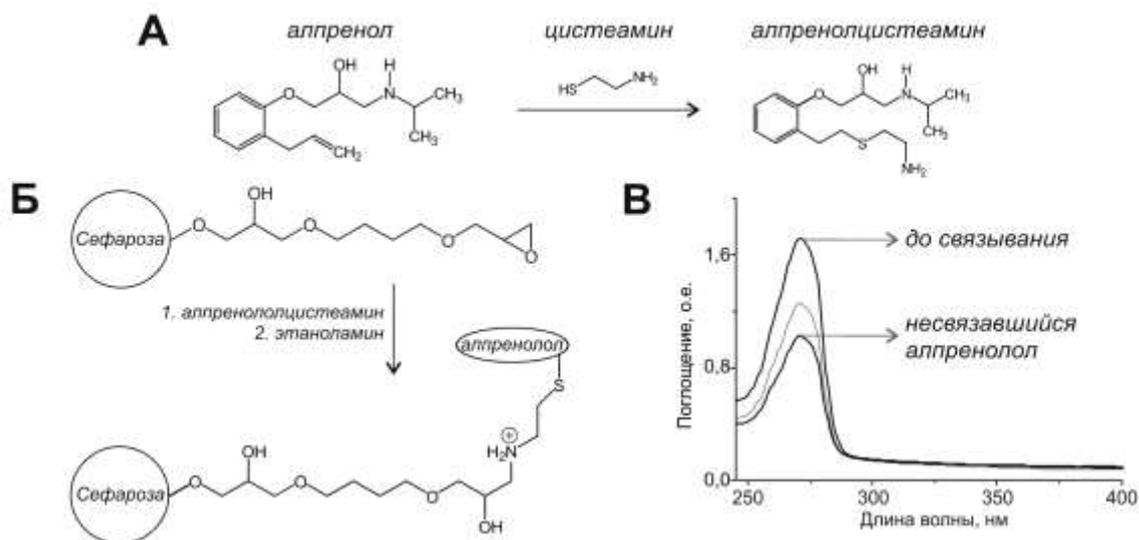
Кузьмичев П.К.<sup>1,2</sup>, Петровская Л.Е.<sup>2</sup>, Чупин В.В.<sup>1</sup>, Арсеньев А.С.<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Изучение пространственной структуры белков методами рентгеновской кристаллографии или ЯМР-спектроскопии начинается с получения функционально-активного белка в достаточных количествах для проведения экспериментов. Наиболее распространённым способом наработки мембранных белков является клонирование и гетерологическая экспрессия в клетках *E. coli* в составе телец включения. [1]. Однако получаемые таким способом денатурированные белки необходимо подвергать ренатурации, чтобы белок сформировал правильную пространственную структуру и стал функционально-активен. Для контроля рефолдинга и последующего выделения функционально-активных белков широко используется метод аффинной хроматографии. В данной работе нами предложен новый метод получения аффинных сорбентов для адренергических рецепторов.

Модифицированный алпренолол с первичной аминогруппой синтезировали взаимодействием алпренолола с цистеамином (Рис. 1А). Аффинный сорбент получали инкубированием активированной смолы с алпренололцистеамином (Рис. 1Б). Посадку лиганда на смолу контролировали спектрофотометрически по уменьшению концентрации свободного алпренололцистеамина в супернатанте. (Рис. 1В). Рекомбинантный бета-2-адренергический рецептор человека был получен путём экспрессии в клетках *E. coli* в составе телец включения. После солиubilизации и очистки рецептор был встроен в фосфолипидные нанодиски. Полученные нанодиски наносили на колонку с аффинным сорбентом и последовательно элюировали буфером без алпренолола и с алпренололом. По данным хроматографии более 80% бета-2-адренергического рецептора встроенного в нанодиски связывался со смолой. Элюция связанного со смолой рецептора происходила лишь буфером, содержащим свободный лиганд данного рецептора.



**Рис.1.** А – получение алпренололцистеамина, Б – получение аффинного сорбента, В – спектрофотометрический контроль посадки лиганда на сорбент.

Таким образом, разработан новый эффективный метод получения аффинных сорбентов для адренергических рецепторов. Показано, что встраивание рекомбинантного бета-2-адренергического рецептора человека в фосфолипидные нанодиски приводит к его ренатурации.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант 13-04-01700).

#### Литература

1. Петровская Л.Е., Шульга А.А., Бочарова О.В., Ермолюк Я.С., Крюкова Е.А., Чупин В.В., Бломмерс М.Ж.Ж., Арсеньев А.С., Кирпичников М.П. Экспрессия генов рецепторов, сопряженных с G-белками, в *Escherichia coli* для структурных исследований. – Биохимия. – 2010. – Том 75, 7. – с. 1001-1013.