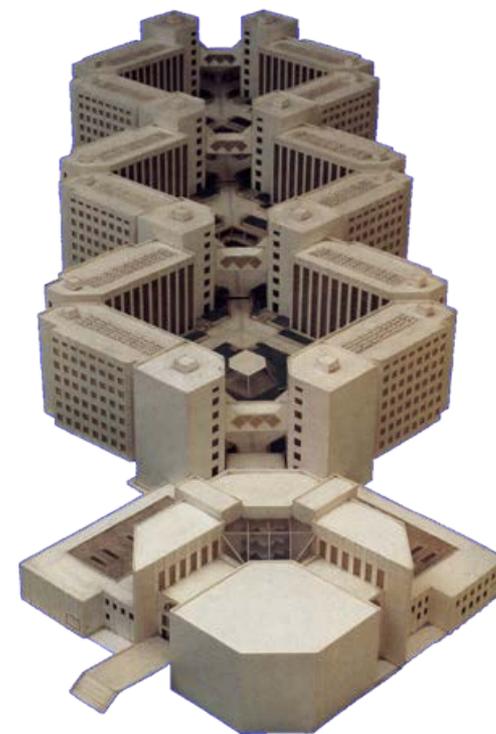


# Липид-белковые нанодиски – перспективная среда для ренатурации и структурно- функциональных исследований мембранных белков

**Шенкарев Захар Олегович**

*Лаборатория биомолекулярной  
ЯМР спектроскопии, ИБХ РАН*

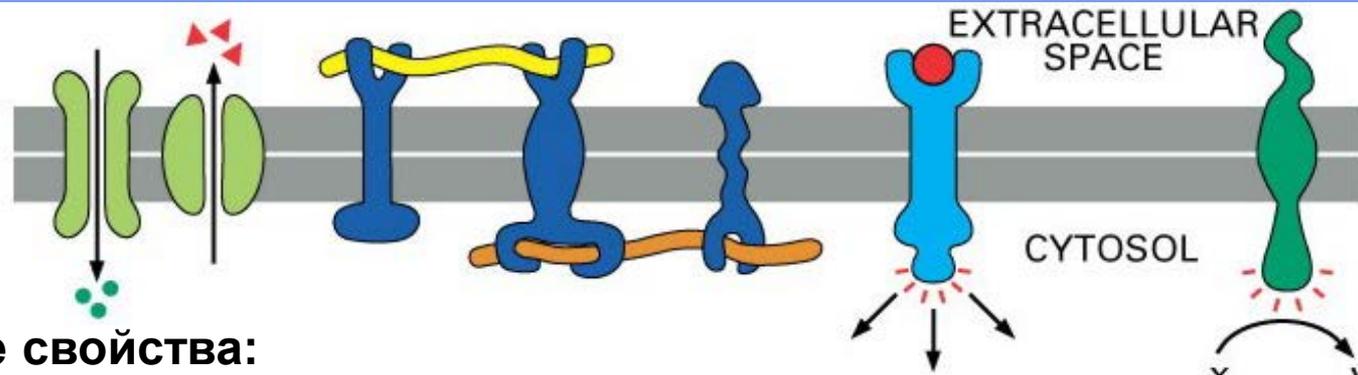


# Мембранные белки (МБ)

## Биологические свойства:

- До 30% белковых последовательностей закодированных в геноме человека
- Участвуют в межклеточной сигнализации, метаболизме и энергетике
- Отвечают за работу иммунной, нервной и эндокринной систем высших животных
- Мишени для ~ 60% современных лекарств

## Транспортеры    Закрепление в мембране    Рецепторы    Ферменты



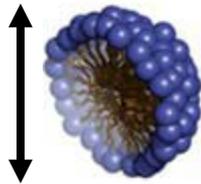
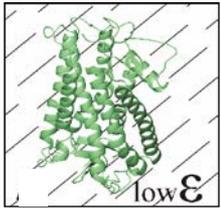
## Структурные свойства:

- Трансмембранные (ТМ) домены МБ в большинстве случаев организованы в виде связок гидрофобных спиралей
- Для стабилизации нативной пространственной структуры МБ необходима биологическая мембрана или специальная мембраномоделирующая среда
- По сравнению с глобулярными водорастворимыми белками МБ плохо изучены (~ 2% из ~ 50,000 белковых структур представленных в PDB)

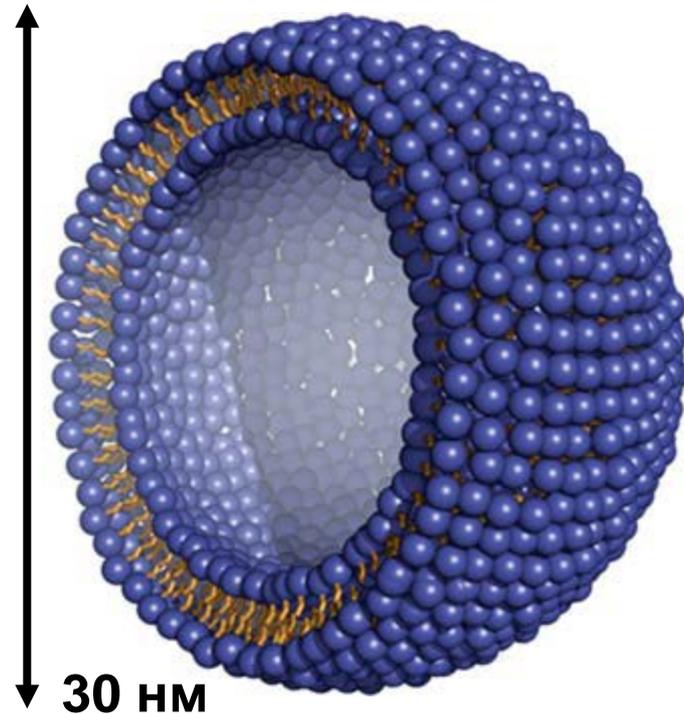
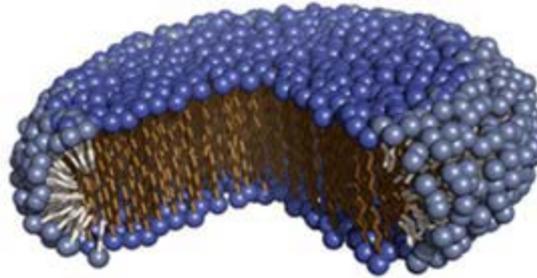
## Возможные сферы применения МБ:

- Биотехнология (мембранные ферменты)
- Био-нанотехнология (химические сенсоры, фотоактивируемые белки)
- Фармакология и медицина (мембранные рецепторы – мишени лекарств)
- Доставка лекарств гидрофобной природы, мембраноактивные лекарства

# Для стабилизации МБ в растворе необходимы мембраномоделирующие среды



6 нм



30 нм

## Растворители с низкой полярностью

- Изотропные свойства, не позволяют «адекватно» моделировать мембрану
- Токсичны

## Мицеллы/бицеллы детергентов/липидов

- Высоко-динамичные эллиптические частицы (6 - ... нм)
- Анизотропны, хорошо моделируют жирнокислотные цепи и полярные головки липидов
- В некоторых случаях способны поддерживать «нативную» пространственную структуру и активность солюбилизованных МБ
- Низкая стабильность, большая кривизна поверхности, отсутствие «латерального» давления, денатурирующее действие детергента

## Липидные везикулы (липосомы)

- “Идеальные” мембраномоделирующие свойства
- Низкая стабильность (слияние липосом, агрегация инкапсулированных белков)
- Большой размер ~ 30 – 100 нм (моноламелярные), и больше (мультиламелярные)
- Доступна только внешняя сторона мембраны

# Лipoppoтeины плазмы крови человека

- **Лipoppoтeины** – сферические частицы, состоящие из липидного ядра, окруженного белковыми молекулами – аполипопротеинами. Подразделяются по размеру и плотности. Участвуют в транспорте липидов и холестерина в организме.
- **Аполипопротеины** – (6 классов А, В, С, D, E и F ) обеспечивают адресную доставку липопротеиновых комплексов в различные ткани организма.
- Повышенное содержание в плазме крови частиц липопротеинов низкой плотности (**LDL**, плохой холестерин) увеличивает риск развития атеросклероза и других сердечно-сосудистых заболеваний.
- Повышенное содержание частиц липопротеинов высокой плотности (**HDL**, хороший холестерин) замедляет развитие сердечно-сосудистых заболеваний.

Тип частиц Роль	Плотность Размер	Доля белка (%) Основные белки	PL/ChI/TG
HDL (высокая плотность) Транспорт холестерина	1.06–1.2 (г/см <sup>3</sup> ) <b>4–10</b> (нм)	<b>50% A-I</b> (A-II, C-I, C-II, C-III, E)	30/18/5
LDL (низкая плотность) Транспорт холестерина	1.02–1.06 (г/см <sup>3</sup> ) 18–25 (нм)	20% B	24/45/10
VLDL (очень низкая плотность) Транспорт триглицеридов	0.93–1.01 (г/см <sup>3</sup> ) 30–80 (нм)	10% B (C-I, C-II, C-III, E)	19/19/50
Chylomicrons (хиломикроны) Транспорт триглицеридов	0.93–1.01 (г/см <sup>3</sup> ) 75–120 (нм)	1% C-III (B, C-I, C- II, D, E)	4/6/90

# Липопротеины высокой плотности (HDL)

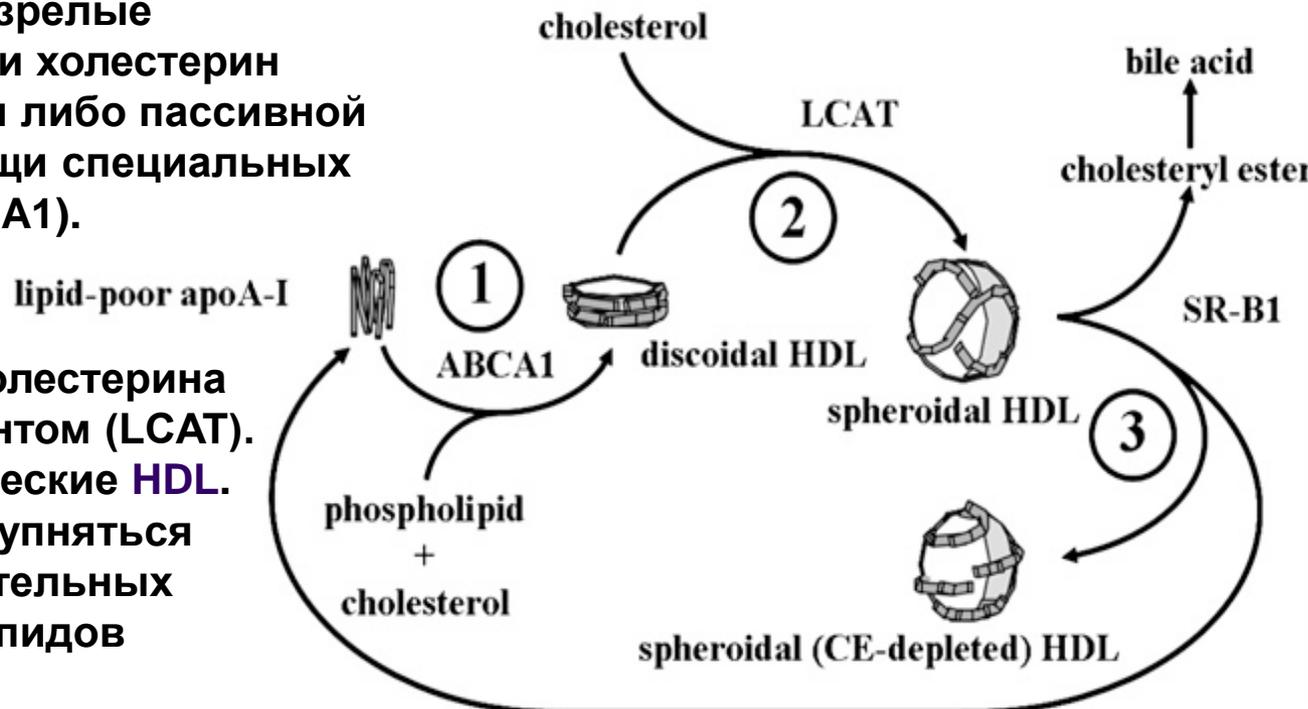
- Липопротеины плазмы крови – сферические частицы, состоящие из липидного ядра, окруженного белковыми молекулами – аполипопротеинами. Подразделяются по размеру и плотности. Участвуют в транспорте липидов и холестерина в организме.
- Частицы липопротеинов высокой плотности (HDL) отвечают за обратный транспорт холестерина. Повышенное содержание HDL (хороший холестерин) в плазме крови замедляет развитие атеросклероза и других сердечно-сосудистых заболеваний.

## Обратный транспорт холестерина

1. Молекулы Apo-AI связываются с липидами и холестерином, образуя незрелые (дискоидные) HDL. Липиды и холестерин транспортируются из клетки либо пассивной диффузией, либо при помощи специальных белков-транспортеров (ABCA1).

2. Эфиры жирных кислот холестерина встраиваются в HDL ферментом (LCAT). Образуются зрелые сферические HDL. Сферические HDL могут укрупняться с присоединением дополнительных молекул ApoA-I/ApoA-II и липидов (“lipoprotein remodeling”).

3. Сферические HDL транспортируют эфиры холестерина в печень (рецептор на гепатоцитах SR-B1).

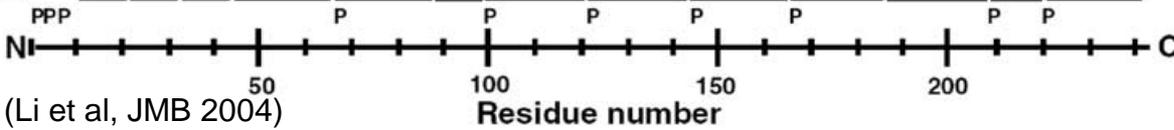
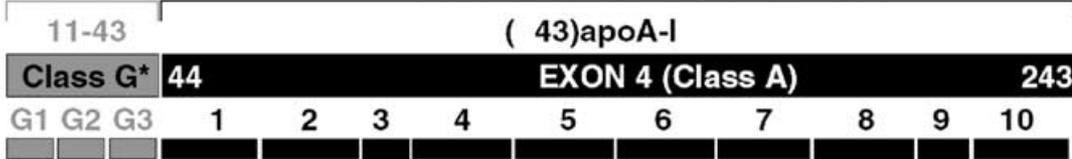


# Пространственная структура apoA-I человека и HDL

## 11/22mer TANDEM REPEATS

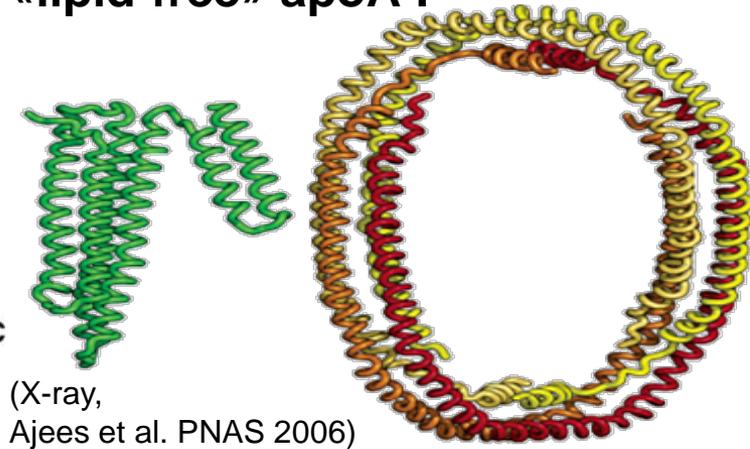
Flexible domain

Lipid-associating domain



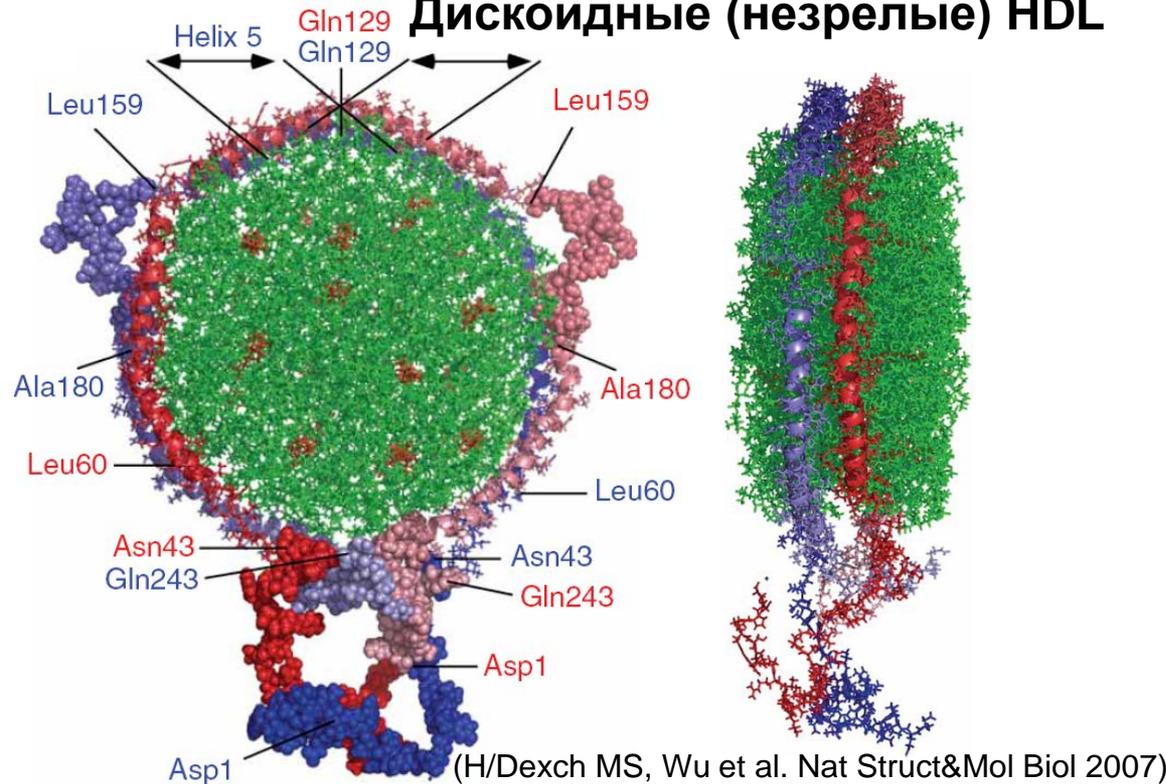
(Li et al, JMB 2004)

## «lipid-free» apoA-I

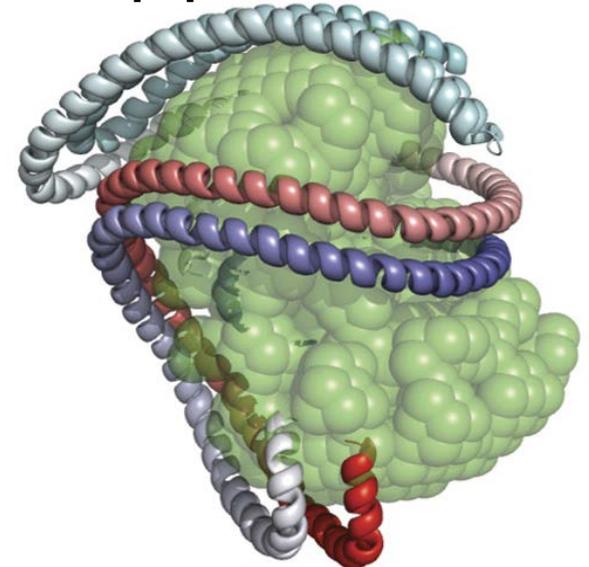


(X-ray, Borhani et al. PNAS 1997)

## Дискоидные (незрелые) HDL

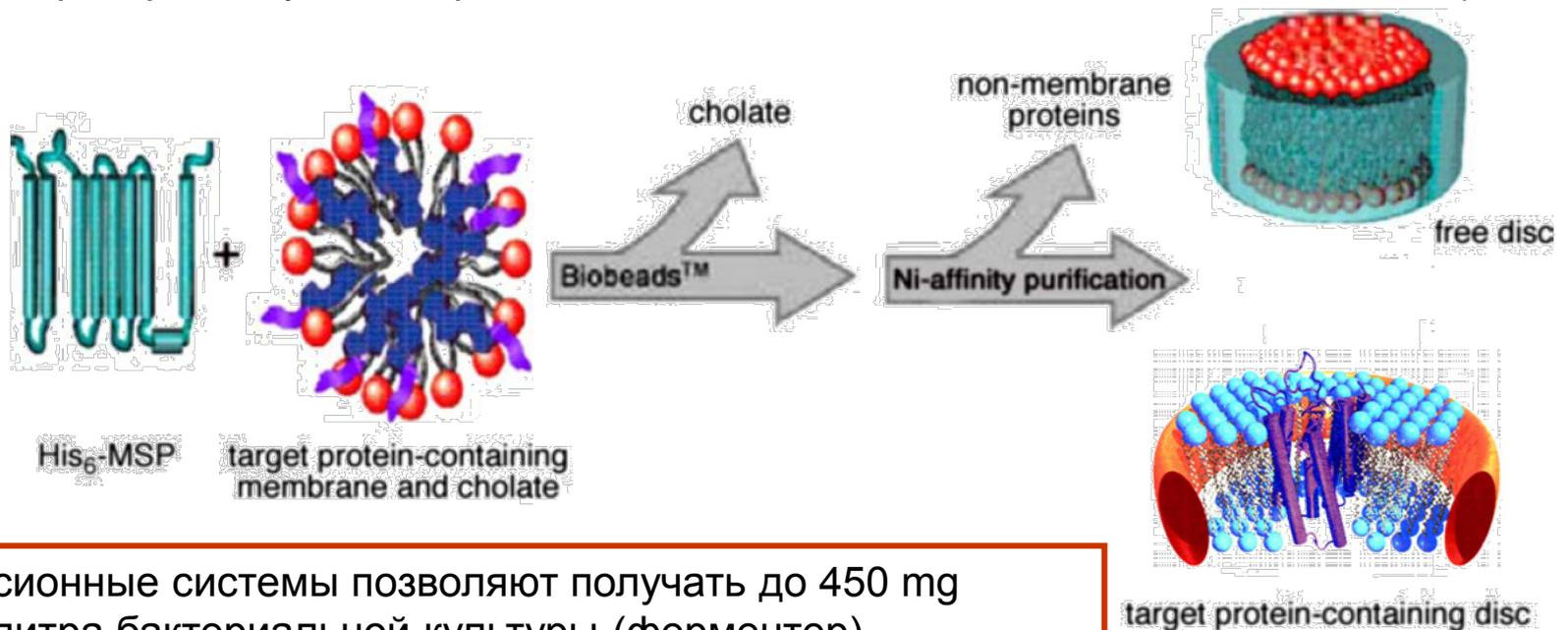


## Сферические HDL



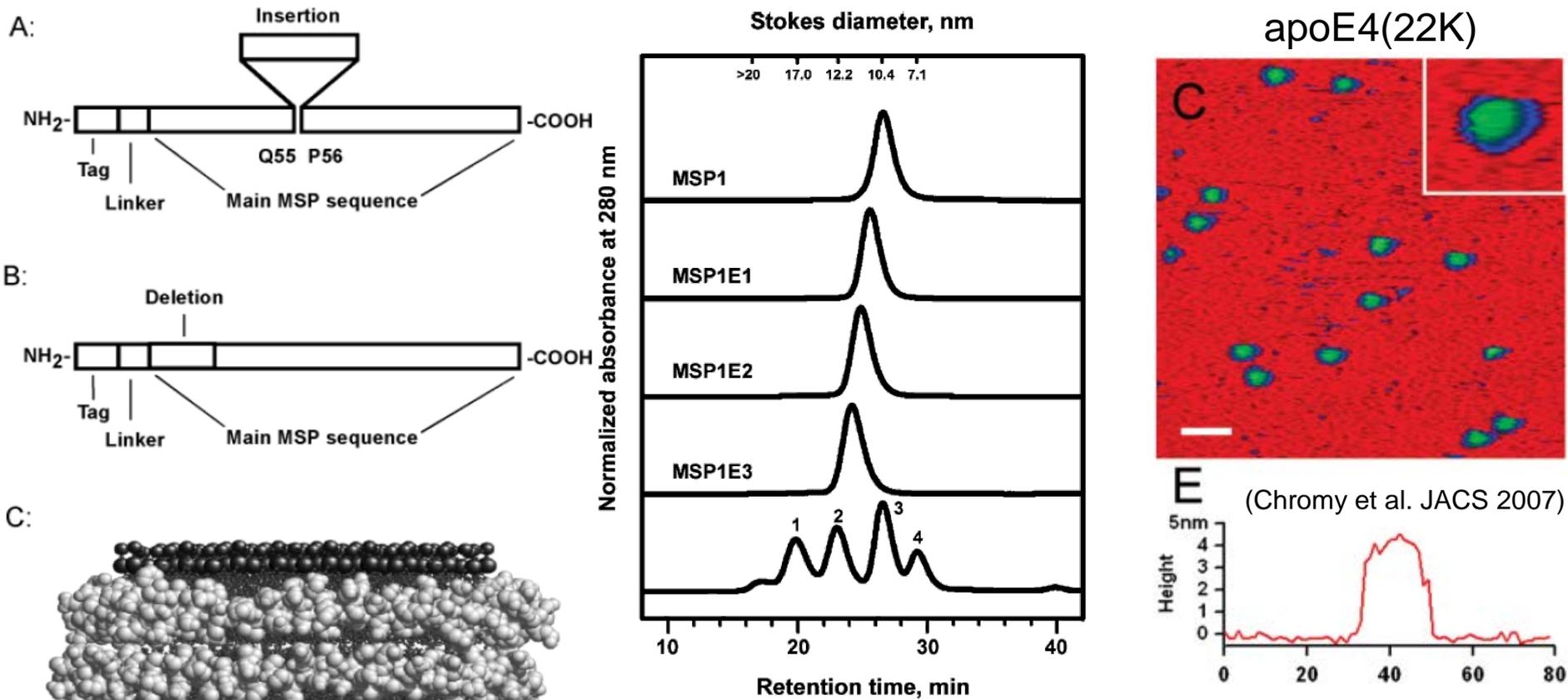
# Реконструкция дискоидных HDL *in vitro*. rHDL, липид-белковые нанодиски или нанOLIпопротеиновые частицы.

- Впервые реконструкция **rHDL** *in vitro* была описана в 1982 году (C.E. Matz & A. Jonas, "Micellar Complexes of Human Apolipoprotein A-I with Phosphatidylcholines and Cholesterol Prepared from Cholate-Lipid Dispersions" *J. Biol. Chem.*)
- В 2002 году S. Sligar предложил использовать фрагмент **44-243 ApoA-I (MSP1)** и появился термин нанодиски (Т.Н. Bayburt, Y.V. Grinkova, S.G. Sligar "Self-Assembly of Discoidal Phospholipid Bilayer Nanoparticles with Membrane Scaffold Proteins" *Nano Lett.*)

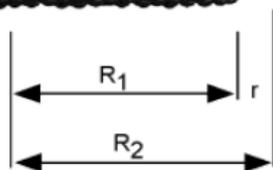


- Экспрессионные системы позволяют получать до 450 mg MSP1 с литра бактериальной культуры (ферментер).
- Выход реакции сборки «пустых» дисков 80 - 95%.
- Формирование нанодисков можно наблюдать методами гель-фильтрации (SEC), гель-электрофореза (Native PAGE), электронной микроскопии, AFM, SAXS.

# Использование различных аполипопротеинов или MSP позволяет формировать нанодиски различного диаметра



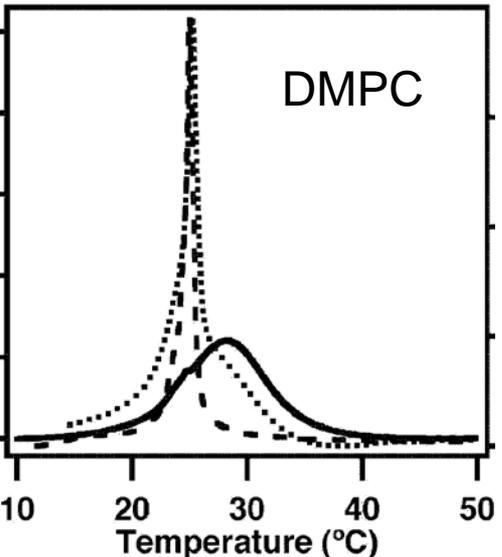
(Denisov et al. JACS 2004)



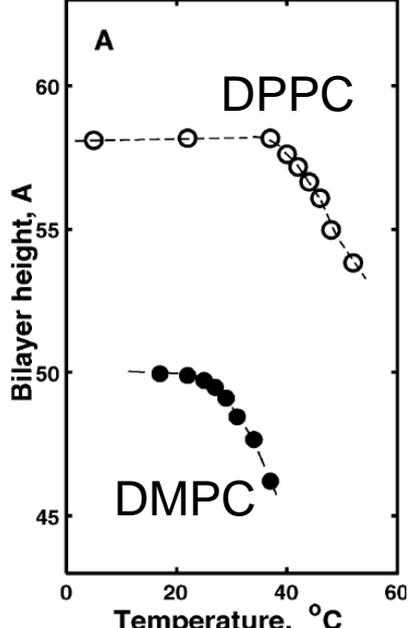
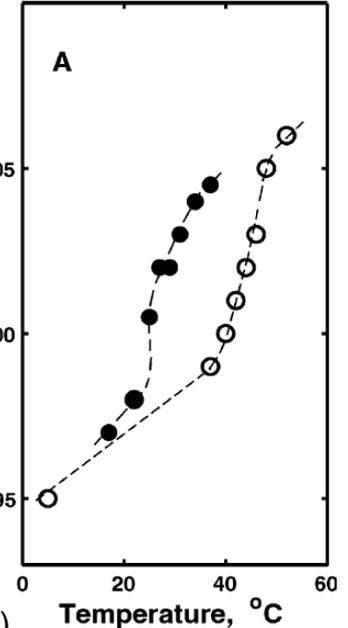
- MSP различной длины позволяют получать нанодиски диаметром от **6** до **17** nm.
- Фрагмент apoE4 человека и аполипофорин III (*B. mori.*) позволяют формировать ЛБН диаметром до 20 nm.
- Спиральные пептиды моделирующие аполипопротеины позволяют формировать «макродиски» диаметром 30 nm.

• Размер, **гомогенность** и **стабильность** комплексов зависит от MSP, липидов, отношения липид:MSP, метода сборки. Толщина нанодиска ~4-5nm.

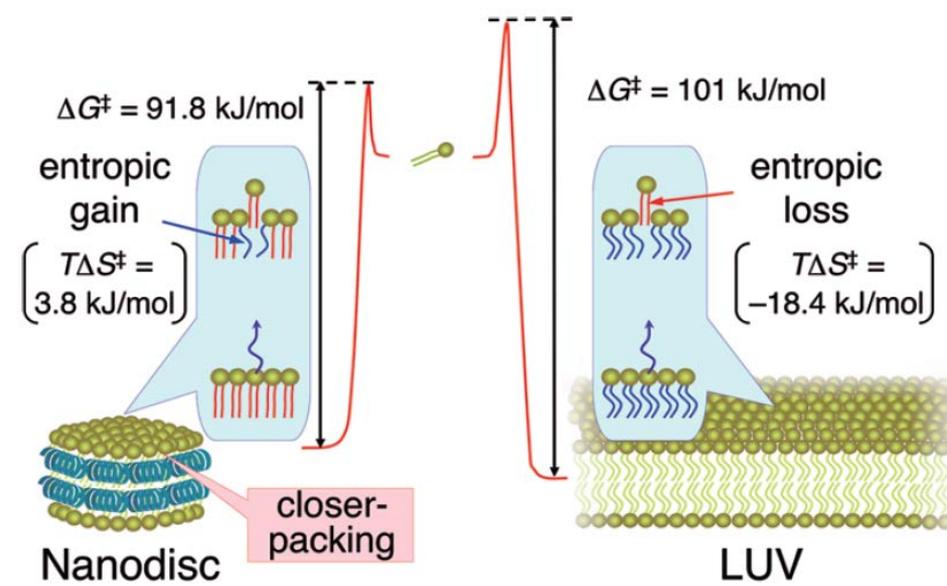
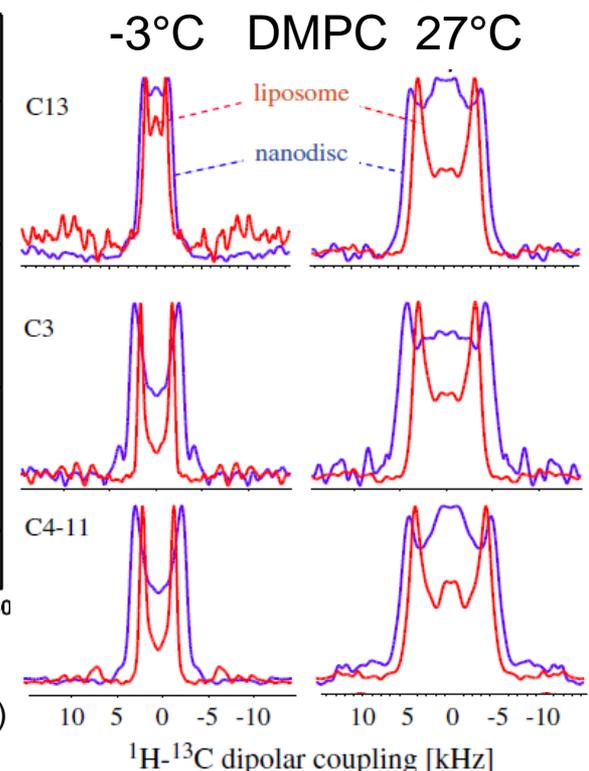
# Фрагмент липидного бислоя нанодиска сохраняет некоторые биофизические свойства липидной мембраны



(Denisov et al. J. Phys. Chem. B 2005)



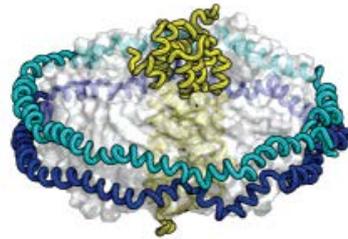
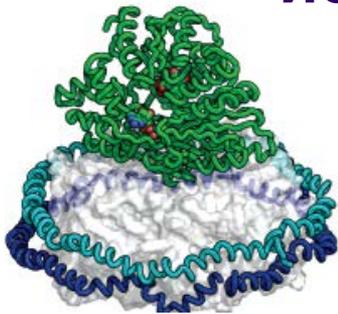
(Mörs et al. BBA 2013)



(Nakano et al. JACS 2009)

- Липиды в нанодисках демонстрируют выраженный фазовый переход (не наблюдается в бицеллах с  $q < 3.5$ !)
- Фазовый переход уширен и сдвинут в большие температуры
- Жирнокислотные цепи в нанодисках более упорядочены ( $S_{C_{2H}} 0.2 \rightarrow 0.3$ ; **DMPC 27°C**). Из-за разницы в упаковке скорость обмена липидов (DMPC) между нанодисками и раствором в 20 раз больше чем в везикулах.

# Липид-белковые нанодиски (ЛБН) как среда для стабилизации и структурно-функциональных исследований мембранных белков



## Поверхностно-связанные МБ:

- Цитохромы P450, NADPH-цитохром P450 редуктаза и их комплексы
- Факторы свертывания крови TF, FVIIa
- Комплекс ZipA-FtsZ отвечающий за деление клеток *E.coli*

## Каналы/Транспортеры:

- Комплекс - транслокон SecYEG
- ABC транспортеры
- Никотиновый ацетилхолиновый рецептор (nAChR)
- K<sup>+</sup> канал KcSA
- Пора токсина сибирской язвы
- $\beta$ -Бочонки: митохондриальный канал VDAC, OmpX

## 7ТМ белки/рецепторы:

- Бактериородопсин
- «зеленый» протеородопсин
- GPCRs ( $\beta$ 2AR, родопсин, CCR5, NTS1, mGluR)

## Рецепторы:

- Бактериальный хеморецептор Tar
- Рецепторные тирозин киназы EGFR

## Мембранные ферменты:

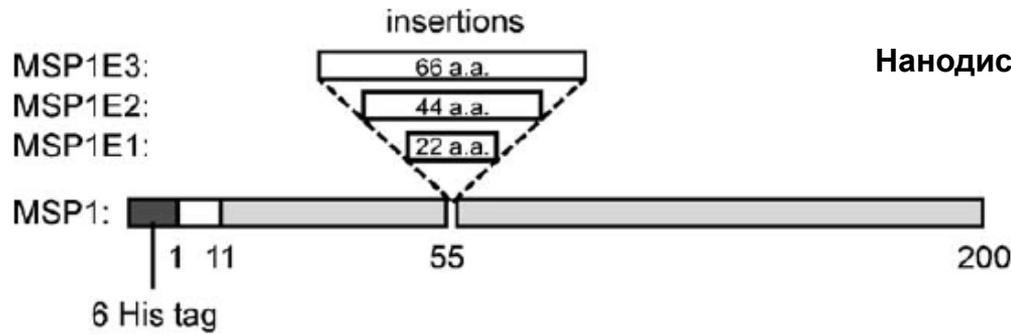
- Моноамин оксидаза А (MAO-A)
- Мембраносвязанная гидрогеназа (MBH)

## Другие МБ:

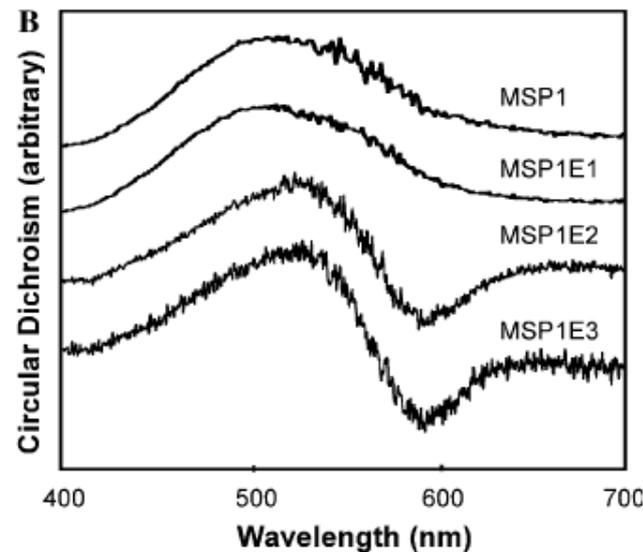
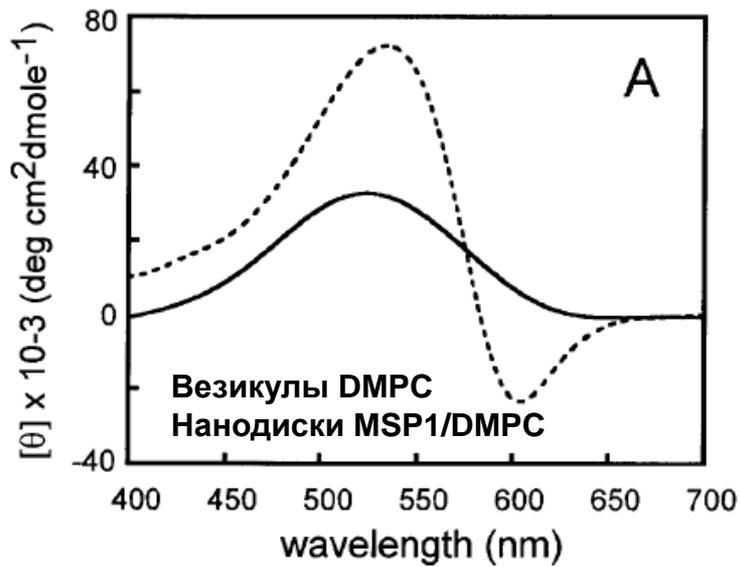
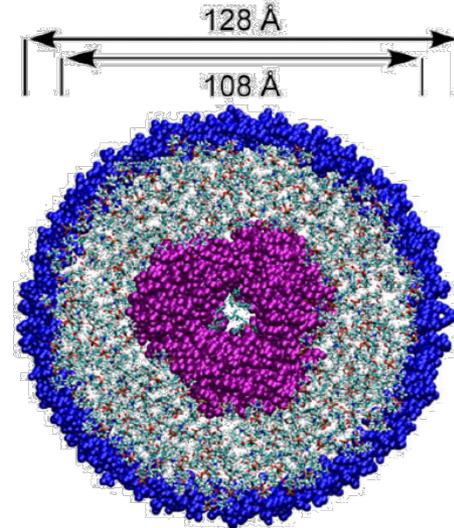
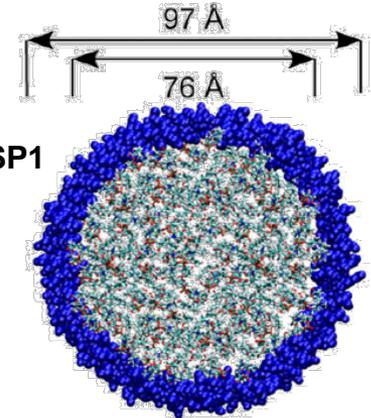
- Тример свето-собирающего комплекса LHCII
- Цитохром с оксидаза Cyt cO
- Гликопротеиновый комплекс тромбоцитов Ib-IX
- Интегрин  $\alpha$ IIb $\beta$ 3
- *E. coli* FoF1-ATP синтетаза
- Респираторный Комплекс II митохондрий

# Бактериородопсин, фото-активируемый протонный насос галобактерий

- bR встраивается в нанодиски MSP1/DMPC в виде мономера с эффективностью 70-90%
- bR сохраняет способность связывать ко-фактор (*all-trans*-retinal) и близкую к нативной оптическую активность
- Для стабилизации тримеров bR необходимо применение более «длинных» молекул MSP

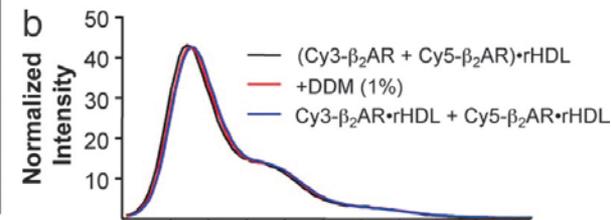
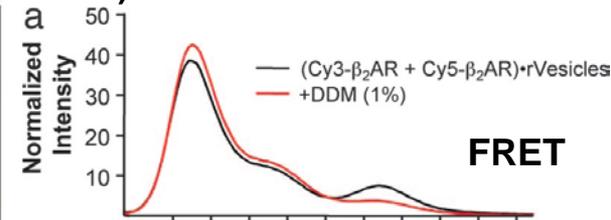
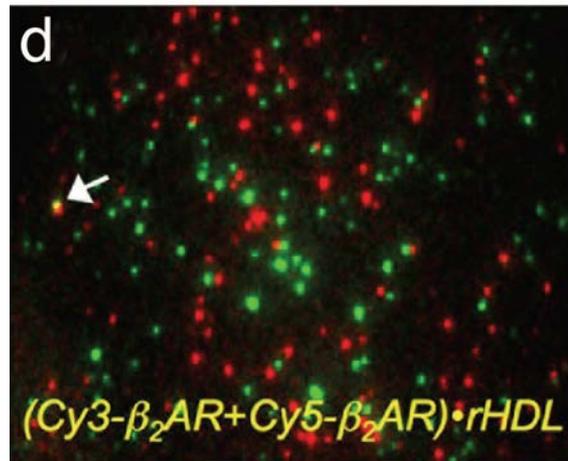
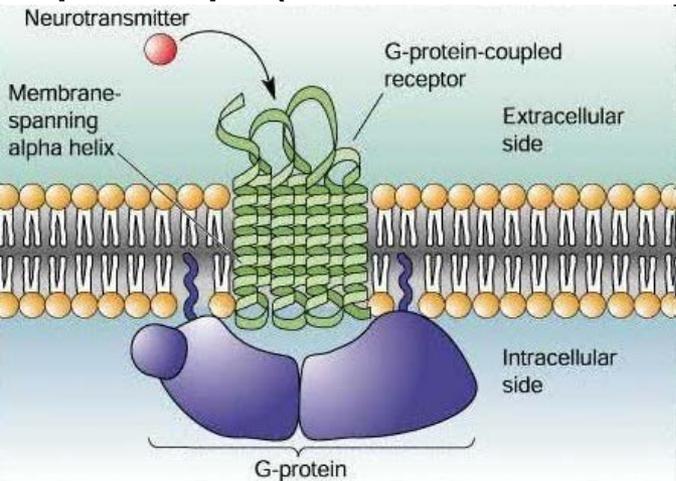


(Bayburt et al. Protein Sci. 2003, ABB 2006)

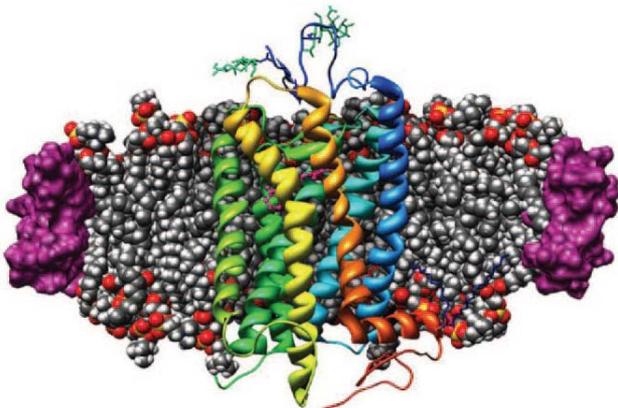
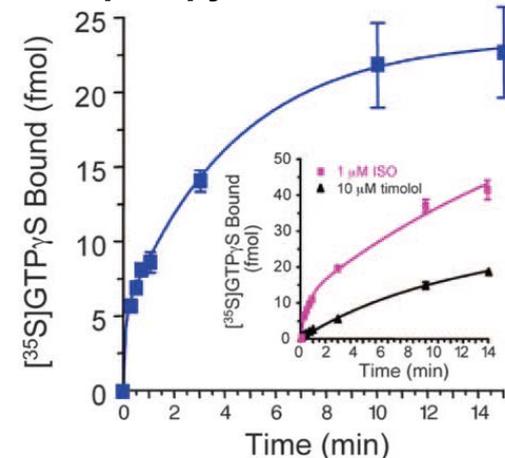
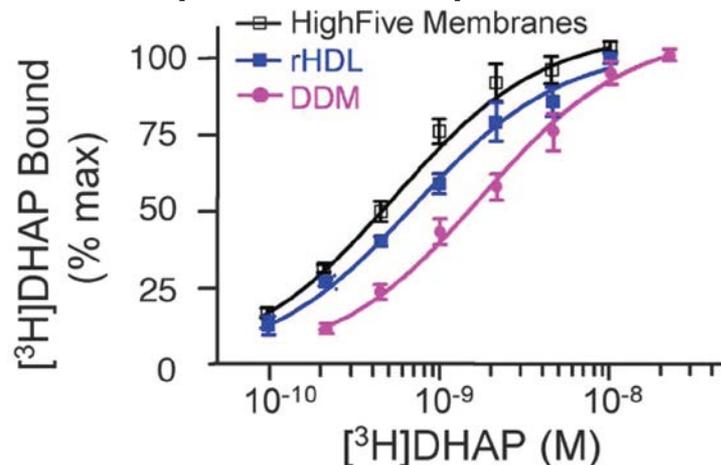


# G-белок связанные рецепторы (GPCR)

- Рецепторы GPCR – самое большое семейство белков в геноме человека (~800 представителей)
- GPCR – мишени для ~50% современных лекарственных препаратов
- В мембранах клеток и липидных везикулах GPCR образуют димеры и олигомеры более высокого порядка, функциональная роль олигомеризации не установлена
- Нанодиски позволили стабилизировать отдельные мономеры  $\beta_2$ -адренорецептора ( $\beta_2AR$ )
- Мономер GPCR эффективно активирует G-белок и является активной функциональной единицей рецептора. (Аналогичные данные получены для зрительного родопсина)



$\beta_2AR$  - мономер в ЛБН и DDM, но агрегирует в липосомах

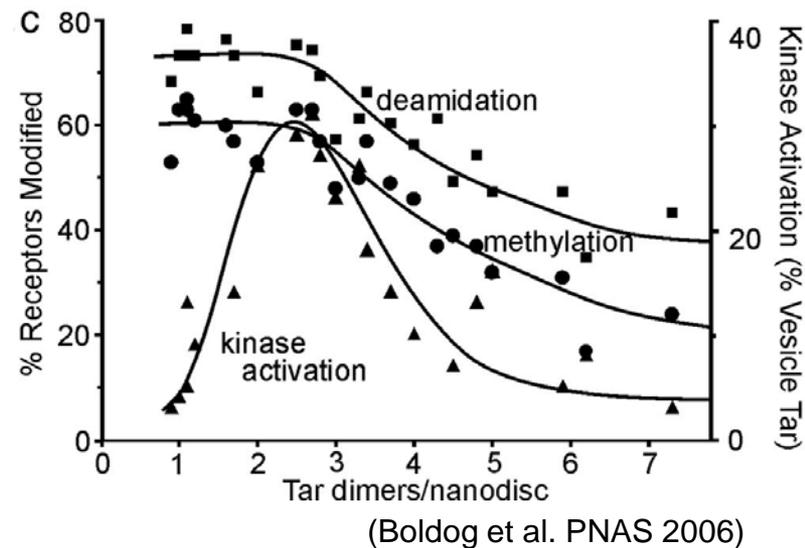
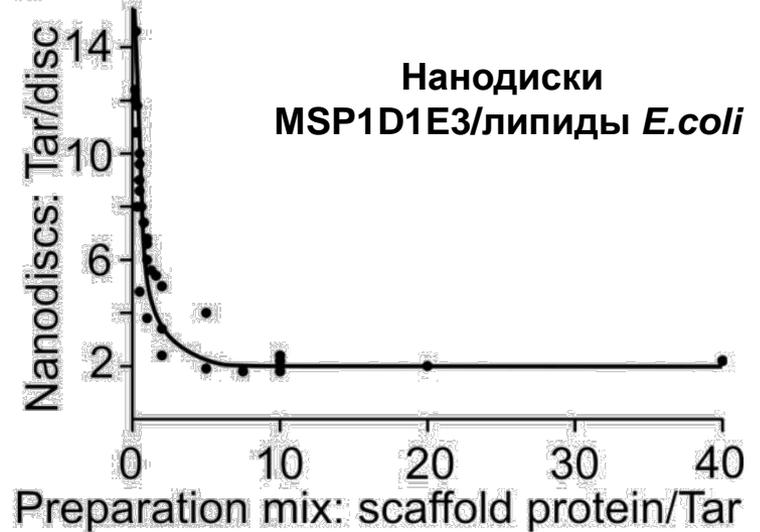
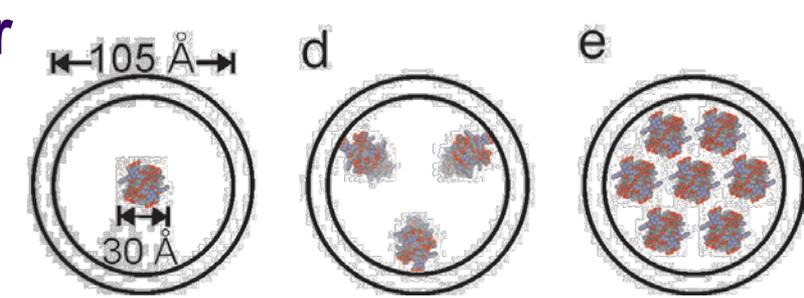
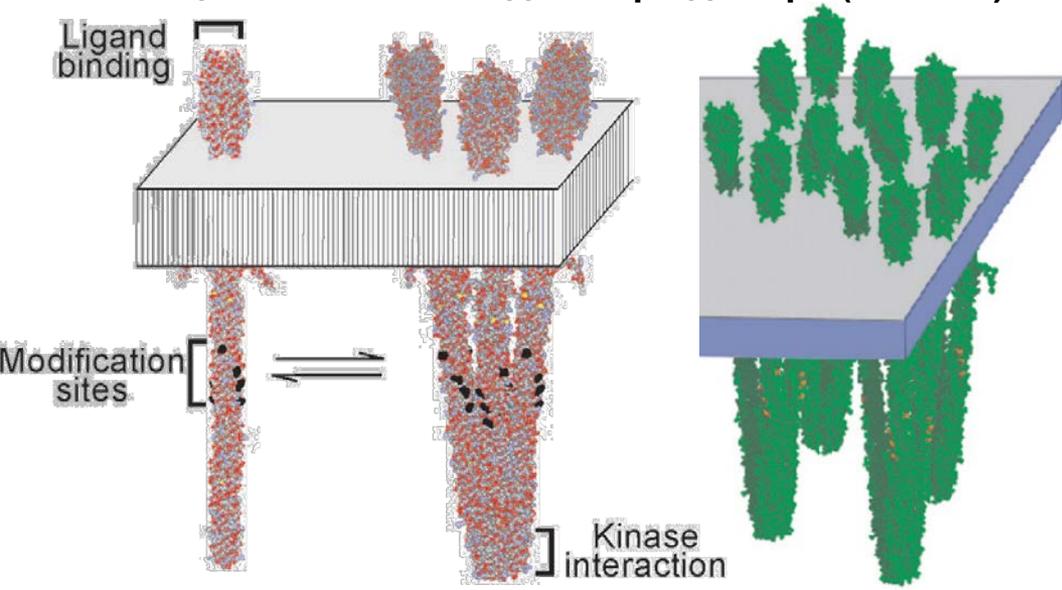


Нанодиск apoA-I/POPC/POPG

Активность  $\beta_2AR$  в ЛБН значительно выше чем в DDM

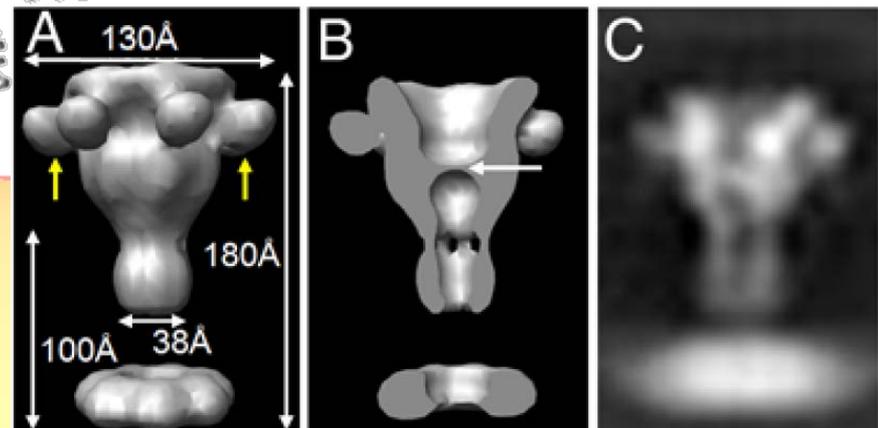
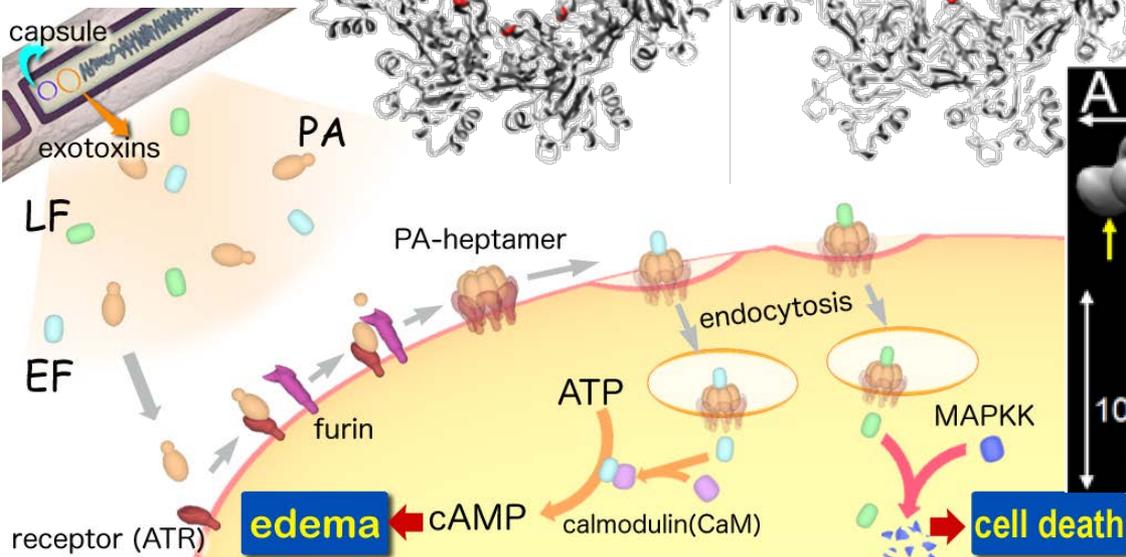
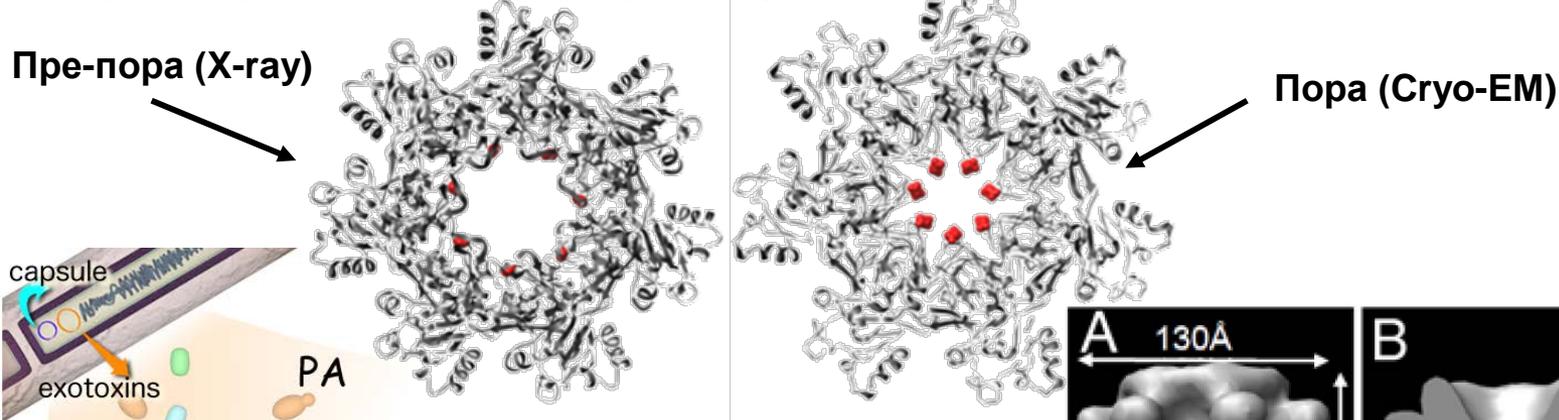
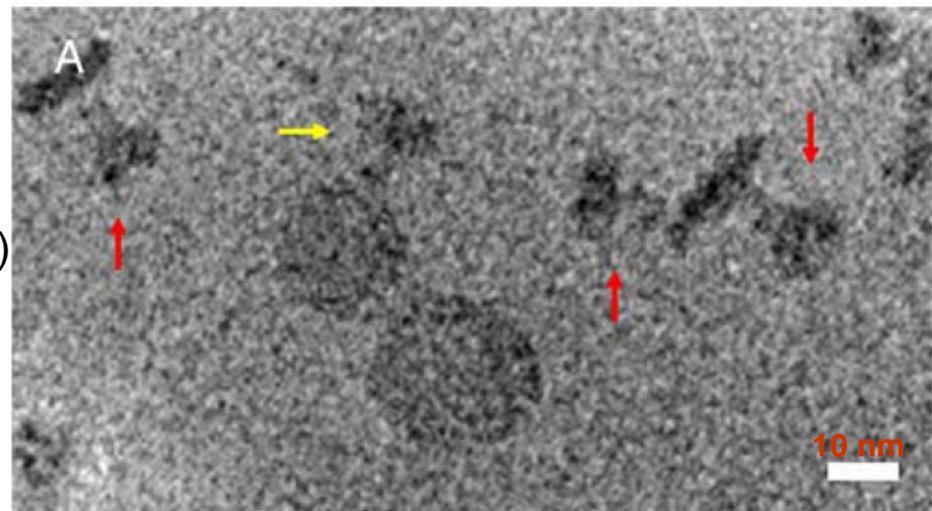
# Бактериальный хеморецептор Tar

- Бактериальные хеморецепторы при связывании аттрактанта внеклеточным доменом активируют/инактивируют внутриклеточные киназы и через каскад реакций регулируют направление вращения мотора жгутика
- Регуляция этого процесса осуществляется посредством модификаций (деамидирование, метилирование) цитоплазматического домена
- В мембранах клеток рецепторы образуют димеры и олигомеры более высокого порядка, что позволяет значительно усиливать входящий сигнал
- Изменение молярного отношения рецептор/MSP в процессе сборки ЛБН позволило получить нанодиски содержащие от 2-х до 14-и копий рецептора Tar (*E.coli*)
- Димер Tar проводит сигналы через мембрану (модификации при связывании аттрактанта (Asp)). Для активации киназ необходимо три димера (3×2×Tar).



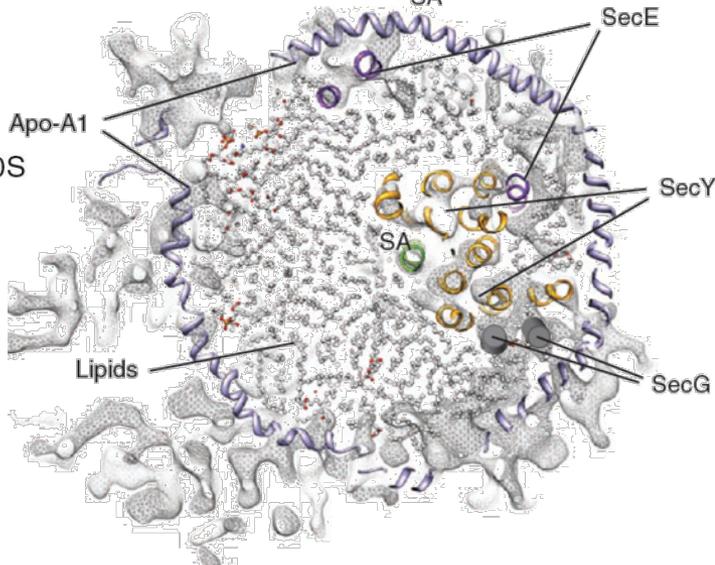
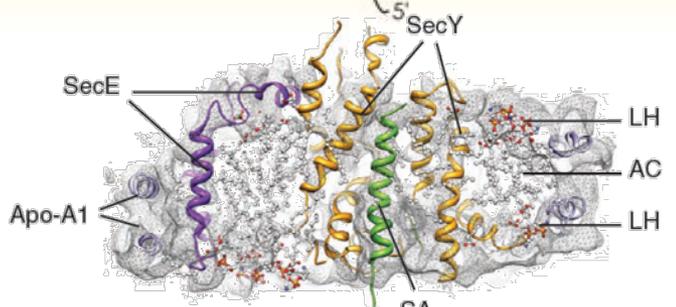
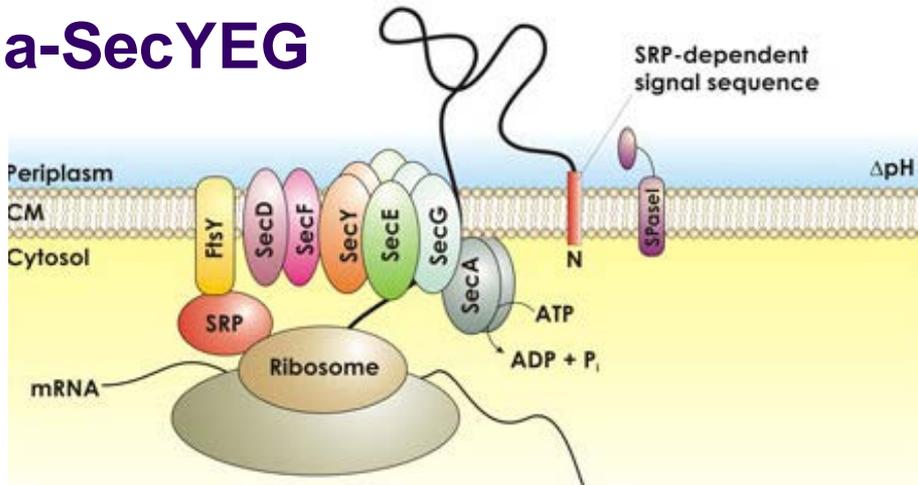
# Структура поры токсина сибирской язвы

- Токсин сибирской язвы состоит из 3х компонентов: порообразующего (protective antigen, PA), вызывающего отёки (edema factor, EF), и цитотоксического (lethal factor, LF).
- Пора (PA×7) формируется из «препоры» (PA×7) в кислой среде эндосом
- Исследование поры – затруднено из-за агрегации. Использование нанодисков (MSP1D1/POPC) позволило стабилизировать пору и определить ее структуру (Cryo-EM, 22Å)

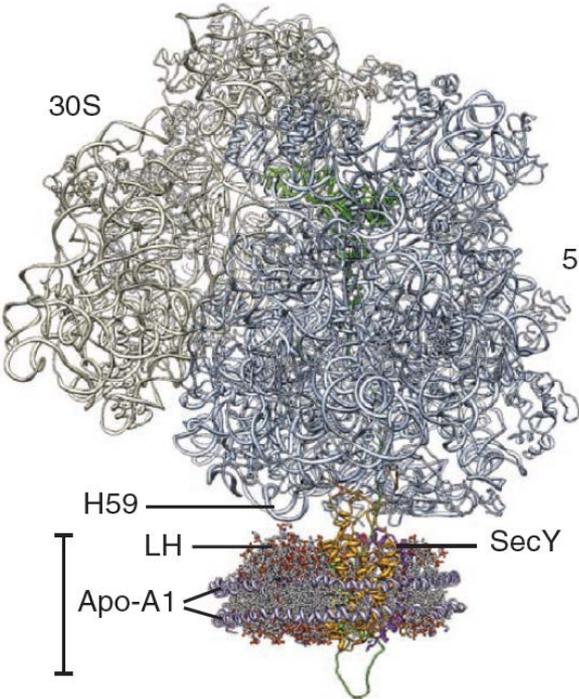
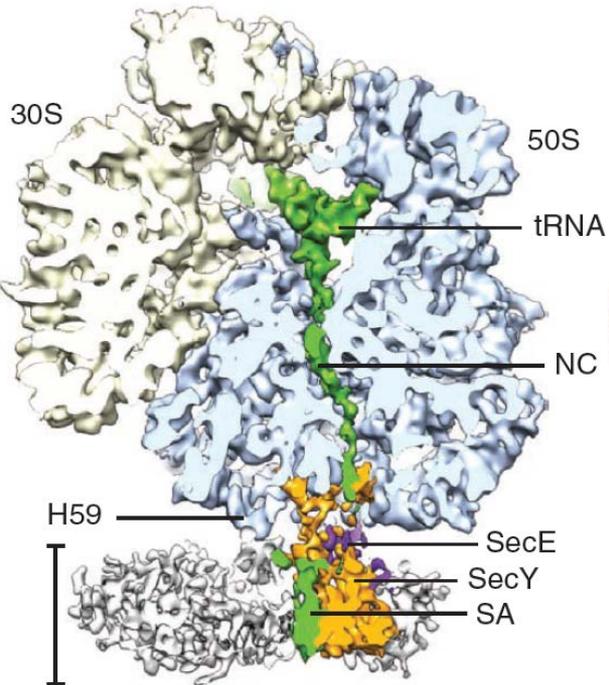


# Структура комплекса рибосома-SecYEG

- Для продукции секретируемых и мембранных белков в клетках прокариот и эукариот используется транслокон (мембранный комплекс SecYEG/Sec61)
- Рибосома синтезирующая полипептидную цепь транспортируется к SecYEG и формируется комплекс рибосома-SecYEG
- Использование нанодисков позволило методом Cryo-EM определить структуру комплекса рибосома-SecYEG (*E.coli*) с разрешением 7 Å



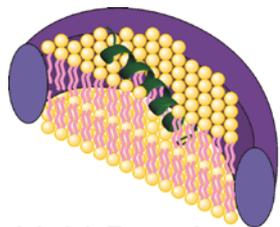
(Frauenfeld et al. Nat Str&Mol Biol 2010)



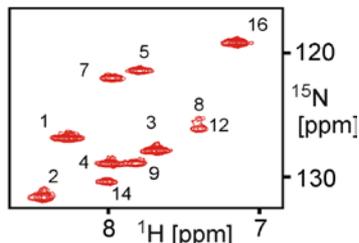
# Нанодиски как среда для ЯМР исследований МБ

- Мембранные белки, реконструированные в нанодиски, доступны для исследований методами ЯМР высокого разрешения (реориентация нанодиска (10×4 нм) в растворе соответствует глобулярному белку ~ 150-200 кДа)

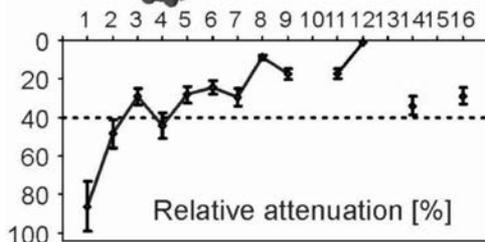
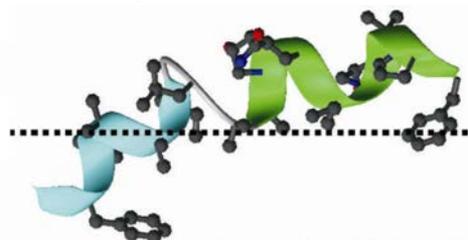
## Каналообразующий антибиотик Aam-I (*Emericellopsis minima*)



Lipid-Protein  
Nanoscale Bilayer

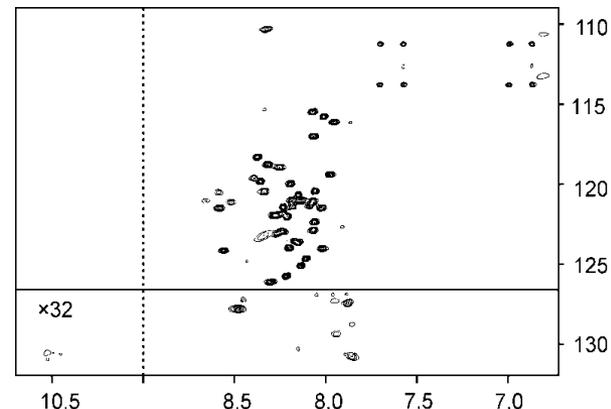
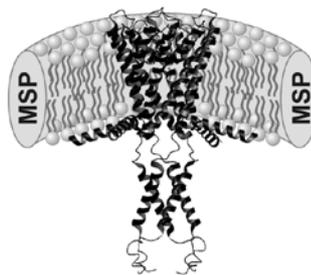


TROSY NMR



Lyukmanova et al JACS (2008)

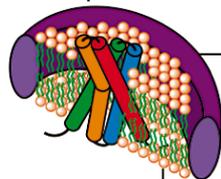
## K<sup>+</sup> канал KcsA (*Streptomyces lividans*)



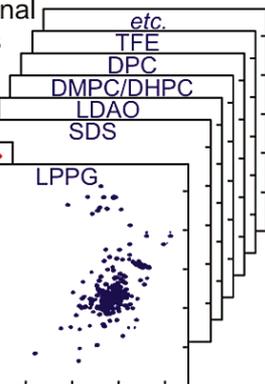
Шенкарев, и др. Биохимия (2009)

## Вольт-сенсорный домен K<sup>+</sup> канала KvAP (*Aeropyrum pernix*)

Reference <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-TROSY  
“fingerprint” of IMP  
in Lipid-Protein Nanodiscs



Screening of conventional  
membrane mimetics  
for NMR study

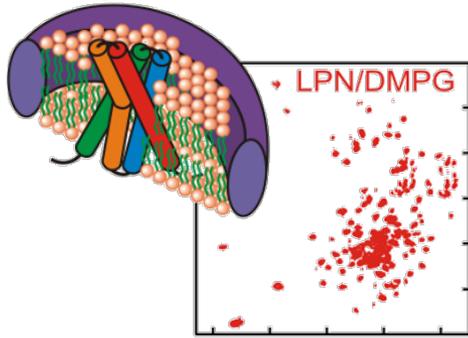


Shenkarev et al JACS (2010)

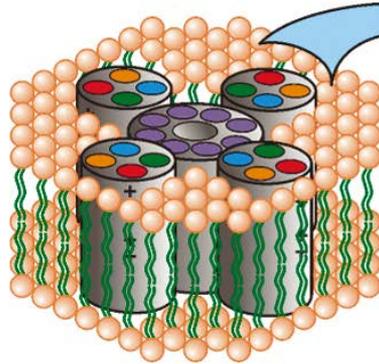


# Применение ЛБН для исследования VSD K<sup>+</sup> канала KvAP

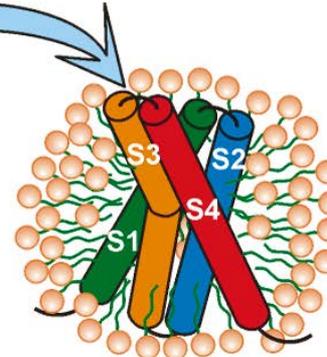
Reference <sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N-TROSY  
"fingerprint" of IMP  
in Lipid-Protein Nanodiscs



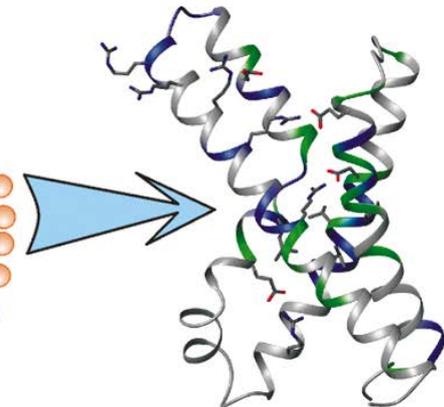
Voltage-Gated  
K<sup>+</sup> Channel KvAP



Voltage-Sensing  
Domain (VSD)

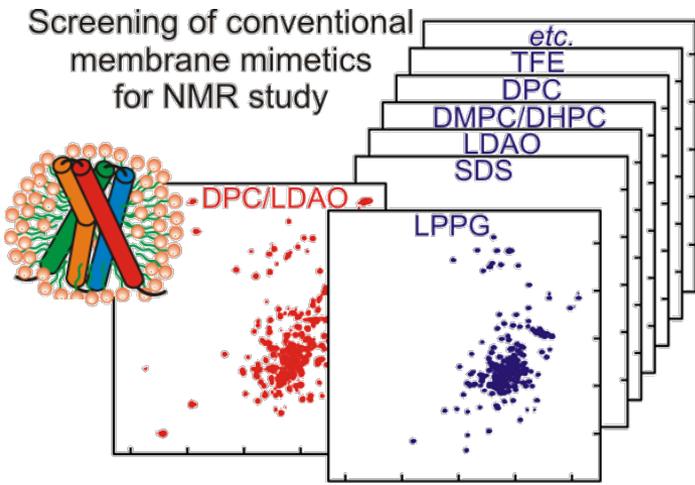


μs-ms Motions in  
Four-Helical Bundle of VSD

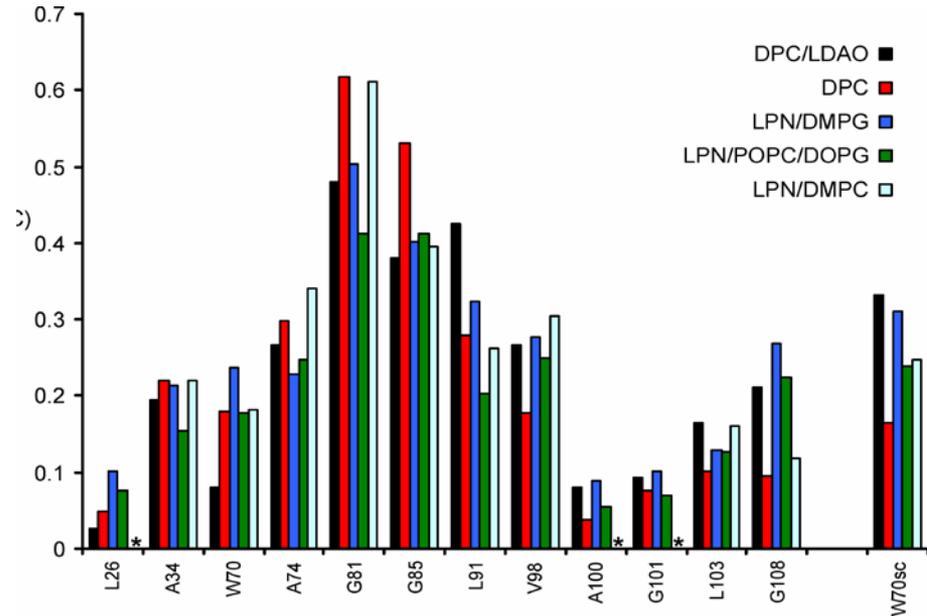


- Структура VSD в мицеллах DPC/LDAO и ЛБН различного липидного состава соответствует структуре домена в открытом состоянии канала

Screening of conventional  
membrane mimetics  
for NMR study

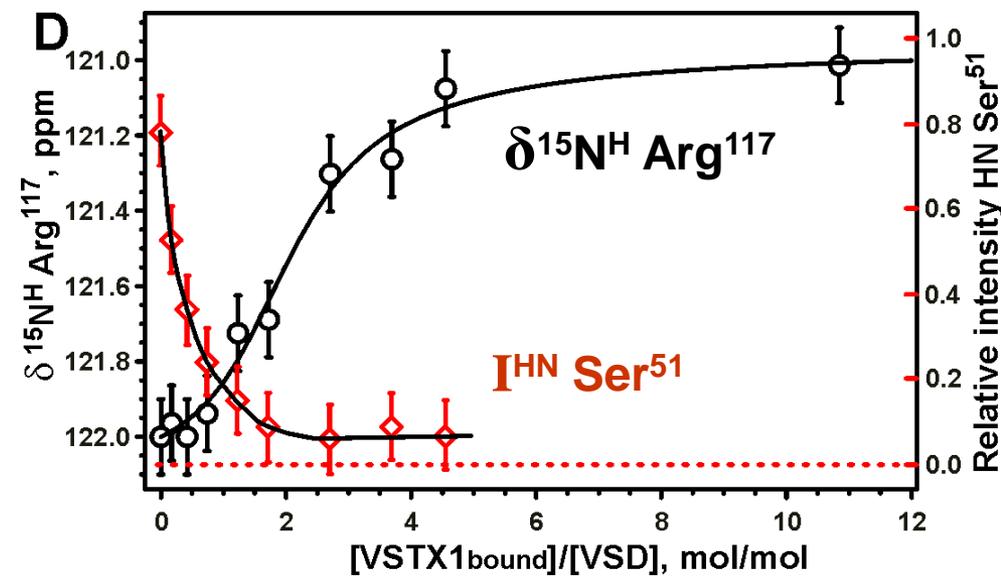
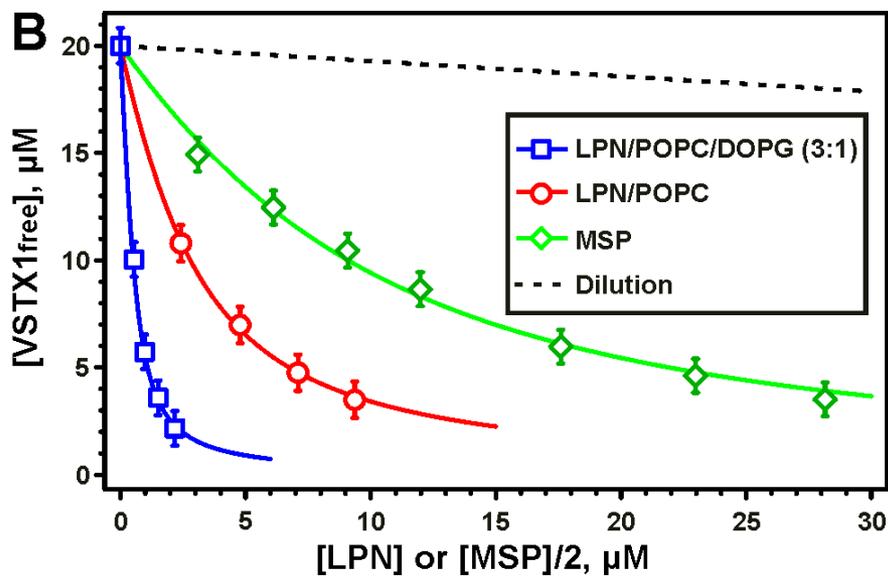
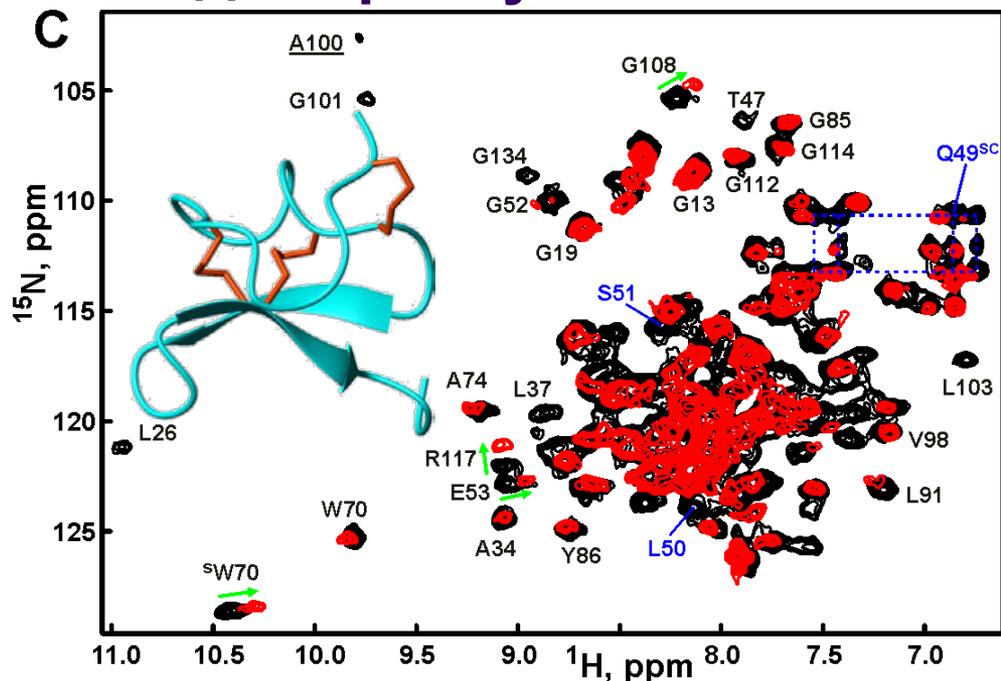
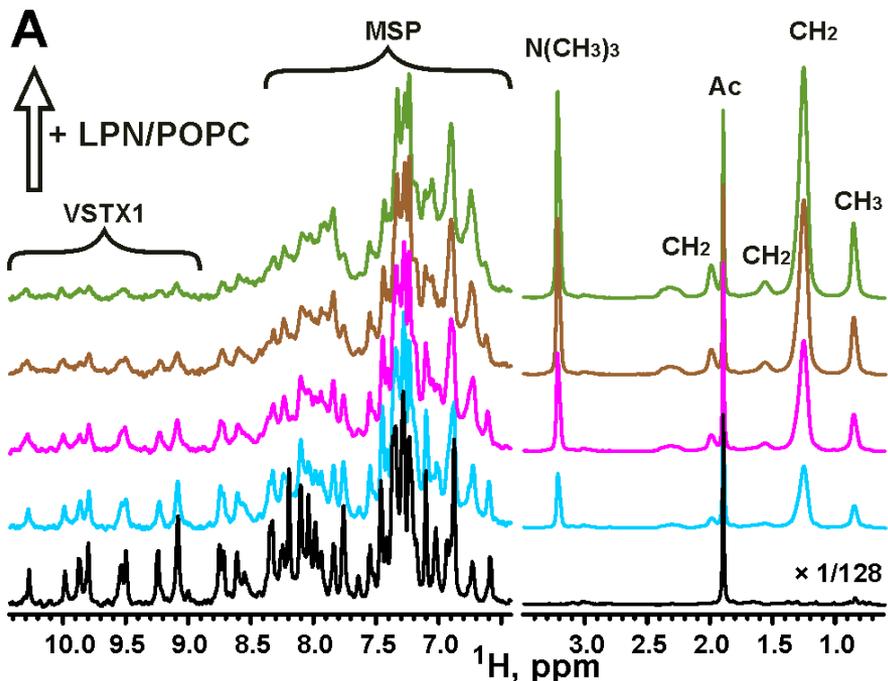


Shenkarev et al, JACS (2010a), JACS (2010b)



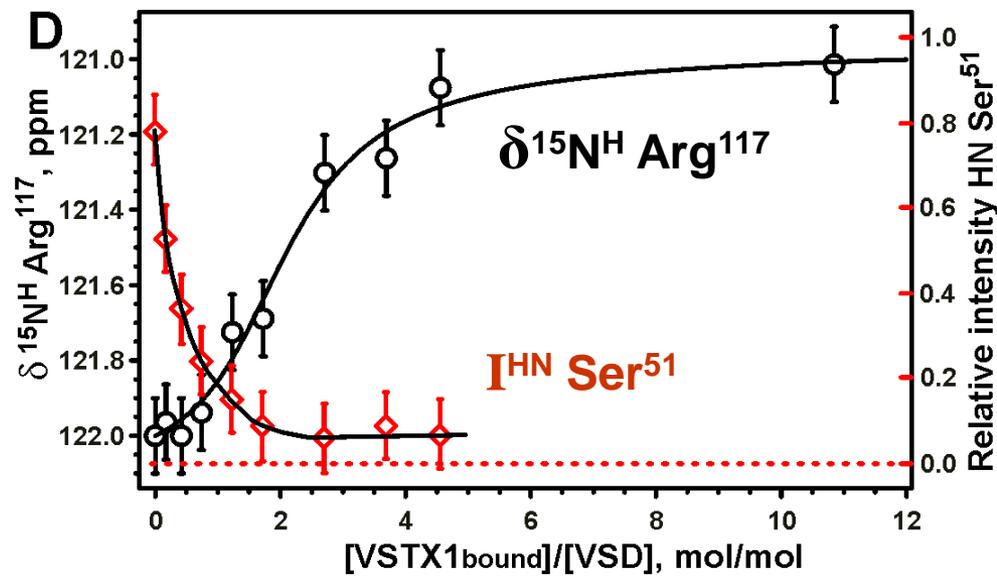
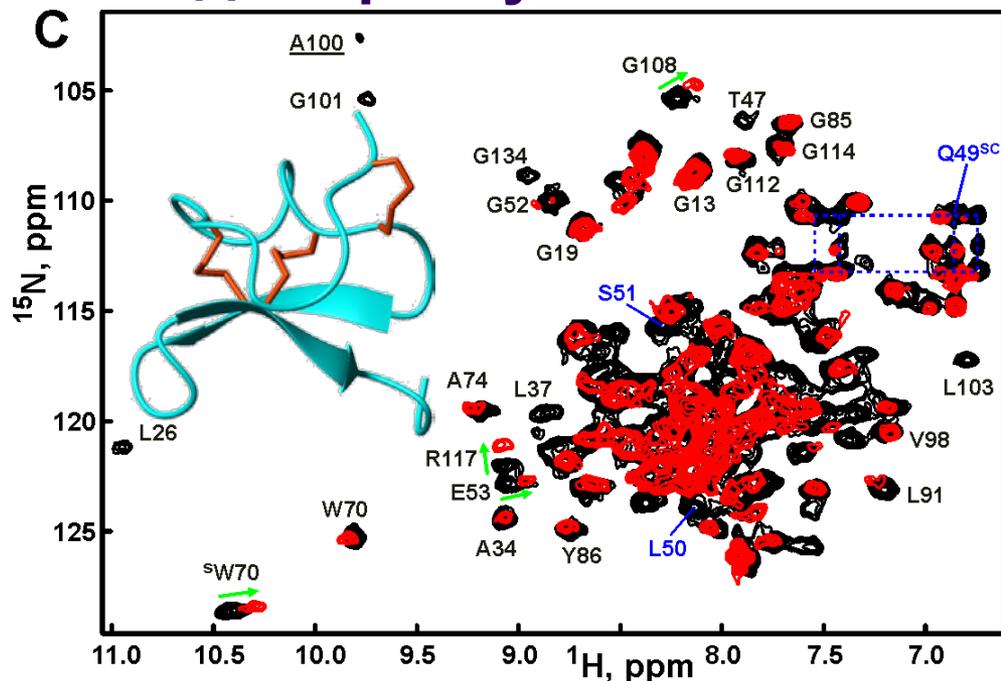
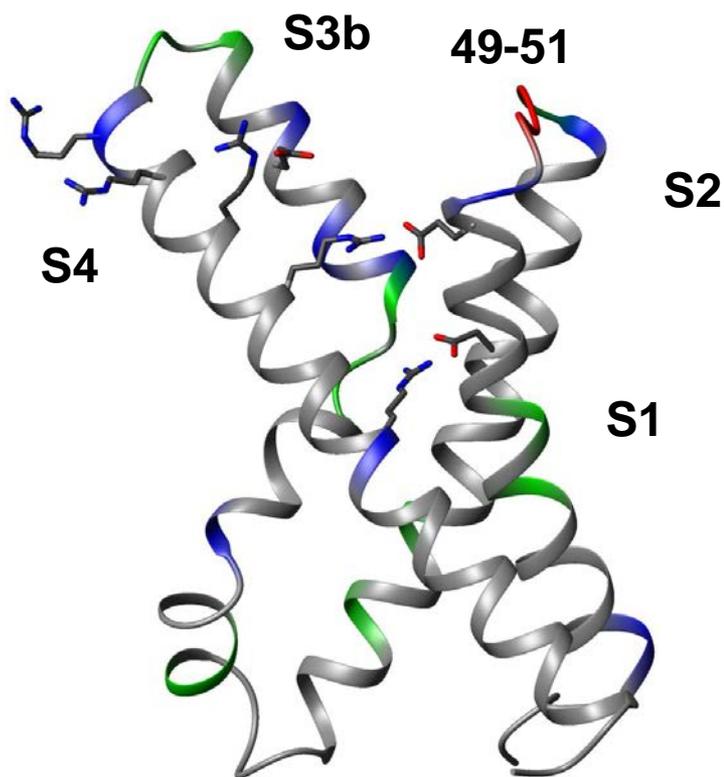
- В ЛБН и мицеллах фрагменты спиралей S1, S2, S3 and S4, находящиеся в регионе межспиральных контактов, совершают движения в μs-ms диапазоне времен, которые, возможно, являются прообразом конформационных перестроек, при потенциалозависимой активации

# VSD-KvAP в мембране ЛБН способен взаимодействовать с токсином VSTX1 из яда тарантула



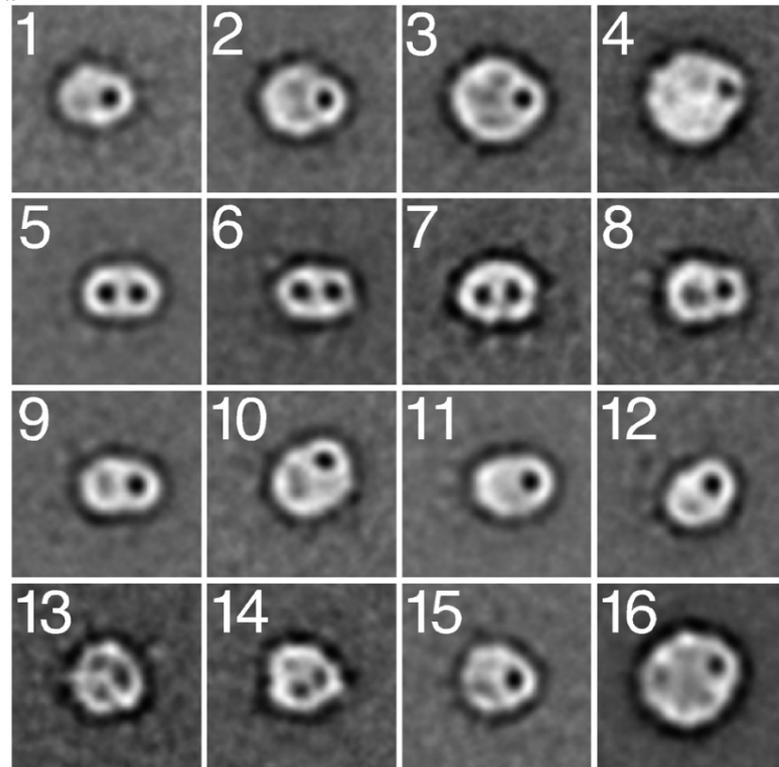
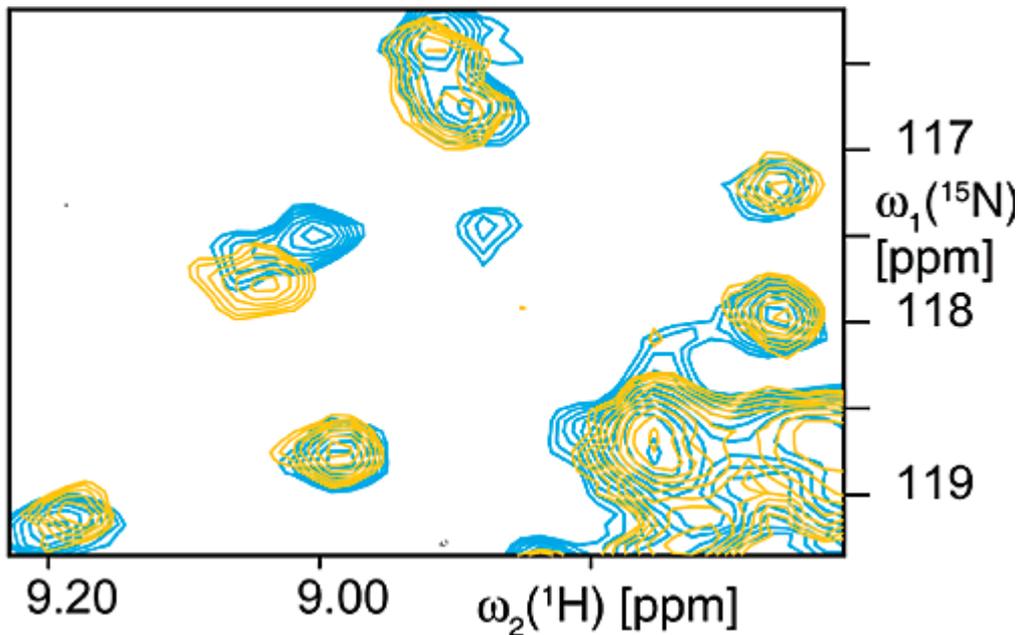
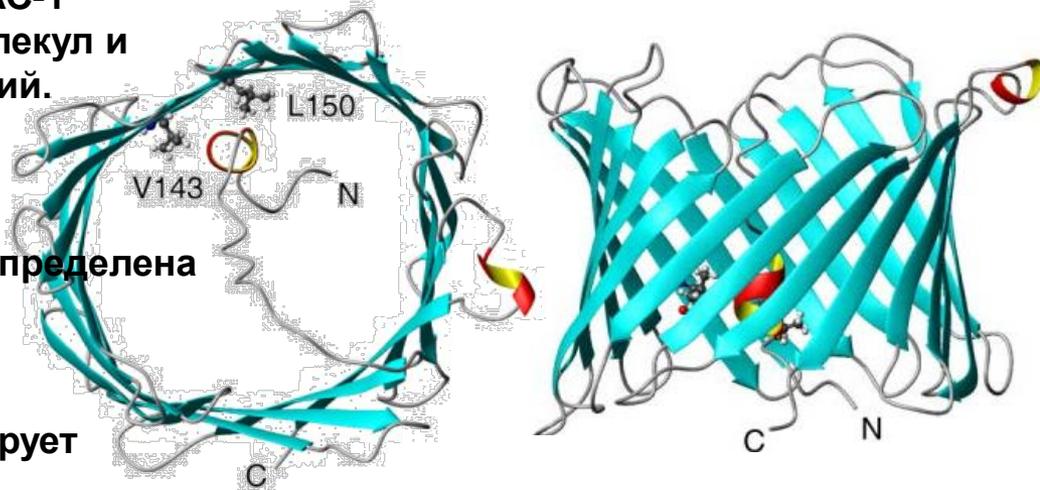
# VSD-KvAP в мембране ЛБН способен взаимодействовать с токсином VSTX1 из яда тарантула

- Уширение сигналов
- Изменение химсдвига
- Не меняется при добавлении VSTX1
- Нет данных



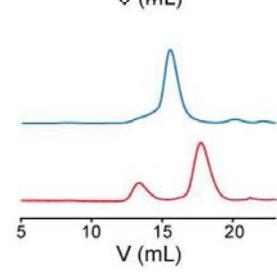
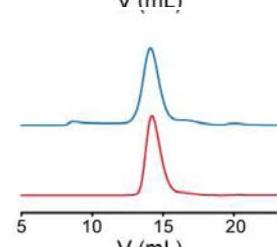
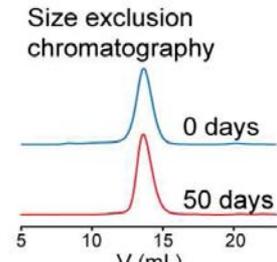
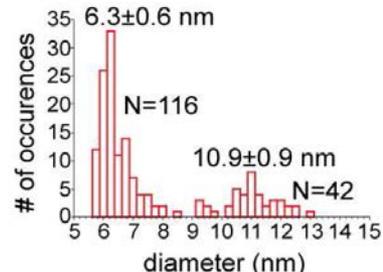
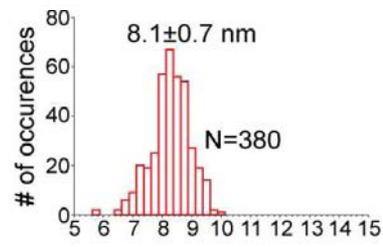
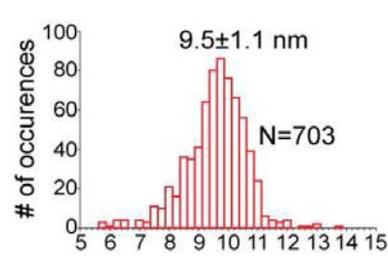
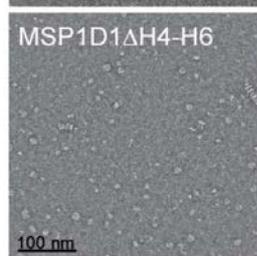
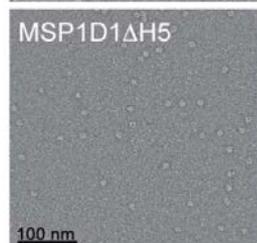
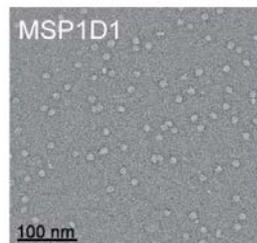
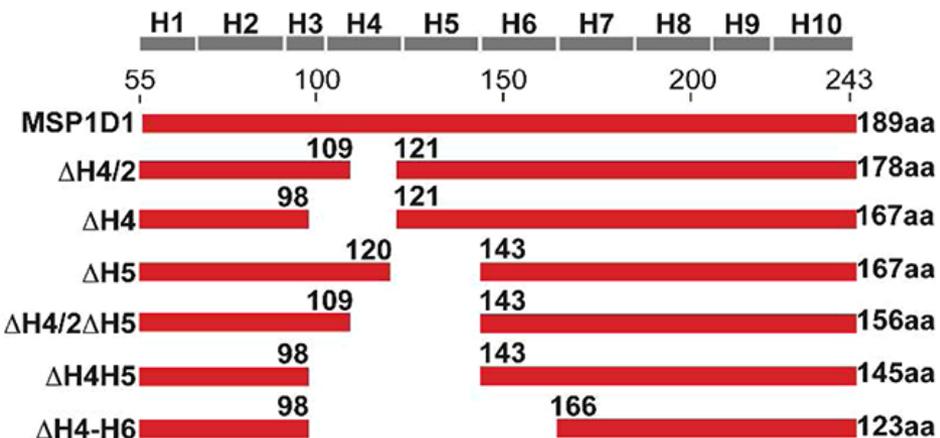
# ЯМР исследование канала митохондрий человека VDAC

- Анионный потенциалозависимый канал VDAC-1 отвечает за транспортировку небольших молекул и ионов через внешнюю мембрану митохондрий.
- VDAC взаимодействует с анти-апоптозными белками семейства Bcl-2 ингибируя высвобождение апоптозных факторов.
- Пространственная структура VDAC-1 была определена методом ЯМР в мицеллах LDAO
- По данным EM комплексы VDAC-1/ЛБН состоят из мультимеров канала (в нативных мембранах митохондрий VDAC также формирует мультимеры, 2x – 6x)
- Данные ЯМР показали, что VDAC-1 сохраняет нативную структуру и способность взаимодействовать с NADH

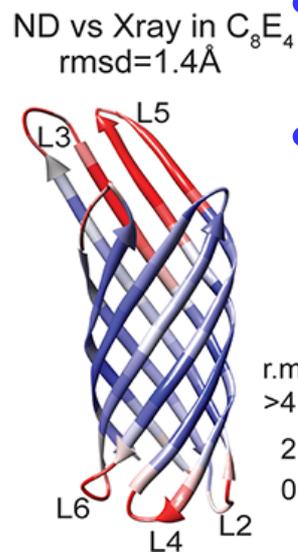
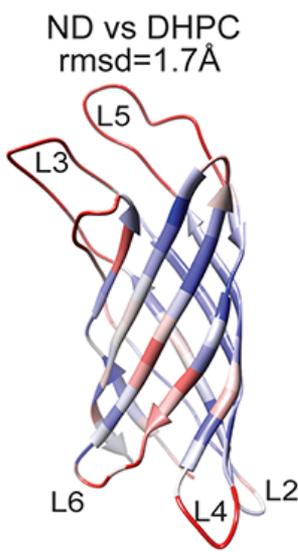
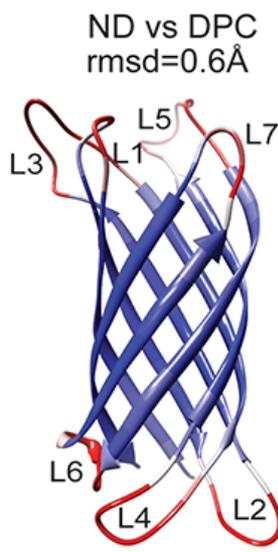
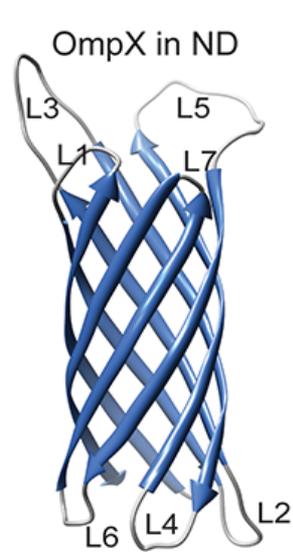


(Raschle et al. JACS 2009)

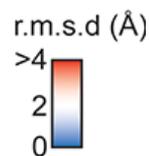
# Пространственная структура OmpX в «8 нм» нанодисках



- Делетированные варианты MSP позволяют формировать ЛБН диаметром 6-8 нм
- Некоторые «маленькие нанодиски» имеют низкую стабильность (MSP1D1ΔH4-H6)
- Диаметр ЛБН/MSP1D1ΔH5 ~ 8 нм;  
Масса ~ 100 кДА (ЛБН/MSP1 ~ 150 кДА)



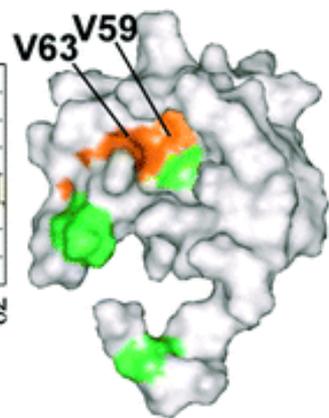
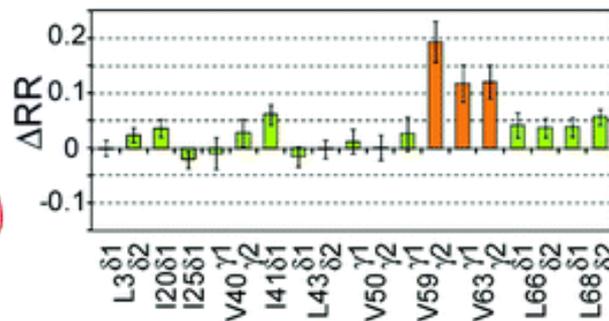
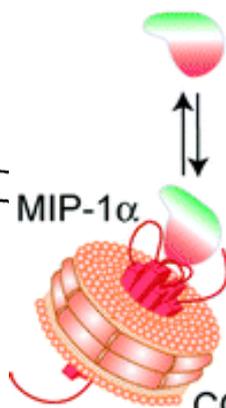
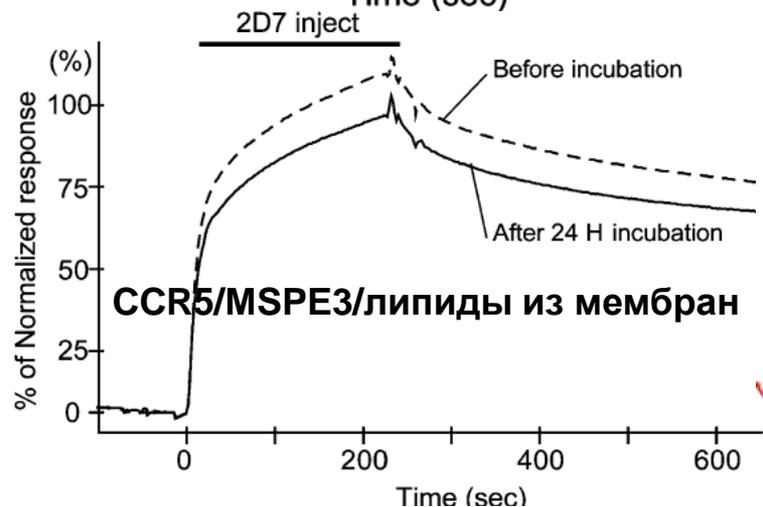
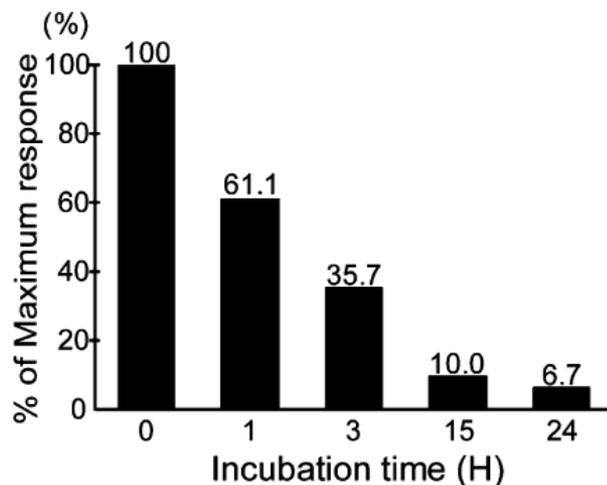
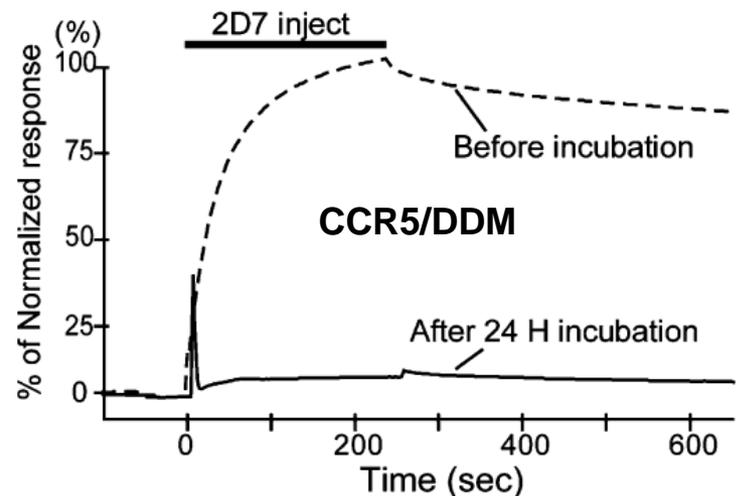
- Методом ЯМР определена структура OmpX (*E. coli*) в MSP1D1ΔH5/DMPC/DMPG (3:1)
- Структура петлевых участков в ЛБН значительно отличается от структуры в мицеллах детергентов (денатурация) и от структуры в кристалле (crystal packing forces)



(Hagn et al. JACS 2013)

# ЯМР исследование взаимодействия CCR5 с лигандами

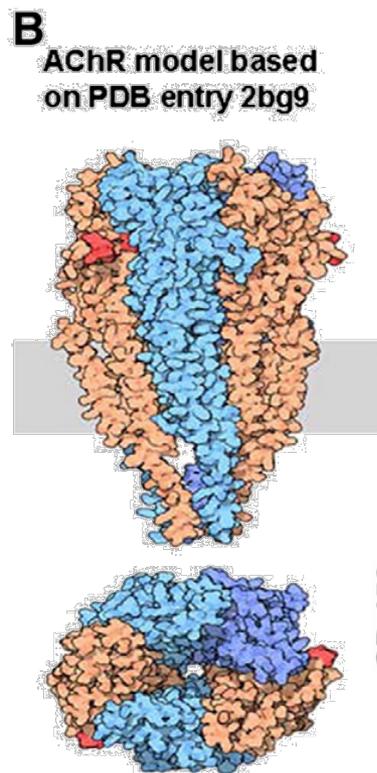
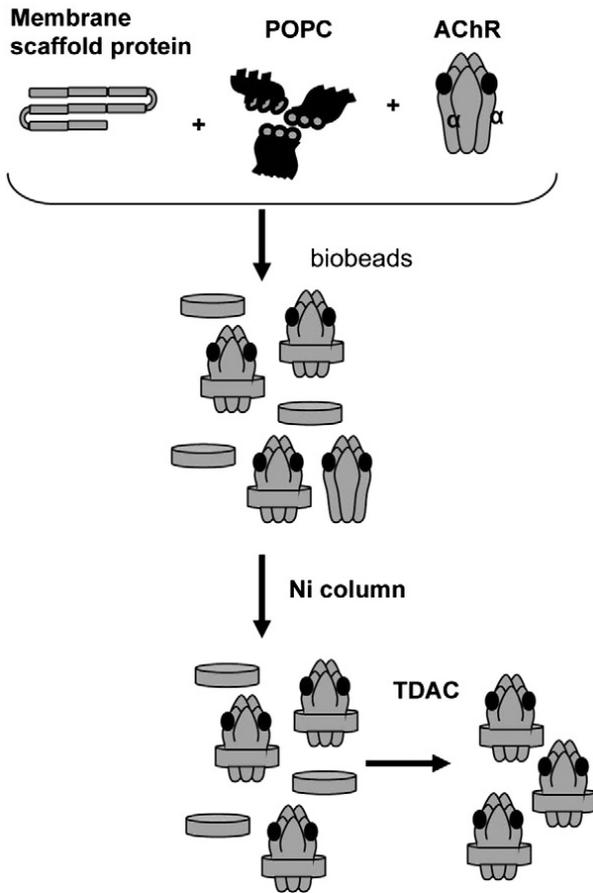
- СС-хемокиновый рецептор 5 (CCR5, GPCR) вовлечен в развитие воспалительных реакций, является ко-рецептором для вируса ВИЧ. Лиганды CCR5 (MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , и RANTES) ингибируют проникновение ВИЧ в лимфоциты.
- Структурные исследования CCR5 осложнены низкой стабильностью рецептора в мицелах (DDM)
- Инкапсуляция CCR5 в нанодиски позволила получить стабильные образцы рецептора (>24 ч)
- Методами ЯМР спектроскопии (перенос насыщения на метильные группы) был определен интерфейс взаимодействия MIP-1 $\alpha$  (Macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$ ) с рецептором.



# Комплексы ЛБН/nAChR и Миастения Гравис

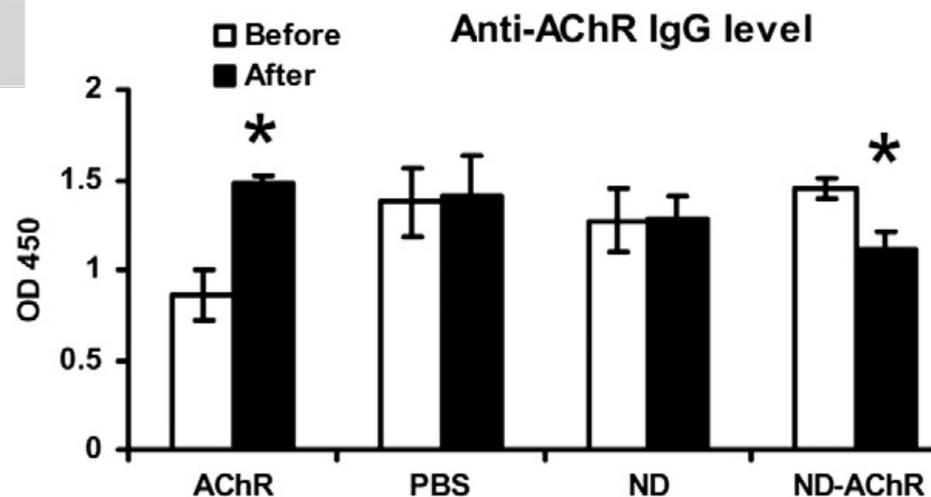
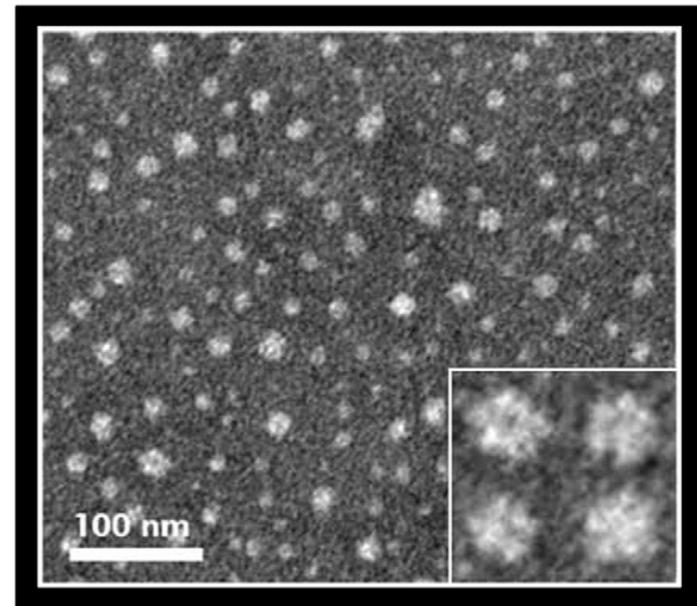
- Аутоиммунное заболевание Миастения Гравис (MG) обуславливается антителами против мышечного никотинового ацетилхолинового рецептора (nAChR)
- nAChR из электрического органа ската *Torpedo californica* был инкапсулирован в нанодиски MSP1E3D1/POPC.
- При интравенозном введении комплексов ЛБН/nAChR мышам с MG наблюдалось понижение титра анти-nAChR антител и улучшение клинической картины заболевания.

## Affinity Purification of AChR Nanodisc samples



**A**

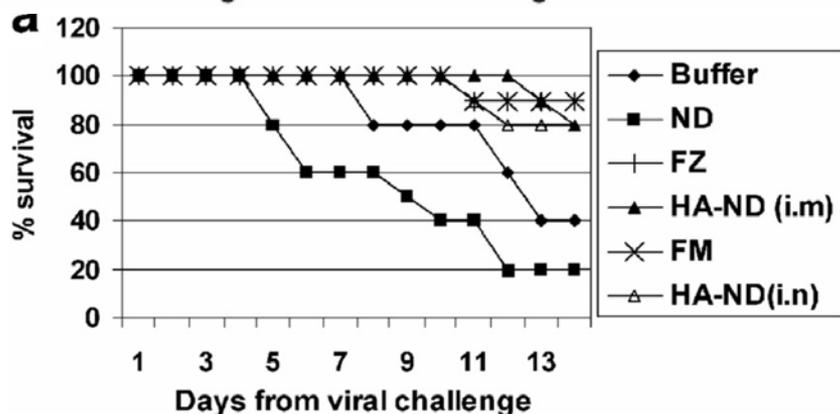
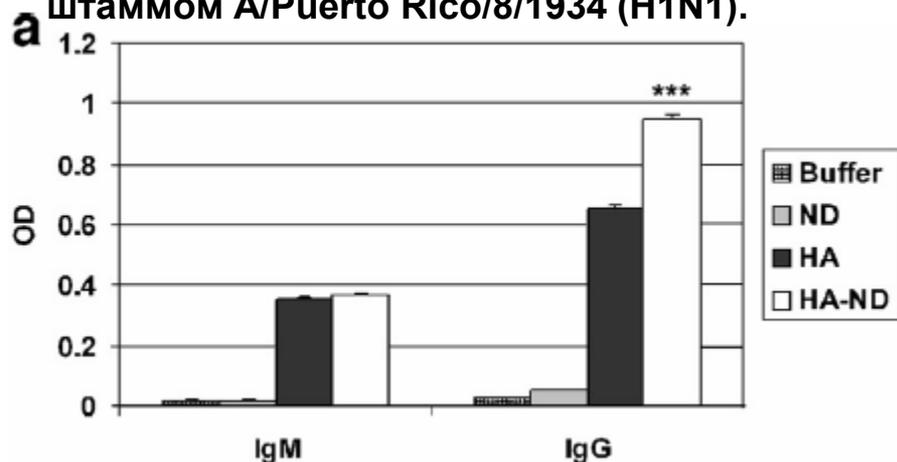
Negative stain electron microscopy of ND-AChR



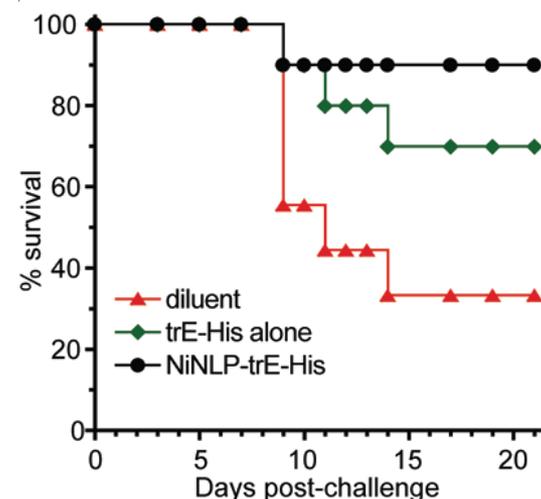
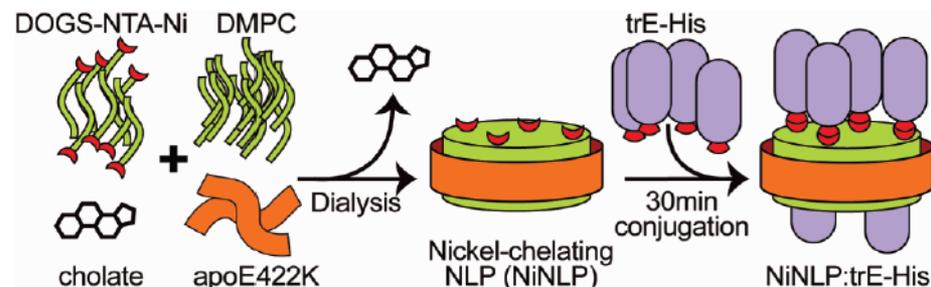
Sheng et al. Exp. Neur. 2010

# Нанодиски – «носитель» антигенов для вакцинации

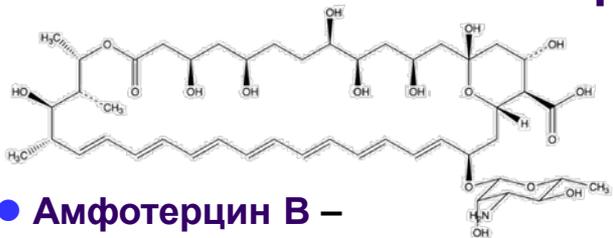
- Рекомбинантный гемагглютинин (HA) из вируса гриппа A/New Caledonia/20/99 (H1N1) был встроен в ЛБН из MSP1 и POC.С.
- Вакцинация мышей полученным препаратом давала иммунный ответ и защиту от инфекции сравнимую с результатами коммерческих субъединичных вакцин Fluzone и FluMist при инфицировании штаммом A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1).



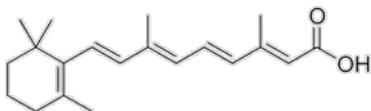
- Укороченный растворимый аналог белка (trE-His, содержащий His-tag) из оболочки вируса Лихорадки Западного Нила (WNV) был иммобилизован на нанодисках содержащих хелатирующие липиды (DMPC/DOGS-NTA-NiA 9:1) и фрагмент apoE-4.
- Полученный препарат обеспечивал значительно больший иммунный ответ и большую защиту от инфицирования WNV, чем trE-His.



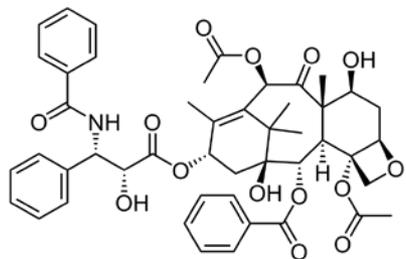
# Нанодиски как «носитель» для доставки гидрофобных биомолекул



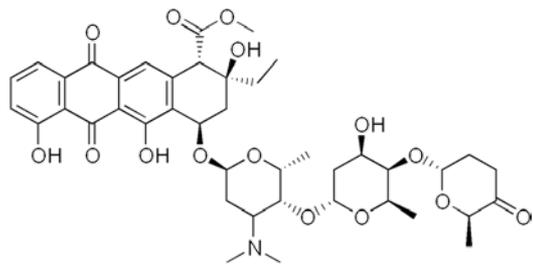
- **Амфотерцин В** – противогрибковый антибиотик



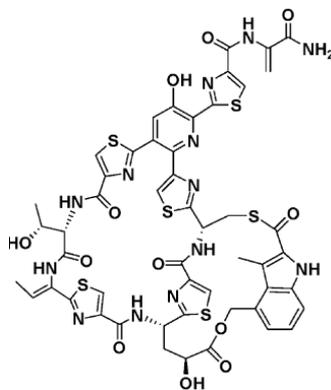
- **All-*trans*-ретиновая кислота (ATRA)** – противоопухолевое средство (острый промиелоцитарный лейкоз)



- **Paclitaxel (PTX)** – ингибитор митоза (рак груди, яичника и легкого)



- **Aclacinomycin A** – Ингибитор синтеза РНК (острый нелимфоцитарный лейкоз)



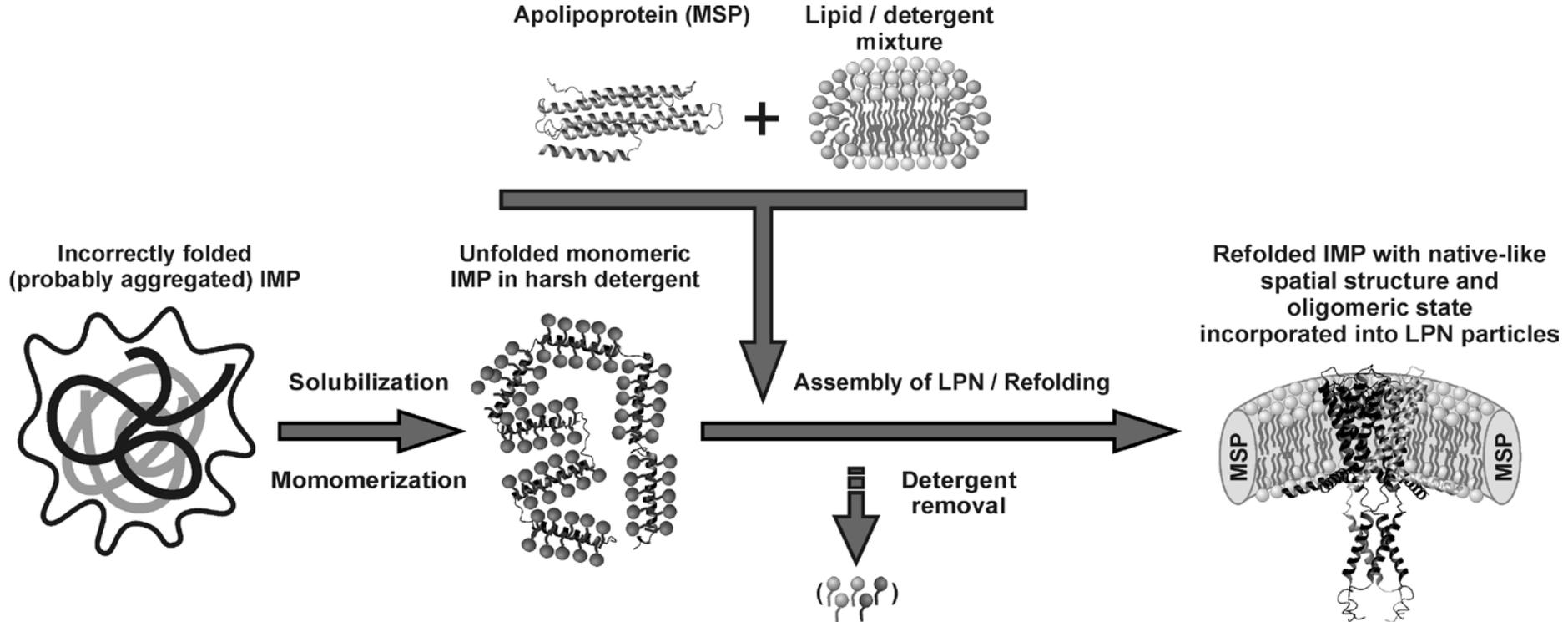
- **Nosiheptide** – тиопептидный антибиотик (активен против вируса гепатита В *in vitro*)

- **siRNA с ковалентно присоединенными гидрофобными молекулами (холестерин)**

## Направленная доставка нанодисков (модификация ApoA)

- Самопроизвольная доставка в клетки печени
- Ковалентное присоединение молочной кислоты для доставки в клетки печени
- Ковалентное присоединение фолиевой кислоты для доставки в опухолевые клетки
- Слитные конструкции scFv/ApoA (одноцепочечное вариабельное антитело)
- Слитные конструкции TAT/ApoA (cell penetrating peptide) для внутриклеточной доставки
- Ковалентное присоединение  $\alpha\beta_3$ -интегрин специфичного RGD-пептида для доставки в клетки эндотелия

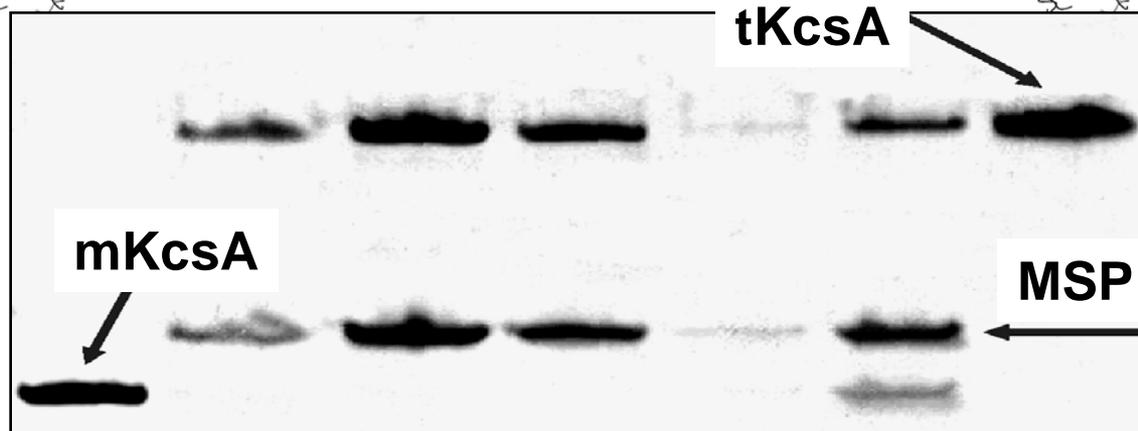
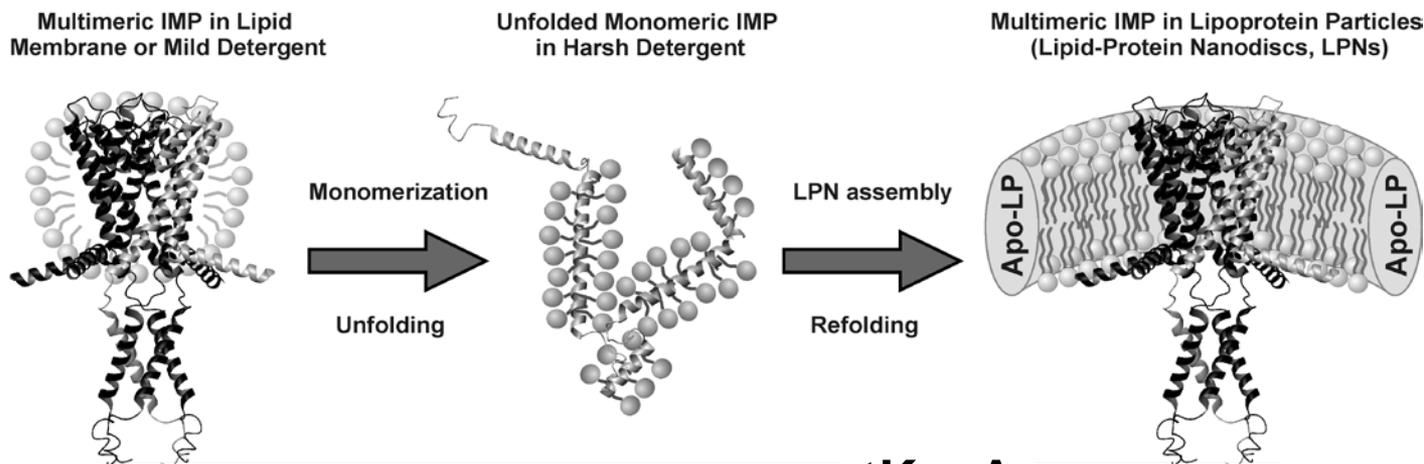
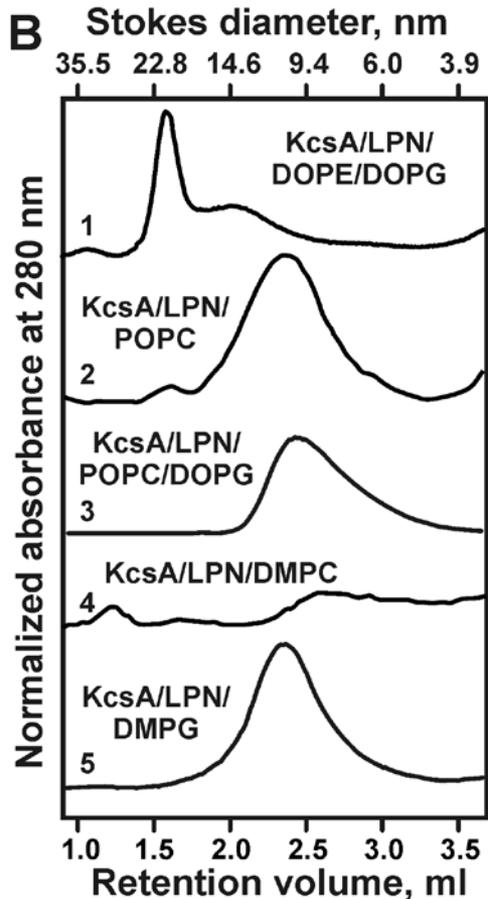
# Применение нанодисков для ренатурации рекомбинантных МБ



## Модельные объекты:

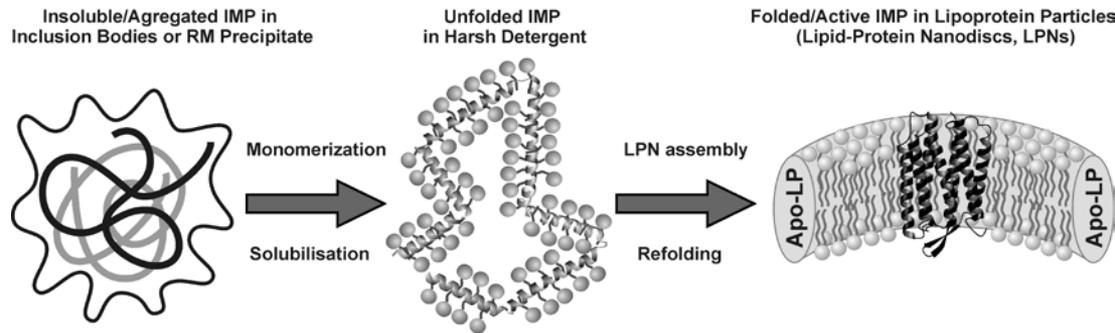
- **VSD** (вольт-сенсорный домен K<sup>+</sup> канала KvAP из *Aeropyrum pernix*, **4TM**)
- **KcsA** (K<sup>+</sup> канал из *Streptomyces lividans*, **гомотетрамер 2TM**)
- **ESR** (бактериородопсин из *Exiguobacterium sibiricum*, **7TM**)
- **ADRB2** ( $\beta$ 2-адренергический рецептор человека, **GPCR, 7TM**)

# Эффективность рефолдинга KcsA зависит от липидного состава нанодисков

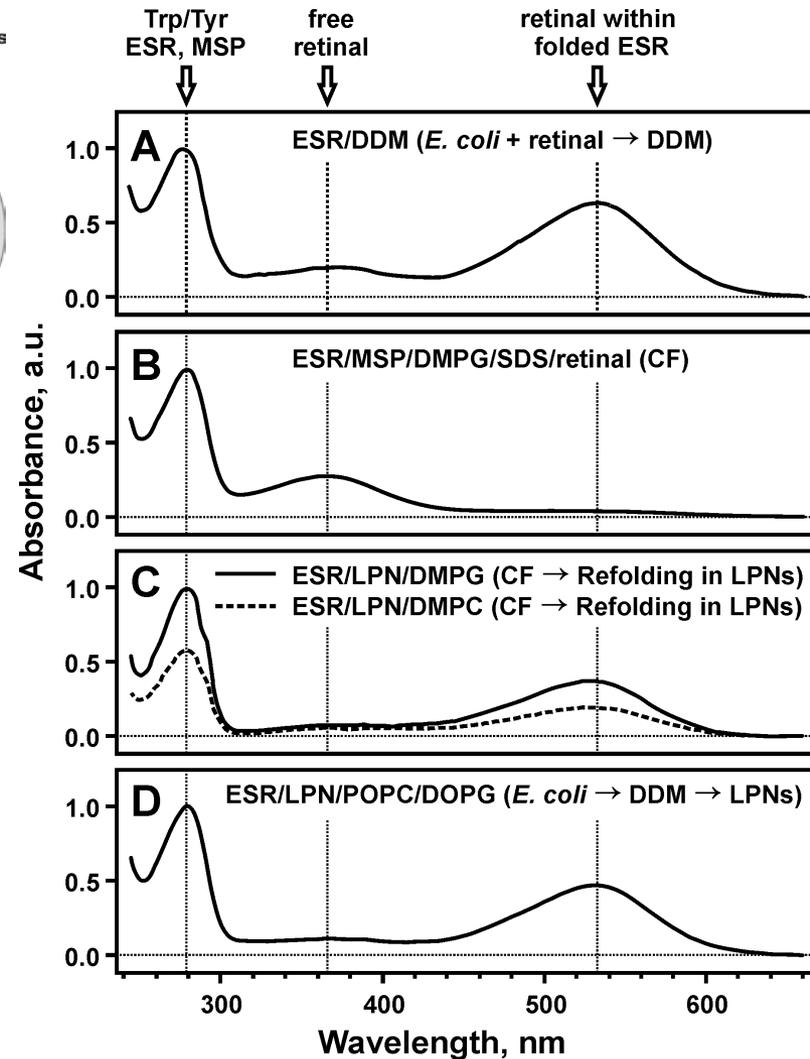


Липидный состав ЛБН	DOPE DOPG (7:3)	POPC	POPC DOPG (7:3)	DMPC	DMPG
Выход тетрамера tKcsA	31 %	90 %	49 %	7 %	35 %
Остаточная фракция мономера	n/o	n/o	n/o	n/o	20 %

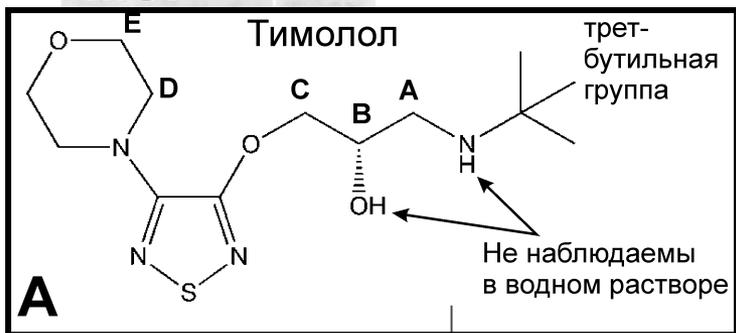
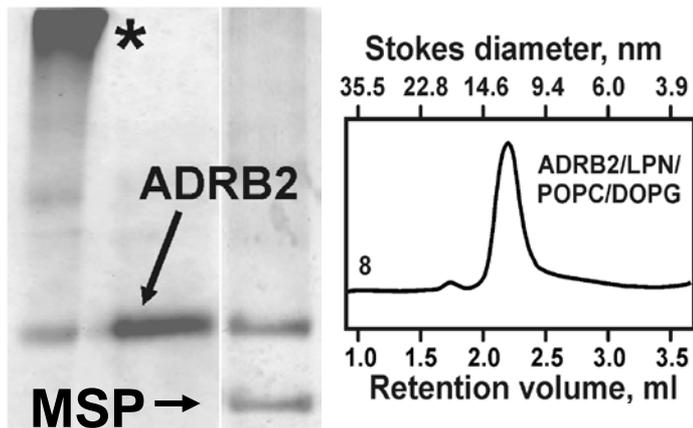
# Рефолдинг бактериородопсина ESR



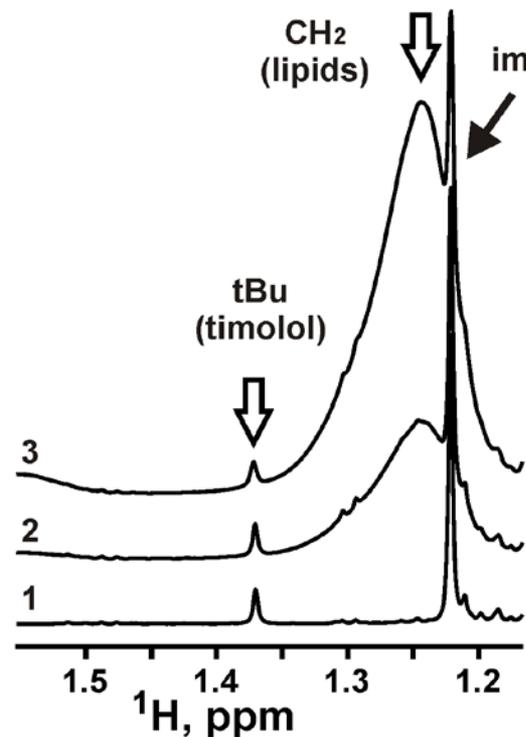
- **ESR** был получен либо в виде осадка бесклеточной системы, либо из мембран *E.coli* и в дальнейшем денатурирован
- Комплексы **ESR/ЛБН/DMPC** и **ESR/ЛБН/DMPG** были собраны из раствора **SDS** (жесткого детергента, в котором бактериородопсин неактивен, неструктурирован)
- Часть (~ 80%) **ESR** в составе нанодисков приобрела активность
- Общая эффективность ренатурации ~ **30% (DMPC)** и **60% (DMPG)** (эффективность встраивания **ESR** в нанодиски ~ 40 и 75 %)



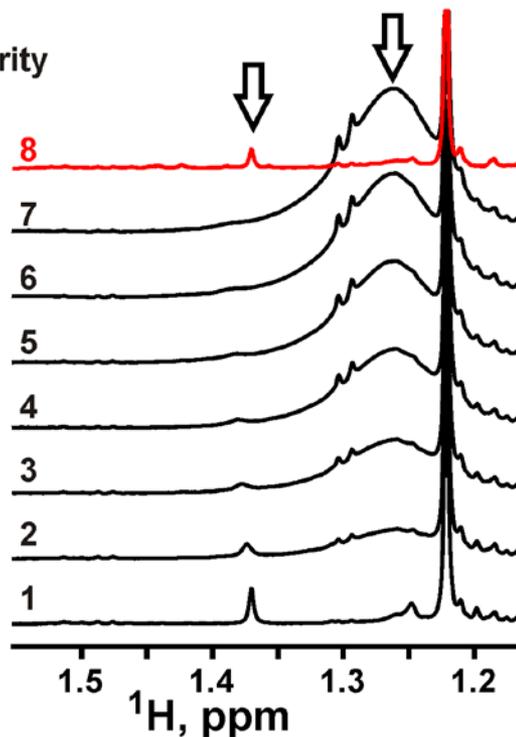
# Рефолдинг $\beta 2$ -адренергического рецептора



**A** “Empty” LPN/POPC/DOPG



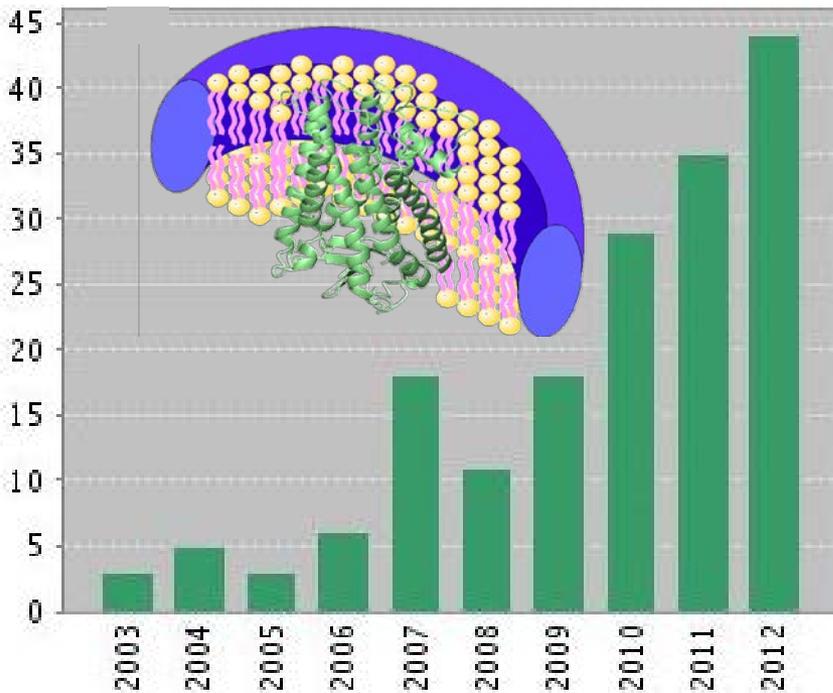
**B** ADRB2/LPN/POPC/DOPG



- **ADRB2** (фрагмент 25-340) был получен в результате экспрессии слитной конструкции с белком Mistic в составе телец включения *E. coli* (выход ~ 10 mg/l)
- Эффективность встраивания **ADRB2** в **ЛБН/ПОРС/ДОРС(3:2)** ~13%
- Согласно данным  $^1\text{H}$  ЯМР полученный препарат взаимодействует с селективным блокатором ADRB2 **тимололом** с  $K_D \sim 3.2 \mu\text{M}$
- ~ 40% **ADRB2** в составе нанодисков приобрела активность ( $K_D \sim 1-0.2 \text{ nM}$ )
- Общая эффективность ренатурации ~ 5%, что позволяет получить ~ 0.5 mg активного рецептора GPCR с литра бактериальной культуры

# Липид-белковые нанодиски – среда для стабилизации МБ

Публикации, посвященные нанодискам



## Преимущества:

- Гомогенность, стабильность (месяцы)
- Окружение близкое к нативному
- Сохраняют нативную структуру и активность МБ
- Возможно использование липидов с различными свойствами
- Обе стороны мембраны доступны растворителю
- Контролируемая стехиометрия инкапсулированных белковых молекул
- Защита от неспецифической агрегации собственной МБ в классических средах

## Возможное применение:

- Стабилизация МБ в растворе для прямых молекулярно-биологических и структурных (Cryo-EM, ЯМР) исследований
- Иммобилизация для исследований методами «Single-Molecule» (флуоресценция, AFM)
- Инкапсуляция мембранных ферментов для Биотехнологии
- Тест системы для скрининга лигандов в Фармакологии
- Ренатурация рекомбинантных МБ
- «Нано-вакцины», «Нано-доставка» гидрофобных лекарств

**Спасибо за  
внимание!**