

*Бондарюк Е.В., Жидецкий А.В., Шолух М.В.*

## **Разработка тест-системы для изучения лиганд-рецепторного взаимодействия белков семейства эфринов**

Белорусский государственный университет, г. Минск, Беларусь

Эфриновые рецепторы (Eph) и их мембраносвязанные лиганды эфрины активно синтезируются во время эмбрионального развития организма во многих тканях, участвуя в регуляции направления роста аксонов, образовании нейрональных связей, морфогенезе тканей, ангиогенезе и межклеточных взаимодействиях [1]. Помимо функционирования в здоровых клетках и тканях, эти белки играют важную роль в процессе канцерогенеза [2]. В связи с этим данная группа рецепторов и их лигандов представляет несомненный интерес в качестве объектов целевой терапии рака и патогенезе тканей [3]. Для изучения лиганд-рецепторного взаимодействия эфринов с их рецепторами, а также поиска препаратов, влияющих на это взаимодействие при канцерогенезе, мы получали очищенные рекомбинантные эктодомен эфринового рецептора А5 и эфрин А5, которые подвергались конъюгации с флуоресцентными красителями Су3 и Су5 соответственно.

Для получения эфрина А5 и эктодомена его рецептора использовались плазмидные векторы, которые экспрессировались в бактериях *E.coli*. Полученная рекомбинантная конструкция содержит кроме аминокислотной последовательности целевых белков сайт для действия тромбина, His-Taq фрагмент и тиоредоксиновую последовательность, которая необходима для направления синтезирующегося белка в периплазматическое пространство бактериальной клетки. Однако использовавшаяся система экспрессии обеспечивает сверхпродукцию целевого белка, при которой имеет место образование телец включения где белок находится в частично или полностью денатурированном и агрегированном состоянии и требует проведения рефолдинга и очистки. Однако, анализ литературы показал, что подобная сверхэкспрессия с образованием телец включения экономически выгоднее даже несмотря на необходимость проведения рефолдинга, чем продукция белка изначально в нативном виде, выход которой весьма невысок.

В нашей работе рекомбинантные эфрин и его рецептор получали из телец включения с помощью методов металл-хелатной, гель-фильтрационной и ионообменной хроматографии. Важным этапом очистки является первичная отмывка телец включения, которая определяет эффективность последующего рефолдинга, поскольку примеси, содержащиеся в тельцах включения (белки, липиды, нуклеиновые кислоты), могут оказывать на него влияние. Технология получения рекомбинантных белков включала следующие стадии: солубилизация телец включения в растворе мочевины, первичная очистка на Ni-сефарозе, сульфитолиз, рефолдинг методом гель-фильтрации, обработку тромбином и вторую стадию очистки на Ni-сефарозе для удаления дополнительного фрагмента аминокислотной последовательности. В результате были получены очищенные белки, которые подвергали конъюгации с флуоресцентными красителями.

Взаимодействие между флуоресцентно меченными эфрином А5 и его рецептором было показано с помощью флуоресцентной спектроскопии (спектрофлуориметр Cary Eclipse) по появлению нового максимума эмиссии при образовании комплекса, при котором происходит поглощение квантов света при 555 нм конъюгатом рецептора с Су3, перенос энергии на молекулу другого белка и эмиссия при 670 нм конъюгатом эфрина с Су5.

#### Литература

1. Charmsazand S., Boyd A. Expression and function of the Eph receptor family in leukemia and hematopoietic malignancies: prospects for targeted therapies // *J. Leukemia*. 2013. V. 1. I. 1. P. 1–9
2. Pasquale E.B. Eph receptors and ephrins in cancer: bidirectional signaling and beyond // *Nat. Rev. Cancer*. 2010. V. 10. P. 165–180.

3. Zozulya S., Udovichenko I. Eph family receptors as therapeutic targets // Russian Journal of Bioorganic Chemistry. 2012. V. 38. P.231–242.