

Точечный мутант альфа-синуклеина по 136 аминокислоте с заменой кодона тирозина ТАС на ТАТ позволяет получить гомогенный препарат белка дикого типа

Научный руководитель – Муронец Владимир Израилевич

Мельникова А.К.¹, Баринаева К.В.¹

1 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия

Альфа-синуклеин - это белок, локализующийся в пресинаптических терминалях нейронов, который существует в развернутом виде в цитоплазме или ассоциирован с билипидным слоем клеточной мембраны. Данный белок принимает участие в развитии болезни Паркинсона [1] и других нейродегенеративных заболеваний, коллективно называемых синуклеинопатиями [2]. Мутации в α -синуклеине могут изменять конформацию белка, что нарушает его связывание с мембраной и вызывает агрегацию с формированием телец Леви [3].

В связи с тем, что α -синуклеин вовлечен в патогенез нейродегенеративных заболеваний, его свойства, такие как возможные механизмы олигомеризации, фибриллизации, агрегации активно исследуются *in vitro* с использованием рекомбинантного белка, выделенного из бактериальных клеток. Несмотря на большое количество исследований на эту тему, единого общепризнанного механизма фибриллизации и клеточной токсичности различных форм α -синуклеина до сих пор не существует. Возможно, расхождения в результатах исследований можно объяснить использованием рекомбинантного белка. Согласно литературным данным, около 20% рекомбинантного α -синуклеина могут содержать замену Tyr136Cys, поскольку при экспрессии в *E. coli* кодон 136 тирозина (ТАС) ошибочно распознается цистеинил-тРНК, приводя к включению Cys по этому положению [4]. α -синуклеин дикого типа (WT) не содержит остатков Cys, поэтому при электрофоретическом анализе очищенной фракции рекомбинантного белка в восстанавливающих условиях образующиеся у Tyr136Cys мутанта димеры будут видны на геле как гомогенная полоса, по молекулярной массе равная WT.

В ходе работы мы успешно экспрессировали α -синуклеин с плазмиды, содержащей ген WT, в *E. coli*, штамм BL21(DE3). Белок выделяли постепенным снижением pH лизата 9% HCl до 2.8, после чего проводили центрифугирование и восстанавливали pH супернатанта до 7.4. Затем мы исследовали получившийся препарат белка с помощью электрофореза в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях и обнаружили вторую полосу, по молекулярной массе соответствующую димеру α -синуклеина. С помощью дополнительных этапов хроматографической очистки на тиол-сефарозе и исследований методами карбоксиметилирования и масс-спектрометрии полученных препаратов белка, нами были выделены и охарактеризованы две фракции α -синуклеина: WT и мутант Tyr136Cys. Интересно отметить, что количество содержащего Cys α -синуклеина в нашем случае зависело от pH бактериальной среды и достигало 50% от общего выхода α -синуклеина при pH 6.6 [5]. Для предотвращения ошибок трансляции в бактериальной системе нами был проведен сайт-направленный мутагенез плазмиды WT, с помощью которого мы заменили кодон Tyr136 ТАС на ТАТ, также кодирующий тирозин. Данная замена предотвращает трансляционную ошибку в бактериальной системе экспрессии и позволяет избежать дополнительного этапа очистки от мутанта Tyr136Cys, а также возможных погрешностей в измерениях, связанных с наличием примеси мутанта Tyr136Cys в рекомбинантном белке.

Источники и литература

- 1) Perez R.G., Hastings T.G. Could a loss of alpha-synuclein function put dopaminergic neurons at risk? // *J. Neurochem.* 2004. No. 89. P. 1318–1324.
- 2) Barker R.A., Williams-Gray C.H. Review: the spectrum of clinical features seen with alpha -synuclein pathology // *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2016. No. 42. P. 6–19.
- 3) Hegde M.L., Jagannatha Rao K.S. Challenges and complexities of [U+202F]α-synuclein toxicity: New postulates in unfolding the mystery associated with Parkinson's disease // *Arch. Biochem. Biophys.* 2003. Vol. 418, No. 2. P. 169–178.
- 4) Masuda M., Dohmae N., Nonaka T., Oikawa T., Hisanaga S., Goedert M., Hasegawa M. Cysteine misincorporation in bacterially expressed human alpha-synuclein // *FEBS Lett.* 2006. No. 580. P. 1775–1779.
- 5) Barinova K.V., Kuravsky M.L., Arutyunyan A.M., Serebryakova M.V., Schmalhausen E.V., Muronetz V.I. Dimerization of Tyr136Cys alpha-synuclein prevents amyloid transformation of wild type alpha-synuclein // *Int J Biol Macromol.* 2017. No 96. P. 35-43.