

# Определение оптимальных условий совместной экспрессии белков семейства «EF-руки» с N-концевыми ацетилтрансферазами *E.coli*

Вологжанникова А. А., Соколов А. С., Пермякова М. Е., Лаптева Ю. С.

ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,  
Институт биологического приборостроения с опытным производством РАН;  
yulia.s.lapteva@gmail.com

Большинство белков эукариот подвергается N-концевому ацетилированию, что может существенным образом изменять их структурные и функциональные свойства [1]. Нами было установлено влияние N-концевой ацетильной группы на структурные и функциональные свойства некоторых белков семейства «EF-руки» [2-3]. Белки S100 и парвальбумины - это небольшие кальцийсвязывающие белки позвоночных, выполняющие в организме поддержание гомеостаза кальция в клетке, регуляцию ее роста и дифференцировки. Отдельные белки семейства S100 ассоциированы с заболеваниями человека и служат маркерами таких патологических состояний как рак и нейродегенеративные заболевания. Рекомбинантные белки эукариот, нарабатываемые в бактериях, часто не подвергаются N-концевому ацетилированию. В этой связи актуальна разработка метода *in vivo* N<sup>α</sup>-ацетилирования (N<sup>α</sup>-АЦ) рекомбинантных белков, получаемых в бактериальных системах экспрессии.

Для N<sup>α</sup>-АЦ целевых белков в условиях *in vivo* гены ряда парвальбуминов и белков S100 были клонированы в плазмидный вектор pET-Duet в паре с геном одной из трех АТ *E.coli*. Вектор pET-Duet содержит в своем составе два гибридных промотора T7/lac и сконструирован таким образом, что позволяет проводить наработку в клетках одновременно двух белков. Мы проводили ко-экспрессию в штамме BL21(DE3) *E. coli*. Нами были исследованы влияние на уровень экспрессии целевых белков таких параметров как, состав питательной среды, температура и метод индукции.

Нами показано, что уровень наработки целевых и степень их N<sup>α</sup>-АЦ зависит от условий культивирования. Так, нами установлено, что при совместной экспрессии в сконструированной нами системе предпочтительно нарабатывается АТ. Уровень целевого белка часто ниже, но в ряде случаев сопоставим с уровнем АТ. При ко-экспрессии на «богатой» среде (2xYT), по сравнению с «бедной» (M9), не изменяется уровень АТ, но увеличивается уровень наработки целевого белка. Запуск синтеза генов методом автоиндукции, по сравнению с ИПТГ, позволяет увеличить наработку целевого белка в паре с АТ RimJ, для которой показан токсический эффект для клеток при суперэкспрессии.

После совместной экспрессии целевые белки (ПА и белки S100) были выделены и очищены с использованием специфических для каждого белка ряда хроматографий. Уровень N<sup>α</sup>-АЦ определяли при помощи масс-спектрометрии. Нами показано, что АТ *E. coli* в условиях *in vivo* проявляют специфическую ферментативную активность по отношению к белкам семейства «EF-руки». Уровень N<sup>α</sup>-АЦ белков зависит от условий культивирования клеток, он повышается при понижении скорости роста культуры и, в ряде случаев, достигает 50%. Таким образом, нами показано возможность применения бактериальных АТ для N<sup>α</sup>-АЦ рекомбинантных белков эукариот в условиях *in vivo*.

Данное исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00701.

## Литература

1. Drazic, A., et al. The world of protein acetylation // Biochim. Biophys. Acta. - 2016. – V. 1864: P 1372-1401.

2. Vologzhannikova, A.A., et al. In search for globally disordered apo-parvalbumins: Case of parvalbumin  $\beta$ -1 from coho salmon // Cell Calcium. - 2017. – V. 67. - P 53-64.
3. Permyakov, S.E., et al. The impact of alpha-N-acetylation on structural and functional status of parvalbumin // Cell Calcium. - 2012. – V. 52 (5). – P 366-76.