

Экспрессия в *E.coli* и очистка мутантного варианта рекомбинантного человеческого цитокина DR5-Apo2L/TRAIL.*

Яголович Анна Валерьевна*⁽

студентка

Московский Государственный Университет им. М.В.Ломоносова, Москва, Россия

E-mail: anne-gor2002@yandex.ru

Апоптоз – это генетически регулируемый биологический процесс, играющий важную роль в поддержании гомеостаза многоклеточного организма. Наиболее известными белками-индукторами апоптоза являются цитокины из семейства фактора некроза опухолей (TNF, Tumor Necrosis Factor) (Wiley et al., 1995). TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand, или Apo2L) является относительно недавно идентифицированным цитокином из семейства TNF. TRAIL способен селективно вызывать апоптоз в опухолевых клетках, не затрагивая при этом нормальные клетки. С этим связано его возможное применение в качестве терапевтического средства для лечения раковых заболеваний. TRAIL имеет 5 типов рецепторов. Показано (Kelley et al., 2005), что в большинстве видов опухолей рецептор DR5/TRAIL-R2 играет наибольшую роль в проведении сигнала апоптоза при связывании с лигандом. Поэтому увеличение специфичности лиганда TRAIL по отношению к этому рецептору повышает его способность к индукции апоптоза в опухолевых клетках.

На основе литературных данных были выявлены 6 аминокислотных остатков в структуре белка TRAIL, наиболее важные для связывания лиганда с рецептором DR5/TRAIL-R2 (Hymowitz et al., 2000; MacFarlane et al., 2005; Kelley et al., 2005). Мы внесли мутации в нуклеотидную последовательность гена TRAIL методом сайт-специфического мутагенеза. В результате мы получили ген мутантного варианта DR5-TRAIL, кодирующий замены Y189N, R191K, Q193R, H264R, I266L и D267Q в аминокислотной последовательности белка. Замены направлены на увеличение специфичности лиганда TRAIL по отношению к рецептору DR5/TRAIL-R2.

Мы клонировали нуклеотидную последовательность гена, кодирующего белок DR5-TRAIL, в вектор pET32a, и экспрессировали рекомбинантный слитный белок Trx/DR5-TRAIL (с доменом тиоредоксина Trx на N-конце в качестве «несущего» белка) в штамме *E.coli* BL21(DE3). Уровень экспрессии составил 1 г/л.

Ранее в нашей лаборатории была разработана методика получения рекомбинантного человеческого цитокина TRAIL (аминокислотные остатки 114-281). До 75-80% белка Trx/TRAIL (114-281) нарабатывалось в *E.coli* в нерастворимой форме в составе телец включения. Мы выяснили, что растворимость мутантного белка DR5-TRAIL (114-281) повышена в 3.5 раза по сравнению с TRAIL (114-281): доля растворимой фракции составляет 70% от общей экспрессии белка DR5-TRAIL в клетке. Поэтому очистку белка производили из растворимой фракции методом Ni-аффинной хроматографии. После этого мы расщепили слитный белок Trx/DR5-TRAIL энтеропептидазой. В результате был получен рекомбинантный мутантный белок DR5-TRAIL с нативным N-концом. Итоговый выход очищенного мутантного белка DR5-TRAIL составил 9.25 мг со 100 мл культуры клеток.

Дальнейшие исследования включают анализ противоопухолевой активности мутанта на культуре клеток человеческой опухоли и сравнение с активностью исходного белка Apo2L/TRAIL (114-281).

* Работа была выполнена в лаборатории инженерии белка (зав. лаб. академик М.П.Кирпичников) ИБХ РАН им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова.

** Выражаю глубокую благодарность Марине Э. Гаспарян за научное руководство и Павлу Елистратову за активную помощь.