

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ
БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

УДК 577.352.332:577.112.083

БАКТЕРИАЛЬНЫЙ СИНТЕЗ, ОЧИСТКА И СОЛЮБИЛИЗАЦИЯ
ТРАНСМЕМБРАННЫХ СЕГМЕНТОВ РЕЦЕПТОРНЫХ
ТИРОЗИНКИНАЗ СЕМЕЙСТВА ErbB

© 2011 г. М. В. Гончарук^{1,2*}, А. А. Шульга¹, Я. С. Ермолюк¹, Е. Н. Ткач¹, С. А. Гончарук^{1,2},
Ю. Е. Пустовалова¹, К. С. Минеев¹, Э. В. Бочаров¹, И. В. Масленников¹,
А. С. Арсеньев¹, М. П. Кирпичников^{1,2}

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук, Москва, 117997

²Биологический факультет Московского государственного университета
им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991

Поступила в редакцию 25.11.2010 г.

Принята к печати 24.01.2011 г.

Семейство рецепторов эпидермального фактора роста, ErbB, представляет собой важный класс рецепторных тирозинкиназ, играющих ведущую роль в процессах клеточного роста, развития и дифференцировки. В результате гомо- и гетеродимеризации трансмембранные домены этих рецепторов участвуют в передаче биохимических сигналов через плазматическую мембрану. В присутствии детергентов и липидов трансмембранные домены ErbB образуют относительно небольшие комплексы, что делает возможным исследование их пространственной структуры с помощью метода трехмерной гетероядерной спектроскопии ЯМР высокого разрешения. В статье описана эффективная система экспрессии и приведен протокол очистки, позволившие получить для структурных исследований препаративные количества трансмембранных пептидов всех четырех представителей семейства ErbB: ErbB1, ErbB2, ErbB3 и ErbB4. Для наработки целевых белков использован штамм *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS. Все пептиды получены в составе гибрида с тиоредоксином А, расположенным в N-концевой части молекулы. Для расщепления гибридных белков использована легкая цепь энтерокиназы человека. Пользуясь простым и удобным протоколом, включающим последовательные стадии металлохелатной аффинной и катионообменной хроматографий, мы получили десятки (10–30) миллиграммов очищенных изотопно-меченых трансмембранных пептидов, которые были реконструированы в липид/детергентное окружение (мицеллы или бицеллы) и охарактеризованы методами динамического светорассеяния, КД и ЯМР-спектроскопии. Полученные результаты свидетельствуют о возможности исследования структуры и динамики гомо- и гетеродимерных комплексов трансмембранных пептидов семейства ErbB методом гетероядерной спектроскопии ЯМР высокого разрешения.

Ключевые слова: мембранный белок, ErbB, бактериальная экспрессия, очистка, солюбилизация, ЯМР.

BACTERIAL SYNTHESIS, PURIFICATION, AND SOLUBILIZATION OF TRANSMEMBRANE SEGMENTS OF ErbB FAMILY MEMBERS, by M. V. Goncharuk^{1,2*}, A. A. Schulga¹, Ya. S. Ermolyuk¹, E. N. Tkach¹, S. A. Goncharuk^{1,2}, Yu. E. Pustovalova¹, K. S. Mineev¹, E. V. Bocharov¹, I. V. Maslennikov¹, A. S. Arseniev¹, M. P. Kirpichnikov^{1,2} (Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia, *e-mail: ms.goncharuk@gmail.com; ²Biological Department, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia). A family of epidermal growth factor receptors, ErbB, represents an important class of receptor tyrosine kinases, playing a leading role in cellular growth, development and differentiation. Transmembrane domains of these receptors transduce biochemical signals across plasma membrane via lateral homo- and heterodimerization. Relatively small size of complexes of ErbB transmembrane domains with detergents or lipids allows one to study their detailed spatial structure using three-dimensional heteronuclear high-resolution NMR spectroscopy. Here, we describe the effective expression system and purification procedure for preparative-scale production of transmembrane peptides from four representatives of ErbB family, ErbB1, ErbB2, ErbB3, ErbB4, for structural studies. The recombinant peptides were produced in *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS as C-terminal extensions of thioredoxin A. The fusion protein cleavage was accomplished with the light subunit of human enterokinase. Several (10–30) milligrams of purified isotope-

Принятые сокращения: ErbB – семейство рецепторов эпидермального фактора роста; ДГФХ – дигексаноилфосфатидилхолин; ДМФХ – димиристоилфосфатидилхолин; ДФХ – додецилфосфохолин; ИПТГ – изопропил-β-D-тиогалактозид; РТК – рецепторная тирозинкиназа; ТМ – трансмембранный (домен мембранного белка).

* Эл. почта: ms.goncharuk@gmail.com

labeled transmembrane peptides were isolated with the use of a simple and convenient procedure, which consists of consecutive steps of immobilized metal affinity chromatography and cation-exchange chromatography. The purified peptides were reconstituted in lipid/detergent environment (micelles or bicelles) and characterized using dynamic light scattering, CD and NMR spectroscopy. The data obtained indicate that the purified ErbB transmembrane peptides are suitable for structural and dynamic studies of their homo- and heterodimer complexes using high resolution NMR spectroscopy.

Keywords: Membrane protein, ErbB, bacterial expression, purification, detergent solubilization, NMR.

ВВЕДЕНИЕ

Семейство рецепторов эпидермального фактора роста (EGF, от англ. *E*pidermal *G*rowth *F*actor), или ErbB, представляет собой важный класс рецепторных тирозинкиназ (РТК). Четыре члена этого семейства, обнаруженные в тканях позвоночных: ErbB1 (также известный как EGFR или HER1), ErbB2 (neu, HER2), ErbB3 (HER3) и ErbB4 (HER4) [1] — играют важную роль в процессах клеточного роста, развития и дифференцировки [2, 3]. Это семейство представлено интегральными мембранными белками, состоящими из трех доменов: гликозиллированный цистеин-богатый внеклеточный домен, ответственный за узнавание лиганда; короткий гидрофобный трансмембранный (ТМ) домен и цитоплазматическая часть, содержащая высококонсервативный тирозинкиназный домен и множественные сайты автофосфорилирования. Степень гомологии аминокислотных последовательностей внеклеточных и цитоплазматических доменов ErbB-рецепторов составляет соответственно 40–60% и 60–80% [4–7]. Связывание лиганда с внеклеточным доменом рецептора инициирует передачу сигнала через мембрану, что приводит к активации киназного домена, автофосфорилированию рецептора и запуску целого ряда биологических процессов в клетке [2, 3, 8]. Нерегулируемая экспрессия рецепторов этого семейства, в частности ErbB2, связана с развитием и злокачественным характером различных видов рака человека [1, 2, 6, 9, 10]. ErbB4, в отличие от остальных членов семейства ErbB, действует как проапоптозный белок: его экспрессия в тканях подавляет рост злокачественных новообразований [11–13].

Наиболее вероятными механизмами передачи сигнала РТК считаются лиганд-зависимая димеризация или переориентация мономеров рецептора в уже сформированном димерном комплексе [3, 14, 15]. Биохимические и генетические исследования показали, что ТМ-домены РТК, в том числе белков семейства ErbB, принимают активное участие в димеризации рецепторов и взаимодействуют друг с другом в отсутствие внеклеточного и цитоплазматического доменов [16–19]. Более того, известно, что полиморфизм и мутации в ТМ-доме некоторых РТК, в частности ErbB2, сопряжены с различными заболеваниями человека, в особенности с развитием рака [19–21]. При помощи сайт-направ-

ленного мутагенеза выявлено, что во взаимодействии ТМ-доменов ErbB важную роль играют так называемые GG₄- или “гликофориновые”, димеризационные мотивы. Эти мотивы обуславливают плотную упаковку взаимодействующих спиралей, поскольку включают два аминокислотных остатка с малыми боковыми цепями, расположенными с одной стороны α -спирали (малый-XXX-малый аминокислотный остаток) [18, 22, 23]. Предполагают, что наличие GG₄-мотива в ТМ-области важно для димеризации ТМ-домена мембранного белка [24, 25]. В аминокислотных последовательностях ТМ-доменов всех четырех рецепторов ErbB человека обнаружено по несколько таких мотивов, расположенных на N- и C-концах ТМ-спиралей [18, 22]. Это позволяет предположить, что димеры ТМ-доменов ErbB могут принимать две конформации, использующие альтернативные интерфейсы димеризации с участием N- или C-концевых GG₄-мотивов [18, 26–28]. Переключение между интерфейсами может осуществляться, например, посредством так называемого вращательно-связанного механизма активации рецепторов [8, 28, 29]. Таким образом, определение пространственной структуры ТМ-доменов рецепторов ErbB и изучение механизмов, управляющих их димеризацией, чрезвычайно важны для понимания механизма передачи сигнала РТК.

Спектроскопия ЯМР, электронная микроскопия и рентгеновская кристаллография — эти методы позволяют с высоким разрешением определять структуру биомолекул. Однако их использование сопряжено с определенными требованиями к исследуемому препарату: стабильность белка, его высокое качество и миллиграммовые количества. Несмотря на значительные достижения в области белковой инженерии [30–32], получение достаточного количества функциональных мембранных белков до сих пор остается трудной задачей, зачастую требующей разработки уникальных подходов для достижения эффективной экспрессии и высокой степени очистки целевого белка. Другая, не менее значимая, проблема заключается в необходимости использования анизотропного мембраноподобного окружения, состоящего из молекул липидов или детергентов, для сохранения и поддержания нативной конформации мембранных белков. В комплексе с молекулами детергентов или липидов мембранные белки зачастую не поддаются кристаллизации, а размер и подвижность комплексов осложняют или

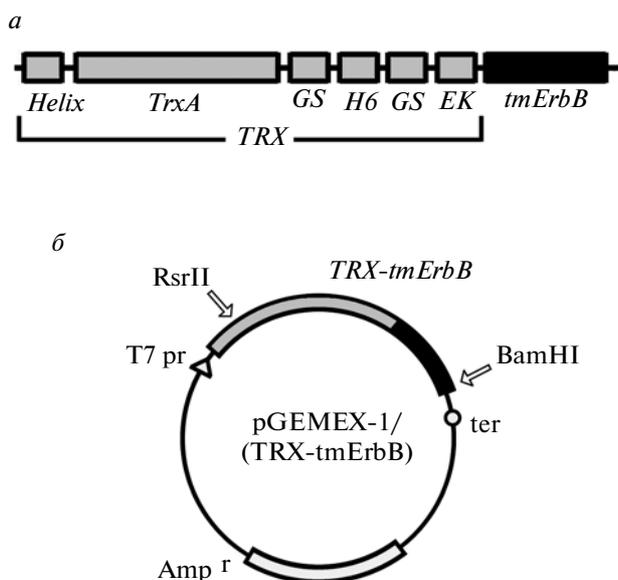


Рис. 1. Схематическое представление гибридных белков TRX-tmErbB (а) и соответствующих экспрессионных векторов (б). В состав гибридных белков входят: Helix – N-концевая аминокислотная последовательность мембраноактивного белка из *Helicobacter pylori*; TrxA – тиоредоксин А *E. coli*; GS – гибкая последовательность из аминокислот GSGSG; H6 – гистидиновая последовательность; EK – сайт узнавания легкой цепи энтерокиназы человека; tmErbB – целевой пептид из ErbB1, ErbB2, ErbB3 или ErbB4; Amp^r – ген устойчивости к ампициллину.

делают вовсе невозможным проведение ЯМР-исследования. По этим причинам до сих пор не опубликована пространственная структура ни одной полноразмерной РТК. В отсутствие более совершенных методов структурного анализа наиболее часто встречается подход, предполагающий разбиение мембранного белка на составляющие с последующим исследованием водорастворимых частей молекулы и ее ТМ-участков. На сегодня с высоким разрешением опубликованы ЯМР-структуры нековалентных гомо- и гетеродимеров ТМ-доменов различных интегральных мембранных белков [33–35], в том числе структуры представителей семейства РТК (ErbB2 [36], ErbB1/ErbB2 [37], EphA1 [38], EphA2 [39]), полученные недавно в нашей лаборатории.

При проведении ЯМР-исследования гомо- или гетеродимерных комплексов ТМ-доменов ErbB важным этапом становится разработка методологии эффективной наработки целевых ТМ-фрагментов (пептидов), а также их изотопно-меченых производных. Для получения гидрофобных ТМ-пептидов ErbB применяют твердофазный синтез [27, 40–44], однако его использование весьма затруднительно ввиду высокой стоимости изотопных меток, вводимых в образец для проведения полноценных ЯМР-исследований. Грант (Grant C.W.)

и др. [45, 46] разработали метод бактериальной экспрессии генов ТМ-пептидов ErbB, позволяющий достичь выхода изотопно-меченых пептидов не менее 5 мг с 1 л культуры. Однако согласно протоколу, отделение ТМ-пептидов от белка-носителя TrpE проводят с применением цианогенбромида (CNBr, гидролизует белки по остаткам Met), что позволяет получать только мутантные варианты ТМ-пептидов ErbB, в аминокислотной последовательности которых все остатки Met заменены.

В данной статье представлена методология, разработанная нами для достижения высокоуровневой экспрессии генов и эффективной очистки препаративных количеств изотопно-меченых производных нативных ТМ-фрагментов всех рецепторов семейства ErbB, что позволяет проводить исследование структуры полученных пептидов методом гетероядерной спектроскопии ЯМР [47].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы штаммы *E. coli* XL-10-Gold (“Stratagene”, США) и BL21(DE3)pLysS (“Stratagene”), плазмиды pGEMEX-1 (“Promega”, США) и pGEMEX-1/TRX-TMS [48]. Олигонуклеотиды синтезированы на заказ фирмой “Евгоген” (Россия). Секвенирование ДНК проводили в Межинститутском Центре коллективного пользования “ГЕНОМ” (Россия). Для введения изотопных меток ¹⁵N, ¹³C использованы реагенты фирмы “CIL” (США).

Клонирование и экспрессия генов. Плазмидные векторы для экспрессии генов пептидов в составе гибрида с тиоредоксином конструировали, как описано ранее [34, 36–39, 48]. Гены, соответствующие ТМ-фрагментам рецепторов ErbB человека (tmErbB): аминокислотные остатки 634–677 рецептора ErbB1 (tmErbB1), аминокислотные остатки 641–684 рецептора ErbB2 (tmErbB2), аминокислотные остатки 632–675 рецептора ErbB3 (tmErbB3), аминокислотные остатки 642–685 рецептора ErbB4 (tmErbB4) – собирали из 8 синтетических олигонуклеотидов с частично перекрывающимися последовательностями. Используемые кодоны оптимизировали для экспрессии генов в *E. coli*. В 3'-концевые праймеры вводили сайт рестрикции BamHI; в 5'-концевые праймеры вводили последовательность, кодирующую сайт узнавания энтерокиназы. Эту же последовательность вводили и на 3'-конец гена белка-носителя (TRX), амплифицированного при помощи ПЦР с вектора pGEMEX-1/(TRX-TMS) [48]. Рекомбинацию генов TRX и tmErbB с образованием TRX-tmErbB проводили при помощи ПЦР. Экспрессионные плазмиды pGEMEX-1/(TRX-tmErbB) (рис. 1б) получали в результате клонирования фрагментов TRX-tmErbB, обработанных эндонуклеазами рестрикции RsrII и BamHI, в линеаризованный теми же рестриктазами вектор pGEMEX-1/(TRX-TMS) [48]. Правильность нуклеотид-

ной последовательности в пределах экспрессионных каскад подтверждали при помощи секвенирования ДНК по обеим цепям.

Для экспрессии генов гибридных белков использовали клетки *E. coli* штамма BL21(DE3)pLysS. При получении изотопно-меченых белков использовали среду M9, содержащую 0.0002% дрожжевого экстракта, $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ и $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ -глюкозу (^{15}N , ^{13}C -мечение) или $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ и небогатенную глюкозу (^{15}N -мечение). Для продукции целевого гибридного белка в культуру клеток с оптической плотностью примерно 0.6 о.е. (длина волны 600 нм) добавляли индуктор, изопрропил- β -D-тиогалактозид (ИПТГ), до конечной концентрации 0.05 мМ (в случае tmErbB2) или 0.25 мМ (в случае tmErbB1, tmErbB3 и tmErbB4) и понижали температуру с 28°C до 13°C. Через 40 ч инкубации (скорость шейкера 250 об./мин) клетки собирали центрифугированием и хранили при -20°C.

Очистка целевых белков. Биомассу, полученную из 1 л культуры, суспендировали в 50 мл лизис-буфера (50 мМ Трис, pH 8.0, 150 мМ NaCl, 20 мМ 2-меркаптоэтанол, 10 мМ имидазол, 1% Тритон X-100, 0.2 мМ фенолметилсульфонилфторид), в который добавляли мочевины до концентрации 6 М (в случае tmErbB1) или 4 М (в случае tmErbB2 и tmErbB3); разрушали при помощи ультразвука, центрифугировали и фильтровали через мембрану с размером пор 0.22 мкм. Осветленный лизат наносили на колонку с Chelating Sepharose FF ("Amersham Bioscience", США), предварительно заряженную Ni^{2+} и уравновешенную буфером А (50 мМ Трис, pH 8.0, 250 мМ NaCl, 20 мМ 2-меркаптоэтанол, 1% Тритон X-100), содержащим 10 мМ имидазол и 6 М (tmErbB1) или 4 М (tmErbB2 или tmErbB3) мочевины. Смола последовательно промывали уравновешивающим буфером, затем буфером А, содержащим 10 мМ имидазол, и, наконец, буфером А с 60-мМ имидазолом. Белок элюировали буфером А, содержащим 200 мМ имидазол. После пятикратного разбавления элюата буфером, содержащим 50 мМ Трис, pH 8.0, и 1% Тритон X-100, добавляли легкую цепь рекомбинантной энтерокиназы человека [49] в соотношении 25 единиц фермента на 1 мг TRX-tmErbB1 и 50 единиц фермента на 1 мг TRX-tmErbB2, TRX-tmErbB3 или TRX-tmErbB4. После инкубации в течение ночи при комнатной температуре смесь наносили на колонку с Chelating Sepharose FF. Фракцию, не связавшуюся со смолой, собирали и наносили на колонку с SP Sepharose FF ("Amersham Bioscience"), уравновешенную буфером В (50 мМ NaOAc, pH 5.5, 1% Тритон X-100). Пептиды элюировали линейным градиентом NaCl (0–1 М). После осаждения 10%-ным раствором ТХУ очищенные пептиды трижды промывали ацетоном и высушивали под вакуумом. С помощью описанной процедуры удалось достичь выхода целевых белков от 2 до 10 мг с 1 л культуры клеток. Чистоту и соответствие очищенных пептидов целевым подтверждали с помо-

щью методов гель-электрофореза, масс-спектроскопии MALDI (оборудование Daltonics Ultraflex II TOF/TOF, "Bruker Daltonik", Германия) и спектроскопии ЯМР в смеси метанол : хлороформ (1 : 1, об./об.) с содержанием 5–10% (об./об.) воды или в смеси 2,2,2-трифторэтанол : вода (1 : 1, об./об.). Чистота рекомбинантных белков составляла не менее 97%.

Солюбилизация tmErbB в мембраноподобном окружении. Для проведения структурных исследований ТМ-пептидов использовали детергентные мицеллы и небольшие липидные бицеллы. Образцы изотопно-меченых tmErbB (1 мМ) солюбилизировали в водных растворах детергента додецилфосфохолина (ДФХ) или смеси липидов дигексаноилфосфатидилхолин/димиристоилфосфатидилхолин (ДФХ/ДМФХ), взятых в соотношении 1 : 4 ($q = 0.25$) при молярных соотношениях детергент/белок и липид/белок приблизительно 35 : 1. Сухие порошки белка и детергента или липидов растворяли в смеси 2,2,2-трифторэтанол/ H_2O (1 : 1, об./об.). Суспензию озвучивали в течение нескольких минут в ультразвуковой бане до полной прозрачности раствора и лиофилизировали в течение ночи. Высушенный препарат растворяли в буфере, содержащем дейтерированный ацетат натрия (20 мМ, pH ~5.0, 5% D_2O), и проводили 5–10 циклов охлаждения/нагрева (охлаждение до ~10°C, нагрев до ~40°C) с последующим озвучиванием в течение нескольких минут в ультразвуковой бане до достижения полной прозрачности раствора. В готовый образец добавляли ЭДТА (1 мМ) и азид натрия (0.15 мкМ) – с целью блокировать действие фосфолипаз и бактериальное заражение (соответственно).

Эксперименты по динамическому светорассеянию проводили при температуре 30°C на оборудовании DynaPro Titan ("Wyatt Technology Corporation", США) в 12-мкл кювете. Спектры КД, соответствующие tmErbB, встроенным в мицеллы, бицеллы или липосомы (фосфолипидный бислой), получали на спектрополяриметре J-810 ("Jasco", Япония). Эксперименты проводили в 0.01-см кварцевой кювете при температуре 30°C и концентрации белка 1 мг/мл. Спектры КД анализировали с использованием программы CDSSTTR [50]. Для приготовления небольших однослойных везикул суспензию липосом ДМФХ, при соотношении белок/липид 1 : 50, озвучивали во льду на ультразвуковом дезинтеграторе с титановым наконечником ("VirSonic-600", США) до полной прозрачности образца (примерно 10 мин).

Гетероядерные спектры ЯМР, соответствующие пептидам tmErbB, встроенным в мицеллы ДФХ или бицеллы ДМФХ/ДФХ, получали на спектрометре AVANCE 600 ("Bruker", США) с рабочей частотой на протонах 600 МГц и при температуре 40°C.

Характеристика полученных гибридных белков (TRX-tmErbB) и целевых пептидов (tmErbB)

ТМ-пеп- тид	Мол. масса ^а , кДа	Фрагмент ErbB и аминокислотная последовательность ^б	ЕК ^в , ед./мг	Выход ^г , мг/л	
				TRX-tmErbB	tmErbB
tmErbB1	4.7	ErbB1 (634–677) EGCPTNGPKIPSIATGMVGVALLLVVVALGIGLFMRRRHIVRKR	25	40	6
tmErbB2	4.7	ErbB2 (641–684) GCPAEQRASPLTSIISAVVGVILLVVLGVVFGILIKRRQKIRK	50	50	10
tmErbB3	5.0	ErbB3 (632–675) QTLVLIGKTHLTMALTVIAGLVVIFMMLGGTFLYW RGRRIQNKR	50	10	2
tmErbB4	4.8	ErbB4 (642–685) STLPQHARTPLIAAGVIGGLFILVVGTLFAVYVRRKSIKKRA	50	60	10

^а Расчетное значение молекулярной массы tmErbB-пептидов.

^б Серым выделены аминокислотные остатки, предположительно соответствующие ТМ-доменам. Подчеркнуты остатки, образующие димеризационные мотивы GG₄-типа [24, 25]. Остатки Met приведены на черном фоне.

^в Количество единиц активности легкой цепи энтерокиназы, требуемое для расщепления 1 мг гибридных белков TRX-tmErbB.

^г Усредненный выход гибридных белков (TRX-tmErbB) и очищенных пептидов (tmErbB), включая их ¹⁵N- и [¹⁵N-, ¹³C]-меченые производные, с 1 литра культуральной среды. Выход оценивали по интенсивности окрашивания Coomassie blue соответствующих полос в ПААГ после проведения электрофореза, а также по результатам взвешивания высушенных очищенных пептидов tmErbB.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Система экспрессии генов пептидов tmErbB

Исследование проводили на пептидах, аминокислотные последовательности которых включали полноразмерные ТМ-фрагменты рецепторов ErbB с прилегающими к гидрофобной области участками (таблица). Так как бактериальная экспрессия небольших пептидов сопровождается быстрой протеолитической деградацией, то для синтеза генов *tmErbB* конструировали гибридную систему, где в качестве белка-носителя использовали тиоредоксин А (TrxA) (рис. 1а). Гены пептидов собирали при помощи ПЦР с использованием синтетических олигонуклеотидов с перекрывающимися последовательностями. Используются кодоны оптимизировали для экспрессии целевых генов в *E. coli*. Между фрагментами TrxA и tmErbB гибридного белка помещали линкерный участок, содержащий последовательность из шести гистидиновых остатков (H6 или His₆-tag), и сайт расщепления энтерокиназой (ЕК). Последовательность His₆ необходима для очистки белка методом металлохелатной аффинной хроматографии (МХАХ), а сайт узнавания ЕК – для отделения целевого белка от белка-партнера. Подвижные глицин-богатые участки, Gly-Ser-Gly-Ser-Gly (элемент GS), с обеих сторон His₆-последовательности обеспечивали доступность этого участка для взаимодействия с активными группами сорбента, а ЕК-сайта – для фермента (рис. 1а). Кроме того, на N-конце TrxA предусматривали наличие аминокислотной последовательности (Helix), включающей 10 N-концевых аминокислотных

остатков мембраноактивного белка из *Helicobacter pylori* [51]. Недавно нами показано, что эта последовательность позволяет эффективно подавлять токсичность некоторых ТМ-пептидов по отношению к клетке-хозяину (данные не приведены). Гены, соответствующие последовательностям гибридных белков Helix-TrxA-GS-H6-GS-EK-tmErbB (далее TRX-tmErbB), встраивали в плазмидные векторы pGEMEX-1 под транскрипционный контроль T7-промотора с образованием экспрессионных векторов pGEMEX-1/(TRX-tmErbB) (рис. 1б).

В качестве штамма-хозяина *E. coli* нами выбраны клетки BL21(DE3)pLysS, поскольку целевой ген в них экспрессируется на приемлемом уровне. Гетерологическая экспрессия генов в препаративных количествах в клетках *E. coli* зачастую приводит к накоплению целевого белка в составе телец включения, представляющих собой большие нерастворимые белковые агрегаты. Клетки, трансформированные соответствующим вектором, после индукции синтеза целевого белка выращивали при двух температурах: 37°C и 13°C (накопленный нами опыт свидетельствует о том, что понижение температуры выращивания позволяет поддерживать рекомбинантный белок в растворимой форме). Уровень экспрессии генов, а также наличие целевого белка в лизате клеток, в растворимой или нерастворимой фракции, оценивали методом электрофореза в ДСН-ПААГ. Образцы для этой процедуры готовили следующим образом. Клетки инкубировали в буфере с лизоцимом и 1% Тритона X-100 и лизировали при помощи нескольких циклов замораживания–оттаивания. После озвучивания лизат центри-

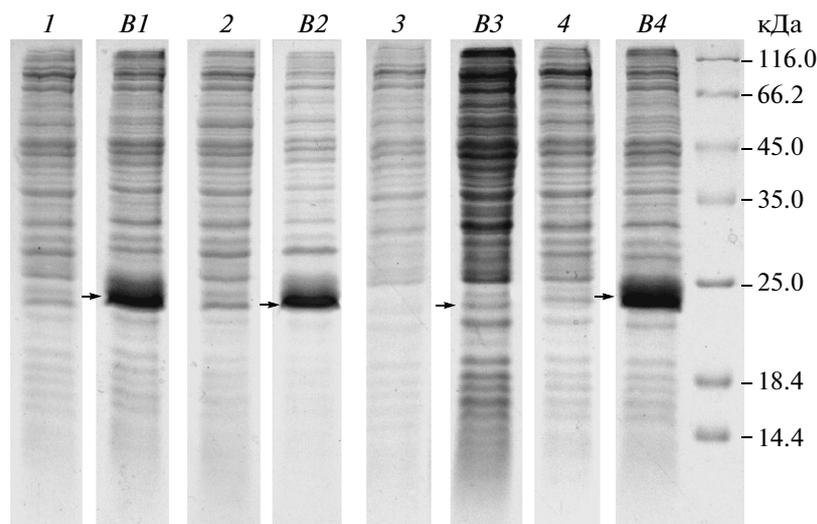


Рис. 2. Накопление целевых гибридных белков при выращивании рекомбинантных штаммов на минимальной солевой среде М9. Анализ в 14%-ном *трис*-глициновом ДСН-ПААГ клеточного лизата TRX-tmErbB1: 1 – без индуктора, B1 – при 0.25 мМ ИПТГ; TRX-tmErbB2: 2 – без индуктора, B2 – при 0.05 мМ ИПТГ; TRX-tmErbB3: 3 – без индуктора, B3 – при 0.25 мМ ИПТГ; TRX-tmErbB4: 4 – без индуктора, B4 – при 0.25 мМ ИПТГ. М – маркеры молекулярной массы белков. Стрелками указаны полосы, соответствующие целевым гибридным белкам TRX-tmErbB. Расчетная молекулярная масса TRX-tmErbB составляет приблизительно 20 кДа. В каждую ячейку нанесен эквивалент 30 мкл культуры клеток.

фугировали 15 мин при $12000 \times g$. Белок считали *растворимым*, если по данным ДСН-ПААГ-электрофореза он находился во фракции супернатанта осветленного клеточного лизата. В противоположном случае считали, что белок накапливается в составе *телец включения*. Все рекомбинантные штаммы эффективно продуцировали гибридные белки при выращивании клеток на минимальной солевой среде как с введением изотопных меток, так и без них (рис. 2). Если после индукции клетки росли при 37°C , то все TRX-tmErbB накапливались, в основном, в составе телец включения; в то время как при понижении температуры выращивания до 13°C все гибридные белки находились преимущественно в растворимой форме. При наработке целевых полипептидов в препаративных количествах рекомбинантные штаммы после индукции росли только при 13°C . Уровень экспрессии генов в зависимости от концентрации индуктора ИПТГ (1.0, 0.25, 0.05 и 0.01 мМ) оценивали при помощи ДСН-ПААГ-электрофореза. Максимальный выход целевых белков и их ^{15}N - или ^{15}N -, ^{13}C -меченых производных наблюдался для TRX-tmErbB2 при 0.05 мМ ИПТГ (рис. 3), а для остальных гибридных белков – при 0.25 мМ ИПТГ (рис. 2).

Очистка гибридных белков

После лизиса клеток гибридные белки очищали методом МХАХ. Во избежание выпадения в осадок целевых белков на этой и всех последующих стадиях использовали неионный детергент Тритон X-100.

Кроме того, для увеличения стабильности и снижения потерь при очистке гибридных белков TRX-tmErbB1, TRX-tmErbB2 и TRX-tmErbB3 использовали буферы с мочевиной (до 6 М, см. раздел “Экспериментальная часть”). Чистота полученных в результате МХАХ белковых препаратов составляла не менее 80%. Молекулярная масса гибридных белков, определенная по электрофоретической подвижности в трициновом ДСН-ПААГ (рис. 4), соответствовала расчетным значениям; в то время как в триглициновом ДСН-ПААГ их подвижность не совпадала с расчетной (рис. 2 и рис. 3).

Очищенные методом МХАХ гибридные белки расщепляли с использованием легкой цепи ЕК человека [49]. Этот фермент селективно гидролизует пептидную связь непосредственно после аминокислотной последовательности DDDDK (сайт ЕК, рис. 1a). Оптимизацию условий гидролиза проводили для каждого пептида, варьируя следующие параметры: время, температуру, соотношение фермент/субстрат, состав буфера, в котором проходит гидролиз, и концентрацию субстрата. Полного отделения пептидов tmErbB от белка-партнера достигали, используя в качестве реакционной смеси пятикратно разбавленные фракции, содержащие гибридный белок, и фермент – в расчете 25–50 ед. активности на 1 мг гибридного белка (таблица) (см. раздел “Экспериментальная часть”).

Пептид tmErbB2 уже получали ранее путем расщепления гибридного белка по остаткам Met с помощью CNBr [45, 46]. Несмотря на эффективность и дешевизну, этот метод не может быть использован

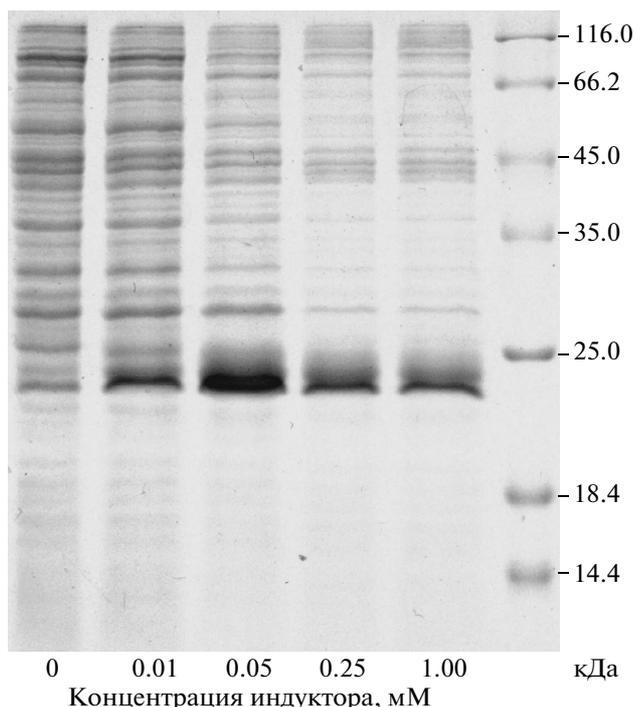


Рис. 3. Влияние концентрации ИПТГ на уровень экспрессии гена TRX-tmErbB2. Разделение в 14%-ном трис-глициновом ДСН-ПААГ. Приведены концентрации индуктора (мМ) и маркеры молекулярной массы (кДа). Расчетная молекулярная масса TRX-tmErbB2 составляет 19.8 кДа.

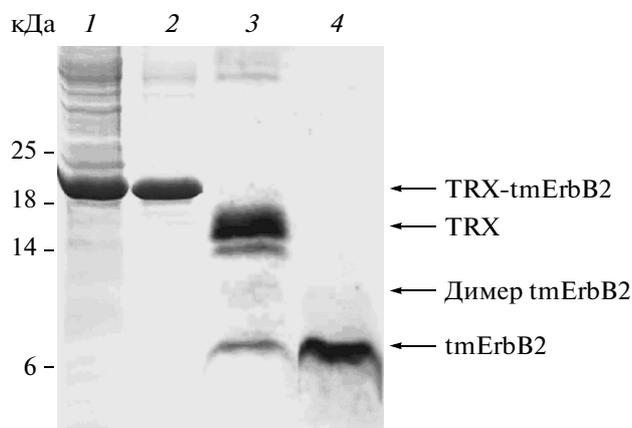


Рис. 4. Анализ эффективности очистки tmErbB2. 1 – Клеточный лизат, 2 – очищенный гибридный белок, 3 – продукты ЕК-гидролиза, 4 – очищенный tmErbB2. Стрелками справа отмечены гибридный белок TRX-tmErbB2, белок-носитель TRX, димерная и мономерная формы tmErbB2. Приведены результаты электрофореза в 14%-ном трициновом ДСН-ПААГ. Расчетная молекулярная масса TRX-tmErbB2 составляет 19.8 кДа, а tmErbB2 – 4.7 кДа.

для получения всех пептидов tmErbB, поскольку в аминокислотных последовательностях некоторых из них содержатся остатки Met (таблица). Применение ферментативного гидролиза, более мягкого по отношению к белку, чем расщепление с помощью

CNBr, позволило сохранить нативный аминокислотный состав исследуемых объектов.

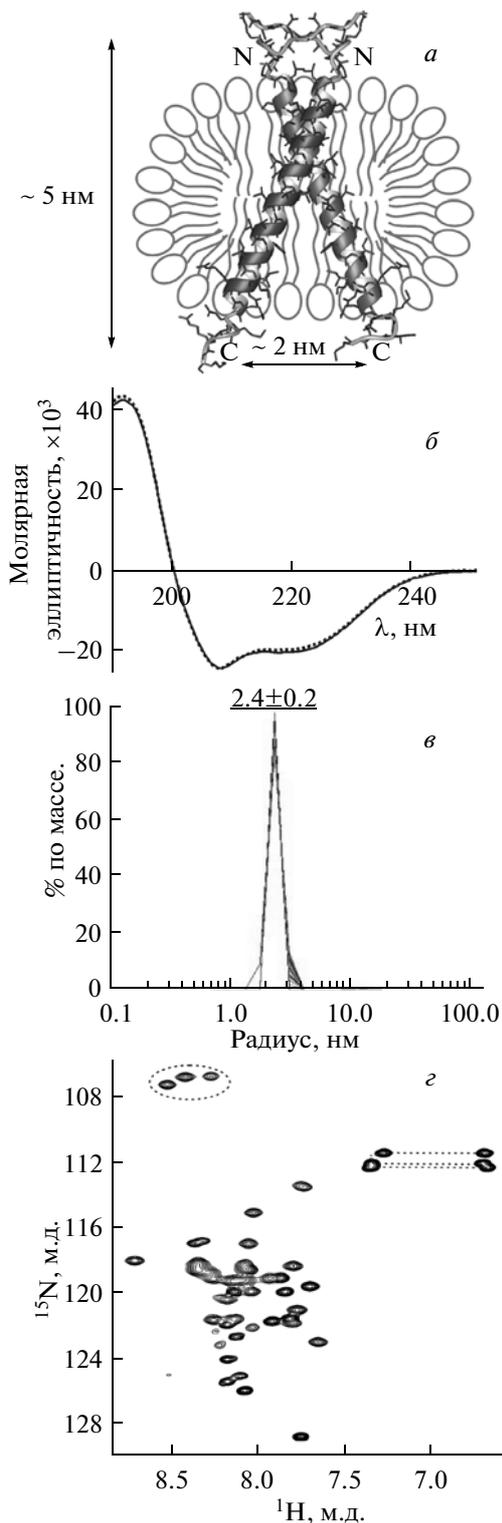
Реакцию гидролиза проводили в течение ночи, после чего, используя метод МХАХ, из реакционной смеси выделяли TRX-фрагменты, а также оставшиеся негидролизованной гибридные белки. После концентрирования и дополнительной очистки целевых пептидов tmErbB методом ионообменной хроматографии получены белковые препараты, степень чистоты которых составляла не менее 97%. На рис. 4 представлены результаты анализа (методом ДСН-ПААГ-электрофореза) эффективности гидролиза TRX-tmErbB2 и чистоты tmErbB2; остальные полипептиды получены по аналогичному протоколу с аналогичными результатами по выходу и чистоте. Электрофоретическая подвижность пептидов tmErbB соответствует преимущественно их мономерным формам. Чистота и соответствие очищенных пептидов целевым tmErbB подтверждены методами ЯМР- (рис. 5з) и масс-спектропии.

Как упомянуто выше, очищенные пептиды tmErbB солибилизировали в водном растворе детергента Тритон X-100. Однако оптическое поглощение водных растворов Тритон X-100 достигает высоких значений, особенно в диапазоне длин волн от 280 до 300 нм; по этой причине использование оптических методов анализа и определение вторичной структуры очищенных пептидов в этом детергенте посредством КД-спектропии не представляется возможным. Кроме того, для проведения структурных исследований ТМ-пептидов методом ЯМР-спектропии (см. ниже) требуются липид-подобные детергенты или липиды. Даже следовые количества Тритон X-100 в образце негативно влияют на свойства мицелл и бицелл, а также на пространственную структуру пептида; по этой причине очень важно полностью исключить этот детергент из препарата, предназначенного для анализа. При помощи ТХУ из раствора высаживали пептиды вместе с Тритон X-100, а затем осадок трижды промывали охлажденным ацетоном. На этом этапе Тритон X-100 переходит в растворимую фракцию, а белок, очищенный от детергента, остается в осадке. Отсутствие Тритон X-100 в белковых образцах подтверждали с помощью ЯМР-спектропии. В результате проведенных процедур получены целевые пептиды (tmErbB1, tmErbB2, tmErbB3 и tmErbB4) в сухом виде с чистотой не менее 97% (таблица).

Солюбилизация пептидов tmErbB в среде, имитирующей мембрану

Для успешного проведения структурно-функциональных исследований мембранных белков необходим тщательный выбор среды, которая имитировала бы нативное окружение белка в клеточной мембране. При изучении мембранных белков методом спектроскопии ЯМР высокого разрешения в качестве такой среды чаще всего используют отно-

Рис. 5. Анализ структуры пептида tmErbV в липидном окружении оптическими методами и ЯМР-спектроскопией. *a* – Схематическое представление липидной бицеллы со встроенным в нее димером tmErbV2. Средняя бицелла ДМФХ/ДГФХ/белок состоит из 2 молекул tmErbV2 (гомодимер) и приблизительно 70 молекул липида и имеет суммарную массу ~44 кДа [36]. *б* – КД-спектр димера tmErbV2 в системе, моделирующей мембрану: в бицеллах ДМФХ/ДГФХ (пунктирная линия), в мембрано-подобной системе – моноамеллярных липосомах ДМФХ (сплошная линия). В обеих системах полученные спектры типичны для α -спиральной конформации пептида. *в* – Суперпозиция 40 гистограмм распределения частиц по размеру, полученных при помощи динамического светорассеяния для tmErbV2 в бицеллах ДМФХ/ДГФХ. Приведено распределение частиц с различной относительной массой по их размеру. *г* – Гетероядерный 2D [^1H - ^{15}N]-HSQC спектр ЯМР ^{15}N -меченого пептида tmErbV2 в бицеллах ДМФХ/ДГФХ. Кросс-пики от NH-групп трех остатков Gly обведены пунктирной линией; кросс-пики от NH_2 -групп остатков Asn и Gln соединены пунктирной линией. В спектрах присутствуют кросс-пики различной ширины: узкие – от подвижных, экспонированных в воду N- и C-концевых участков; уширенные – от трансмембранного участка, пронизывающего гидрофобную область бицеллы. Дисперсия химических сдвигов ^{15}N основной цепи ТМ-области характерна для участков с α -спиральной конформацией.



нительно небольшие мицеллы и бицеллы, состоящие из смеси детергентов и/или липидов [52]. В данной работе для солюбилизации пептидов tmErbV использовали мицеллы ДФХ или бицеллы ДМФХ/ДГФХ. При оптимизации состава мицелл или бицелл для проведения ЯМР-исследований мы брали за основу три критерия: 1) подходящий размер супрамолекулярных комплексов (≤ 40 – 60 кДа), состоящих из мицелл или бицелл со встроенным в них tmErbV в димерном состоянии; 2) монодисперсность образца и отсутствие олигомеров белка; 3) процент альфа-спиральных участков, соответствующий нативной конформации белка в составе клеточной мембраны.

Эффективность встраивания ТМ-пептидов в мицеллы детергента или липидное окружение, размер супрамолекулярных комплексов, склонность ТМ-пептидов к олигомеризации, а также вторичную структуру целевых фрагментов РТК исследовали с помощью ЯМР-спектроскопии и таких оптических методов, как динамическое светорассеяние и КД-спектроскопия. В работе мы приводим только результаты, полученные для tmErbV2 в бицеллах ДМФХ/ДГФХ (рис. 5а), как для представителя ТМ-пептидов РТК семейства ErbV. Результаты, полученные для остальных пептидов tmErbV, аналогичны полученным для tmErbV2 [36] и в настоящее время уже опубликованы (tmErbV1/tmErbV2 [37]) или готовятся к печати (остальные пептиды tmErbV).

Вторичную структуру tmErbV в мицеллах и бицеллах определяли методом спектроскопии КД. КД-спектры, полученные для tmErbV2 в бицеллах ДМФХ/ДГФХ и в фосфолипидном бислое (липо-

сомы ДМФХ), практически идентичны и характерны для полипептидной цепи, находящейся в конформации α -спирали с двумя минимумами, при 208 и 220 нм, и максимумом при 192 нм (рис. 5б). Содержание спиральных участков в обоих случаях составляло примерно 65%, что хорошо согласуется с

данными ЯМР, полученными для tmErbB2 в бицеллах ДМФХ/ДФХ [36]. Метод динамического светорассеяния показал, что tmErbB2 в бицеллах ДМФХ/ДФХ представляет собой монодисперсный образец (полидисперсность 9%), который содержит частицы преимущественно одного размера с гидродинамическим радиусом 2.4 ± 0.2 нм (рис. 5б), что типично для небольших изотропных бицелл [53, 54]. Таким образом, результаты оптического анализа tmErbB2 в липидном окружении явно свидетельствуют в пользу того, что исследуемые пептиды в липидных бицеллах принимают конформацию максимально близкую к природной.

Качество полученных образцов, с точки зрения возможности проведения структурных исследований методом спектроскопии ЯМР, оценивали с использованием двумерных [^1H - ^{15}N]-HSQC спектров. Анализировали общее количество разрешенных кросс-пиков, количество кросс-пиков в области NH-сигналов остатков Gly, уширение и двоение сигналов. Общее количество пиков, хорошая дисперсия сигналов и небольшая ширина линий в спектре [^1H - ^{15}N]-HSQC (рис. 5з) соответствовали ожидаемым на основании аминокислотной последовательности пептида, его вторичной структуры и гидродинамического размера. Это указывает на то, что tmErbB2 в бицеллах ДМФХ/ДФХ находится в одной конформации и подходит для структурных исследований методом ЯМР. В проведенных позднее ЯМР-исследованиях нами показано, что tmErbB2, действительно, образует стабильные димеры в бицеллах [36] и в димеризацию вовлечен N-концевой мотив GG₄-типа; при этом димерная конформация ErbB2 [36], по-видимому, соответствует активированному состоянию рецептора (рис. 5а) [36, 55].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получение миллиграммовых количеств рекомбинантных пептидов tmErbB (включая изотопно-меченые производные) высокой степени чистоты, а также относительно небольшой размер комплексов пептид/детергент и пептид/липид — те факторы, которые позволяют проводить исследование пространственной структуры гомо- и гетеродимеров tmErbB методом трехмерной спектроскопии ЯМР высокого разрешения. Пептиды tmErbB в мицеллах или бицеллах адекватно имитируют нативную конформацию ТМ-участков рецепторов ErbB [36, 55]. Рекомбинантные изотопно-меченые пептиды tmErbB1 и tmErbB2 уже использованы для определения их структуры высокого разрешения в бицеллах ДМФХ/ДФХ и изучения механизмов их гомо- и гетеродимеризации [36, 37]. В настоящее время мы исследуем структуру и процессы димеризации других пептидов tmErbB, получение которых описано в этой работе.

Надо сказать, что предложенная технология продукции рекомбинантных пептидов дает исследователю мощный инструмент, использование которого может пролить свет на механизм передачи сигнала рецепторами ErbB и другими РТК. Определение пространственной структуры димерных трансмембранных участков ErbB позволит выявить механизмы жизненно важных биологических процессов и заложит основу современного подхода к рациональному дизайну лекарственных препаратов нового поколения. Например, они могут быть основаны на синтетических пептидах, специфически взаимодействующих с ТМ-участками РТК и тем самым регулирующих свойства этих рецепторов.

Авторы благодарны Елене Олеговне Артеменко и д.б.н., проф. Алексею Валерьевичу Феофанову за помощь, оказанную при снятии и интерпретации спектров КД; к.ф.-м.н. Александру Григорьевичу Соболю за помощь, оказанную при снятии и интерпретации спектров динамического светорассеяния.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, программы Российской академии наук “Молекулярная и клеточная биология” и Федеральных целевых программ “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 годы” (П1276 и 16.740.11.0195), а также Федеральной целевой программы “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы” (16.512.11.2172).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Olayioye M.A., Neve R.M., Lane H.A., Hynes N.E. 2000. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J.* **19**, 3159–3167.
2. Yarden Y., Sliwkowski M.X. 2001. Untangling the ErbB signalling network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 127–137.
3. Schlessinger J. 2000. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell.* **103**, 211–225.
4. Yarden Y., Ullrich A. 1988. Growth factor receptor tyrosine kinases. *Annu. Rev. Biochem.* **57**, 443–478.
5. Fantl W.J., Johnson D.E., Williams L.T. 1993. Signaling by receptor tyrosine kinases. *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 453–481.
6. Rajkumar T., Gullick W.J. 1994. The type I growth factor receptors in human breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **29**, 3–9.
7. Warren C.M., Landgraf R. 2006. Signaling through ERBB receptors: multiple layers of diversity and control. *Cell. Signal.* **18**, 923–933.
8. Moriki T., Maruyama H., Maruyama I.N. 2001. Activation of preformed EGF receptor dimers by ligand-induced rotation of the transmembrane domain. *J. Mol. Biol.* **311**, 1011–1026.
9. Holbro T., Civenni G., Hynes N.E. 2003. The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp. Cell Res.* **284**, 99–110.

10. Woodburn J.R. 1999. The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy. *Pharmacol. Ther.* **82**, 241–250.
11. Muraoka-Cook R.S., Feng S.M., Strunk K.E., Earp III H.S. 2008. ErbB4/HER4: role in mammary gland development, differentiation and growth inhibition. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* **13**, 235–246.
12. Barnes N.L., Khavari S., Boland G.P., Cramer A., Knox W.F., Bundred N.J. 2005. Absence of HER4 expression predicts recurrence of ductal carcinoma in situ of the breast. *Clin. Cancer Res.* **11**, 2163–2168.
13. Naresh A., Long W., Vidal G.A., Wimley W.C., Marrero L., Sartor C.I., Tovey S., Cooke T.G., Bartlett J.M., Jones F.E. 2006. The ERBB4/HER4 intracellular domain 4ICD is a BH3-only protein promoting apoptosis of breast cancer cells. *Cancer Res.* **66**, 6412–6420.
14. Schlessinger J. 2002. Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell.* **110**, 669–672.
15. Tao R.H., Maruyama I.N. 2008. All EGF(ErbB) receptors have preformed homo- and heterodimeric structures in living cells. *J. Cell. Sci.* **121**, 3207–3217.
16. Bennisroune A., Fickova M., Gardin A., Dirrig-Grosch S., Aunis D., Crémel G., Hubert P. 2004. Transmembrane peptides as inhibitors of ErbB receptor signaling. *Mol. Biol. Cell.* **15**, 3464–3474.
17. Duneau J.P., Vegh A.P., Sturgis J.N. 2007. A dimerization hierarchy in the transmembrane domains of the HER receptor family. *Biochemistry.* **46**, 2010–2019.
18. Mendrola J.M., Berger M.B., King M.C., Lemmon M.A. 2002. The single transmembrane domains of ErbB receptors self-associate in cell membranes. *J. Biol. Chem.* **277**, 4704–4712.
19. Li E., Hristova K. 2006. Role of receptor tyrosine kinase transmembrane domains in cell signaling and human pathologies. *Biochemistry.* **45**, 6241–6251.
20. Partridge A.W., Therien A.G., Deber C.M. 2002. Polar mutations in membrane proteins as a biophysical basis for disease. *Biopolymers.* **66**, 350–358.
21. Frank B., Hemminki K., Wirtenberger M., Bermejo J.L., Bugert P., Klaes R., Schmutzler R.K., Wappenschmidt B., Bartram C.R., Burwinkel B. 2005. The rare ERBB2 variant Ile654Val is associated with an increased familial breast cancer risk. *Carcinogenesis.* **26**, 643–647.
22. Escher C., Cymer F., Schneider D. 2009. Two GxxxG-like motifs facilitate promiscuous interactions of the human ErbB transmembrane domains. *J. Mol. Biol.* **389**, 10–16.
23. Mackenzie K.R. 2006. Folding and stability of alpha-helical integral membrane proteins. *Chem. Rev.* **106**, 1931–1977.
24. Russ W.P., Engelman D.M. 2000. The GxxxG motif: a framework for transmembrane helix-helix association. *J. Mol. Biol.* **296**, 911–919.
25. Curran A.R., Engelman D.M. 2003. Sequence motifs, polar interactions and conformational changes in helical membrane proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13**, 412–417.
26. Enosh A., Fleishman S.J., Ben-Tal N., Halperin D. 2007. Prediction and simulation of motion in pairs of transmembrane alpha-helices. *Bioinformatics.* **23**, 212–218.
27. Smith S.O., Smith C., Shekar S., Peersen O., Zilio M., Aimoto S. 2002. Transmembrane interactions in the activation of the Neu receptor tyrosine kinase. *Biochemistry.* **41**, 9321–9332.
28. Fleishman S.J., Schlessinger J., Ben-Tal N. 2002. A putative molecular-activation switch in the transmembrane domain of erbB2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**, 15937–15940.
29. Jiang G., Hunter T. 1999. Receptor signaling: when dimerization is not enough. *Curr. Biol.* **9**, 568–571.
30. Carpenter E.P., Beis K., Cameron A.D., Iwata S. 2008. Overcoming the challenges of membrane protein crystallography. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **18**, 581–586.
31. Junge F., Schneider B., Reckel S., Schwarz D., Dötsch V., Bernhard F. 2008. Large-scale production of functional membrane proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 1729–1755.
32. Midgett C.R., Madden D.R. 2007. Breaking the bottleneck: eukaryotic membrane protein expression for high-resolution structural studies. *J. Struct. Biol.* **160**, 265–274.
33. MacKenzie K.R., Prestegard J.H., Engelman D.M. 1997. A transmembrane helix dimer: structure and implications. *Science.* **276**, 131–133.
34. Bocharov E.V., Pustovalova Y.E., Pavlov K.V., Volynsky P.E., Goncharuk M.V., Ermolyuk Y.S., Karpunin D.V., Schulga A.A., Kirpichnikov M.P., Efremov R.G., Maslennikov I.V., Arseniev A.S. 2007. Unique dimeric structure of BNip3 transmembrane domain suggests membrane permeabilization as a cell death trigger. *J. Biol. Chem.* **282**, 16256–16266.
35. Sulistijo E.S., Mackenzie K.R. 2009. Structural basis for dimerization of the BNIP3 transmembrane domain. *Biochemistry.* **48**, 5106–5120.
36. Bocharov E.V., Mineev K.S., Volynsky P.E., Ermolyuk Y.S., Tkach E.N., Sobol A.G., Chupin V.V., Kirpichnikov M.P., Efremov R.G., Arseniev A.S. 2008. Spatial structure of the dimeric transmembrane domain of the growth factor receptor ErbB2 presumably corresponding to the receptor active state. *J. Biol. Chem.* **283**, 6950–6956.
37. Mineev K.S., Bocharov E.V., Pustovalova Y.E., Bocharova O.V., Chupin V.V., Arseniev A.S. 2010. Spatial structure of the transmembrane domain heterodimer of ErbB1 and ErbB2 receptor tyrosine kinases. *J. Mol. Biol.* **400**, 231–243.
38. Bocharov E.V., Mayzel M.L., Volynsky P.E., Goncharuk M.V., Ermolyuk Y.S., Schulga A.A., Artemenko E.O., Efremov R.G., Arseniev A.S. 2008. Spatial structure and pH-dependent conformational diversity of dimeric transmembrane domain of the receptor tyrosine kinase EphA1. *J. Biol. Chem.* **283**, 29385–29395.
39. Bocharov E.V., Mayzel M.L., Volynsky P.E., Mineev K.S., Tkach E.N., Ermolyuk Y.S., Schulga A.A., Efremov R.G., Arseniev A.S. 2010. Left-handed dimer of EphA2 transmembrane domain: helix packing diversity among receptor tyrosine kinases. *Biophys. J.* **98**, 881–889.
40. Gullick W.J., Bottomley A.C., Lofts F.J., Doak D.G., Mulvey D., Newman R., Crumpton M.J., Sternberg M.J., Campbell I.D. 1992. Three dimensional structure of the transmembrane region of the proto-oncogenic and oncogenic forms of the neu protein. *EMBO J.* **11**, 43–48.

41. Rigby A.C., Barber K.R., Shaw G.S., Grant C.W. 1996. Transmembrane region of the epidermal growth factor receptor: behavior and interactions via ^2H NMR. *Biochemistry*. **35**, 12591–12601.
42. Jones D.H., Barber K.R., Grant C.W. 1998. Sequence-related behaviour of transmembrane domains from class I receptor tyrosine kinases. *Biochim. Biophys. Acta*. **1371**, 199–212.
43. Houliston R.S., Hodges R.S., Sharom F.J., Davis J.H. 2003. Comparison of proto-oncogenic and mutant forms of the transmembrane region of the Neu receptor in TFE. *FEBS Lett.* **535**, 39–43.
44. Khemtémourian L., Lavielle S., Bathany K., Schmitter J.M., Dufourc E.J. 2006. Revisited and large-scale synthesis and purification of the mutated and wild type neu/erbB-2 membrane-spanning segment. *J. Pept. Sci.* **12**, 361–368.
45. Jones D.H., Ball E.H., Sharpe S., Barber K.R., Grant C.W. 2000. Expression and membrane assembly of a transmembrane region from Neu. *Biochemistry*. **39**, 1870–1878.
46. Sharpe S., Barber K.R., Grant C.W. 2000. Val(659)→Glu mutation within the transmembrane domain of ErbB-2: effects measured by (^2H) NMR in fluid phospholipid bilayers. *Biochemistry*. **39**, 6572–6580.
47. Volynsky P.E., Bocharov E.V., Nolde D.E., Vereschaga Ya.A., Mayzel M.L., Mineev K.S., Mineeva E.A., Pustovalova Yu.E., Gagnidze I.E., Efremov R.G., Arseniev A.S. 2006. Solution of the spatial structure of dimeric transmembrane domains of proteins by heteronuclear NMR spectroscopy and molecular modeling. *Biophysics*. **51**, 23–27.
48. Кирпичников М.П., Гончарук М.В., Ермолюк Я.С., Гончарук С.А., Шульга А.А., Масленников И.В., Арсеньев А.С. 2005. Структурная биология мембранных пептидов. *Технологии живых систем*. **2**, 20–27.
49. Gasparian M.E., Ostapchenko V.G., Schulga A.A., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P. 2003. Expression, purification, and characterization of human enteropeptidase catalytic subunit in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* **31**, 133–139.
50. Sreerama N., Woody R.W. 2000. Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Analyt. Biochem.* **287**, 252–260.
51. Melchers K., Weitzenegger T., Buhmann A., Steinhilber W., Sachs G., Schäfer K.P. 1996. Cloning and membrane topology of a P type ATPase from *Helicobacter pylori*. *J. Biol. Chem.* **271**, 446–457.
52. Kim H.J., Howell S.C., Van Horn W.D., Jeon Y.H., Sanders C.R. 2009. Recent advances in the application of solution NMR spectroscopy to multi-span integral membrane proteins. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **55**, 335–360.
53. Luchette P.A., Vetman T.N., Prosser R.S., Hancock R.E., Nieh M.P., Glinka C.J., Krueger S., Katsaras J. 2001. Morphology of fast-tumbling bicelles: a small angle neutron scattering and NMR study. *Biochim. Biophys. Acta*. **1513**, 83–94.
54. Andersson A., Mäler L. 2005. Magnetic resonance investigations of lipid motion in isotropic bicelles. *Langmuir*. **21**, 7702–7709.
55. Jura N., Endres N.F., Engel K., Deindl S., Das R., Lamers M.H., Wemmer D.E., Zhang X., Kuriyan J. 2009. Mechanism for activation of the EGF receptor catalytic domain by the juxtamembrane segment. *Cell*. **137**, 1293–1307.