



## БАКТЕРИАЛЬНАЯ ПРОДУКЦИЯ ВОДОРАСТВОРИМОГО ДОМЕНА *Lynx1* – ЭНДОГЕННОГО НЕЙРОМОДУЛЯТОРА НИКОТИНОВЫХ АЦЕТИЛХОЛИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ ЧЕЛОВЕКА

© 2011 г. М. А. Шулепко\*, Е. Н. Люкманова\*\*, И. Е. Кашеверов\*, Д. А. Долгих\*, \*\*, В. И. Цетлин\*, М. П. Кирпичников\*, \*\*

\*Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

\*\*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва

Поступила в редакцию 18.01.2011 г. Принята к печати 27.03.2011 г.

Мембраноассоциированный белок *Lynx1* экспрессируется в центральной нервной системе человека и играет важную роль в регуляции активности никотинового ацетилхолинового рецептора. В настоящей работе получен и экспрессирован ген водорастворимого домена *Lynx1* человека (*ws-Lynx1*). В миллиграммовых количествах *ws-Lynx1* удалось получить только в составе цитоплазматических телец включения. С целью оптимизации выхода рекомбинантного белка был проведен поиск условий ренатурации выделенного из телец включения *ws-Lynx1*. Полученный ренатурированный белок охарактеризован методами масс-спектрометрии и КД-спектроскопии. Показано, что *ws-Lynx1* является конкурентным ингибитором связывания [<sup>125</sup>I]- $\alpha$ -бунгаротоксина с мембранами из электрического органа ската *Torpedo californica*, содержащими никотиновый ацетилхолиновый рецептор мышечного типа ( $\alpha 1_2\beta\gamma\delta$ ).

*Ключевые слова:* нейромодуляторы; *Lynx*; бактериальная продукция; никотиновый ацетилхолиновый рецептор.

### ВВЕДЕНИЕ

Обнаружение в центральной нервной системе белков, обладающих “трехпетельной” пространственной структурой, типичной для  $\alpha$ -нейротоксинов яда змей, поставило вопрос о физиологической роли этих молекул. На сегодняшний день обнаружено несколько подобных белков: *Lynx1*, *Lynx2*, *SLURP-1*, *SLURP-2* [1–4]. Известно, что все они взаимодействуют с никотиновым ацетилхолиновым рецептором (nAChR). *Lynx1* был обнаружен в клетках мышей, обезьян, насекомых, быка и человека [1, 2, 5, 6]. Ген, кодирующий *Lynx1*, относится к семейству генов *Lu-6* и имеет высокую степень гомологии с генами нейротоксинов яда змей. Согласно имеющимся данным, *Lynx1* представляет собой мембраноассоциированный белок, связанный с клеточной мембраной посредством гликофосфатидилинозитного (GPI) “якоря” [1, 2, 4]. В нейронах

*Lynx1* локализован на наружной стороне цитоплазматической мембраны и способен взаимодействовать с nAChR.

В электрофизиологических экспериментах, выполненных на ооцитах *Xenopus laevis*, экспрессирующих nAChR  $\alpha 4\beta 2$ -типа, было установлено, что добавление водорастворимого домена *Lynx1* к ацетилхолину – естественному агонисту nAChR, вызывает увеличение амплитуды тока на 30–40% [1]. При совместной экспрессии *Lynx1* и nAChR  $\alpha 4\beta 2$ -типа было обнаружено, что рецептор становится менее чувствителен к ацетилхолину, быстрее переходит в состояние десенситизации и медленнее возвращается из него [2].

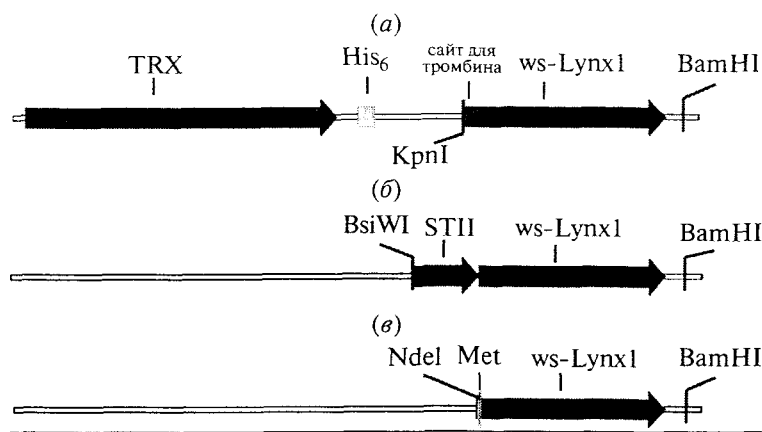
Таким образом, в отличие от  $\alpha$ -нейротоксинов яда змей, являющихся высокоспецифичными ингибиторами nAChR [7], *Lynx1* представляет собой чрезвычайно важный модулятор активности nAChR [8]. В экспериментах *in vivo* было показано, что мыши, лишенные гена *Lynx1*, демонстрировали повышенные показатели в специальных тестах на обучение и запоминание, но при этом из-за гибели нервных клеток их продолжительность жизни заметно снижалась [8].

Хотя биологические свойства *Lynx1* описаны, их взаимосвязь со структурой изучена мало. Для выяснения молекулярных механизмов, лежащих в основе взаимодействия *Lynx1* с nAChR, необходима раз-

Сокращения: DTT – дитиотреитол; GSH и GSSG – восстановленная и окисленная форма глутатиона; GST – глутатион-S-трансфераза; GPI – гликофосфатидилинозит; IC<sub>50</sub> – константа ингибирования, при которой заблокировано 50% связывающих сайтов рецептора; nAChR – никотиновый ацетилхолиновый рецептор; NT – нейротоксин; STII – сигнальный пептид энтеротоксина II *E. coli*; TRX – тиоредоксин; *ws-Lynx1* – водорастворимый домен нейромодулятора *Lynx1* человека.

\* Автор для связи (тел./факс: (495) 330-69-83; эл. почта: ekaterina-lyukmanova@yandex.ru).





**Рис. 2.** Конструкции, использованные для получения ws-Lynx1: (а) – для продукции в виде слитной полипептидной цепи с тиоредоксином; (б) – конструкция, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую пептид STII и обеспечивающую транслокацию синтезируемого белка в периплазматическое пространство клетки; (в) – для продукции аминокислотной последовательности, полностью идентичной последовательности природного ws-Lynx1.

TRX-NT с помощью других ферментов, таких, как энтеропептидаза и фактор Ха [9]. Использование BtCN в качестве агента для химического гидролиза в случае TRX-ws-Lynx1 невозможно вследствие наличия в последовательности нейромодулятора нескольких аминокислотных остатков метионина (рис. 1).

Для секреции ws-Lynx1 был создан вектор на основе коммерческой плазмиды *pET-22b(+)* с заменой гена сигнального пептида *pelB* на ген *STII* сигнального пептида энтеротоксина II *E. coli*, ранее хорошо зарекомендовавшего себя для бактериальной секреции α-нейротоксинов [10–12]. Корректная структура гена *ws-Lynx1* в составе полученных конструкций была подтверждена секвенированием ДНК.

### Бактериальная продукция ws-Lynx1

Бактериальная продукция функционально активных белков с высоким содержанием дисульфидных связей представляет собой непростую задачу. Правильное замыкание дисульфидных связей является непременным условием образования корректной пространственной структуры белков и проявления ими функциональной активности [9, 13]. Однако в бактериальной цитоплазме не происходит образования дисульфидных связей. Известные на сегодняшний день примеры успешной экспрессии генов α-нейротоксинов яда змей, структурных гомологов Lynx1, в клетках *E. coli* основаны на использовании специальных подходов, способствующих замыканию дисульфидных связей. К таким подходам можно отнести продукцию в виде гибридной полипептидной цепи с TRX [14–17] и секрецию в периплазматическое пространство [10–12, 18]. В данной работе оба этих метода были опробованы для получения ws-Lynx1.

Известно, что TRX способен катализировать корректное замыкание дисульфидов в связанных с ним белках при совместной экспрессии. При использовании этой системы бактериальной продукции выход растворимого гибридного белка TRX-ws-Lynx1 составил 60 мг с одного литра бактериальной культуры. Однако анализ с помощью гель-электрофореза показал, что гидролиз очищенного гибридного белка TRX-ws-Lynx1 тромбином приводит к получению нескольких продуктов с массой, меньшей, чем расчетная для ws-Lynx1, что, вероятно, можно объяснить неспецифическим гидролизом тромбина (данные не приведены).

Другим способом получения в *E. coli* растворимых рекомбинантных белков с дисульфидными связями является их секреция в периплазматическое пространство, имеющее отличный от цитоплазмы окислительно-восстановительный потенциал, способствующий замыканию дисульфидных связей. Этот метод хорошо зарекомендовал себя при получении короткого нейротоксина NTII из яда кобры *Naja oxiana*, молекула которого стабилизирована четырьмя дисульфидными связями, и его мутантных вариантов с дополнительной дисульфидной связью в центральной петле [10–12]. Метод основан на продукции целевого белка с сигнальным пептидом на N-конце полипептидной цепи, наличие которого определяет преимущественное накопление рекомбинантного белка в периплазматическом пространстве клеток *E. coli*. При перемещении рекомбинантного белка через внутреннюю мембрану бактериальной клетки в периплазматическое пространство происходит отщепление сигнального пептида, что позволяет получать целевой белок с природной N-концевой последовательностью.

Был проведен подбор условий секреции ws-Lynx1, который включал в себя варьирование штамма-продуцента (были опробованы штаммы BL21(DE3) и BL21(DE3)pLysS), состава среды культивирования

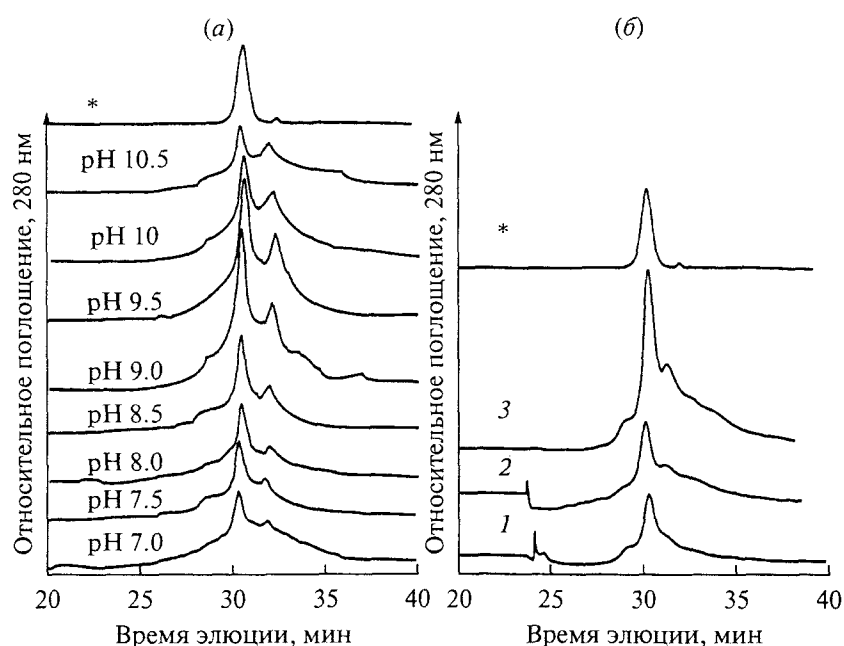


Рис. 3. ВЭЖХ-анализ процесса ренатурации ws-Lyx1 в разных условиях. Эффективность ренатурации при значениях pH 7.0–10.5 (а) и при оптимальном значении pH (9.5): без добавления *L*-аргинина (1) и в присутствии *L*-аргинина в концентрациях 0.2 (2) и 0.5 М (3) (б). Звездочкой показан хроматографический профиль ренатурированного **wx**-Lyx1 после финальной очистки.

(были опробованы питательные среды ТВ, LB и M9), температуры, концентрации индуктора и времени культивирования клеток. К сожалению, независимо от среды, типа бактериального штамма и концентрации индуктора (вплоть до его отсутствия) уже через 3 ч культивирования наблюдался лизис клеток. Предположительно, это связано с возможной токсичностью синтезируемого белка.

В связи с этим была разработана методика получения ws-Lyx1 в виде полипептидной цепи, аминокислотная последовательность которой полностью соответствовала природной. В связи с тем, что белок накапливался в клетке в составе телец включения, для получения функционально активной формы белка была применена методика ренатурации, ранее успешно примененная для рекомбинантной продукции “слабого” токсина WTX из яда кобры *N. kaouthia* [13].

#### Ренатурация ws-Lyx1 из телец включения

Получение ws-Lyx1 в виде нерастворимых телец включения потребовало разработки протокола ренатурации. Эффективность ренатурации белков, содержащих дисульфидные связи, зависит от многих факторов. Ранее для ренатурации “слабого” токсина WTX, структурного гомолога ws-Lyx1 (имеющего, так же как и Lyx1, дополнительную дисульфидную связь в *N*-концевой петле), был проведен подбор условий ренатурации, который в числе прочего включал анализ влияния буферного состава среды на выход ренатурированного продукта [13]. С помо-

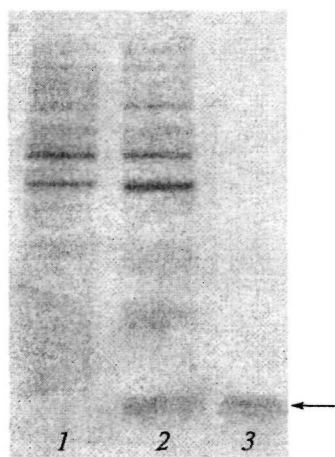
щью ВЭЖХ был проведен сравнительный анализ эффективности процесса ренатурации ws-Lyx1 в буферном растворе, содержащем 50 мМ Трис-НСI, 1.5 М мочевины, 3 мМ GSH, 0.3 мМ GSSG, при разных значениях pH (7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0, 10.5) (рис. 3а). Анализ показал, что наибольший выход ренатурированного белка наблюдается при значении pH 9.5.

Известно, что выход ренатурации можно повысить, используя различные добавки [19, 20]. В данной работе нами было исследовано влияние *L*-аргинина на эффективность ренатурации ws-Lyx1. Было обнаружено, что 0.5 М-концентрация *L*-аргинина в буферном растворе является оптимальной для ренатурации ws-Lyx1 (рис. 3б).

Таким образом, найденные оптимальные условия ренатурации ws-Lyx1 соответствуют ренатурирующему буферному раствору следующего состава: 50 мМ Трис-НСI, 1.5 М мочевины, 0.5 М *L*-аргинин, 3.0 мМ GSH, 0.3 мМ GSSG (GSH : GSSG, 10 : 1), pH 9.5. Использование этого подхода позволило получить 1.8 мг ренатурированного ws-Lyx1 с 1 л бактериальной культуры. Эффективность ренатурации в оптимальных условиях, характеризующая долю ренатурированного белка по отношению к общему количеству восстановленного белка, составила 8%.

#### Анализ физико-химических свойств рекомбинантного ws-Lyx1

Чистота препарата ренатурированного рекомбинантного ws-Lyx1 была оценена с помощью



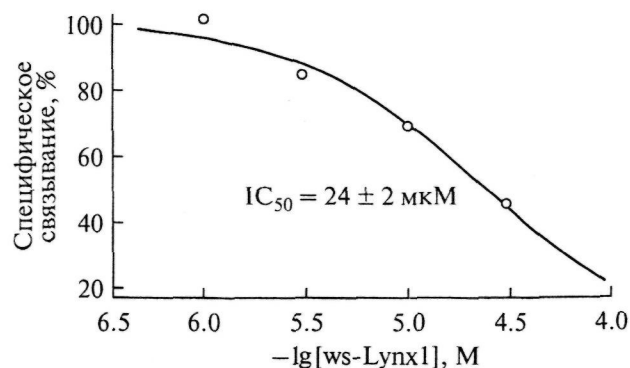
**Рис. 4.** Электрофореграмма лизатов клеток штамма-реципиента *E. coli* BL21(DE3) (1), штамма-производителя *E. coli* BL21(DE3)/*pET22b(+)*/*ws-Lynx1* (2) и очищенного препарата ренатурированного *ws-Lynx1* (3) в 13%-ном ПААГ. Стрелкой указано положение белка с  $M \sim 8$  кДа.

электрофореза в ПААГ (система Трис/Трицин, 0.3% SDS) (рис. 4), ВЭЖХ и масс-спектрометрии и составила не менее 98%. Методами масс-спектрометрии было показано, что экспериментально полученная молекулярная масса рекомбинантного *ws-Lynx1* (8401 Да) совпадает с теоретически рассчитанной (8399.6 Да) в пределах погрешности измерения. При восстановлении с помощью DTT дисульфидных связей молекулярная масса *ws-Lynx1* изменилась на число единиц, равное числу неспаренных остатков цистеина в молекуле рекомбинантного белка, и составила 8411 Да, что служит доказательством полного замыкания всех возможных дисульфидных связей в молекуле ренатурированного *ws-Lynx1*.

Вторичная структура ренатурированного *ws-Lynx1* была исследована методом КД-спектроскопии. Спектр рекомбинантного ренатурированного *ws-Lynx1* указал на преимущественно  $\beta$ -структурную организацию молекулы белка ( $\alpha$ -структура – 5.7%,  $\beta$ -слой – 39.4%,  $\beta$ -поворот – 21.9%, неупорядоченная структура 33.0%). Полученные оценки содержания различных элементов вторичной структуры характерны для  $\alpha$ -нейротоксинов яда змей [9].

*Исследование биологической активности рекомбинантного ws-Lynx1*

Способность рекомбинантного *ws-Lynx1* специфически взаимодействовать с nAChR была исследована в экспериментах по конкурентному ингибированию связывания  $\alpha$ -бунгаротоксина меченого  $^{125}\text{I}$ , с мышечным nAChR из мембран электрического органа ската *T. californica* (рис. 5). Было обнаружено, что *ws-Lynx1* способен взаимодействовать с никотиновым ацетилхолиновым рецептором мы-



**Рис. 5.** Кривая конкурентного ингибирования рекомбинантным *ws-Lynx1* связывания  $^{125}\text{I}$ - $\alpha$ -бунгаротоксина с мембранами из электрического органа ската *T. californica*, содержащими мышечный nAChR с концентрацией токсинсвязывающих сайтов 1.25 нМ.

шечного типа ( $\alpha 1_2\beta\gamma\delta$ ) с  $\text{IC}_{50}$  около 20–30 мкМ. Эти данные свидетельствуют о том, что полученный рекомбинантный белок обладает биологической активностью по отношению к nAChR, и сайты взаимодействия рецептора с  $\alpha$ -бунгаротоксином и *ws-Lynx1* перекрываются. Кроме того, было показано, что увеличение времени инкубации *ws-Lynx1* с препаратом мембран с 5 до 80 мин приводит к исчезновению специфического связывания нейромодулятора с рецептором, что, возможно, является следствием обратимости действия *ws-Lynx1* на рецептор.

Таким образом, нами впервые разработана система бактериальной продукции водорастворимого домена эндогенного нейромодулятора человека *Lynx1* в активной форме. Наличие подобной системы открывает новые возможности для функциональных исследований белков этого малоизученного класса.

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ**

Олигонуклеотиды были синтезированы в фирме “Евроген” ИБХ РАН. Мембраны электрического органа ската *T. californica* любезно предоставлены проф. Ф. Хухо (Свободный университет Берлина, Германия) (Freie Universität Berlin, Germany).

**Клонирование гена *ws-Lynx1*.** Ген *ws-Lynx1* конструировали из 6 синтетических перекрывающихся олигонуклеотидов с использованием трехстадийной ПЦР.

Ген *ws-Lynx1* был клонирован в коммерческие векторы *pET-32a(+)* (Novagen, США) по сайтам рестрикции KpnI и BamHI, *pET-22b(+)* (Novagen, США) по сайтам рестрикции NdeI и BamHI и в вектор *pET-22b(+)*/*STII* по сайтам рестрикции BsiWI и BamHI. Олигонуклеотидные последовательности праймеров, использованных в работе, приведены в таблице.

**Экспрессия гена *ws-Lynx1* в *E. coli*.** Клетки *E. coli* штамма BL21(DE3) (Novagen, США) трансформировали вектором *pET-22b(+)/ws-Lynx1* и рассевали на чашки Петри с LB-агаром и ампициллином. Колонии с чашки инокулировали в 30 мл питательной среды TB, содержащей ампициллин (100 мкг/мл). Культивирование проводили при 37°C с умеренным перемешиванием (250 об/мин) до достижения клеточной плотности в культуре, соответствующей величине поглощения 0.6 при 600 нм. Далее клетки осаждали (1000 g), осадок стерильно ресуспендировали в 1 л среды TB и продолжали выращивание в ферментере (Bioflow 3000, New Brunswick Scientific, США). Культивирование осуществляли при 37°C в условиях автоматического поддержания относительного содержания кислорода в системе не менее 30% от максимально достижимого. Регулируемыми параметрами были обороты мешалки и скорость подачи воздуха. Экспрессию гена *ws-Lynx1* индуцировали добавлением изопропил-β-D-тиогалактопиранозидо до конечной концентрации 0.05 мМ при клеточной плотности в культуре, соответствующей величине поглощения 1.0 при 600 нм. После индукции культивирование клеток осуществляли в течение 18 ч.

**Отмывание телец включения.** Клетки собирали центрифугированием (10000 g, 20 мин, 4°C) и ресуспендировали в холодном буфере 20 мМ Трис-НСl, 100 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, pH 8.0 (буфер А) в соотношении 10 мл буфера на 1 г осадка. Далее суспензию клеток дезинтегрировали ультразвуком (Branson Digital Sonifier, США) при выходной мощности 50 Вт и 4°C в течение 10 мин. Полученную взвесь центрифугировали при 36000 g в течение 20 мин. Образовавшийся осадок ресуспендировали в буфере А, содержащем 2 М мочевины. Суспензию переносили в предварительно охлажденный стакан, дезинтегрировали 10 с и центрифугировали в тех же условиях, что и ранее. Процедуру повторяли дважды. После отмывания 2 М мочевиной осадок два раза промывали буфером А, содержащим 1% Тритон X-100, и затем два раза деионизованной водой (MilliQ, Millipore, США). Отмытые тельца включения хранили при –20°C.

**Восстановление *ws-Lynx1* и очистка из телец включения.** Предварительно отмытые тельца включения ресуспендировали в охлажденном буфере, содержащем 50 мМ NaP<sub>i</sub> (pH 7.4), 1 мМ трис(2-карбоксиил)фосфингидрохлорид, из расчета 200 мл буфера на 1 г телец включения. Суспензию дезинтегрировали с помощью ультразвукового дезинтегратора при выходной мощности прибора 50 Вт и 4°C в течение 1.5 мин. Затем к смеси добавляли DTT до концентрации 5 мМ и мочевины до концентрации 8 М. В таком виде тельца включения оставляли на 1 ч при слабом перемешивании. Смесь центрифугировали при 36000 g 20 мин, 4°C.

Для удаления клеточного дебриса pH супернатанта доводили с помощью H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> до значения 5.0, после этого смесь снова центрифугировали в тех же

условиях. Очистку белка осуществляли с помощью ионообменной смолы SP-Sephарозе (Amersham, США), предварительно уравновешенной буфером, содержащим 50 мМ NaP<sub>i</sub> (pH 5.0), 8 М мочевины, 5 мМ DTT. Элюцию *ws-Lynx1* осуществляли в градиенте концентрации NaCl. Сразу после хроматографии pH во фракциях, содержащих целевой белок, доводили до значения 3.0. Собранный после ионообменной хроматографии *ws-Lynx1* концентрировали на ячейке для ультрафильтрации (YM 1.000; Millipore, США) и подвергали гель-фильтрации на смоле Sephadex G-25 (GE Healthcare, Швеция), предварительно уравновешенной раствором, содержащим 50 мМ Трис-НСl (pH 9.5) и 8 М мочевины.

**Ренатурация рекомбинантного белка *ws-Lynx1* человека.** Очищенный препарат *ws-Lynx1* растворяли в буфере для ренатурации, содержащем 50 мМ Трис-НСl, 1.5 М мочевины, 0.5 М L-аргинин, 3 мМ GSH и 0.3 мМ GSSG, pH 9.5, до конечной концентрации белка 0.1 мг/мл и выдерживали при 4°C в течение 3 сут. После окончания процесса раствор концентрировали в 4 раза с помощью концентрированной ячейки с размером пор мембраны 1 кДа (Millipore, США).

**ВЭЖХ *ws-Lynx1*.** Анализ и очистку *ws-Lynx1* после ренатурации проводили с помощью хроматографической колонки Jupiter C4, A300, 4.6 × 250 мм (Phenomenex, США) на приборе Smartline (Knauer, Германия). Элюцию белков осуществляли в градиенте концентрации ацетонитрила от 10 до 45% за 50 мин в присутствии 0.1% TFA. Препарат полученного после очистки белка был лиофилизирован.

**КД-спектроскопия.** Спектры КД были получены при комнатной температуре на спектрометре J-810 (Jasco, Япония). Концентрация *ws-Lynx1* в воде составляла 0.09 мМ. Содержание элементов вторичной структуры оценивали в программе CONTINLL [21].

**Масс-спектрометрия.** Спектры получали на времяпролетном масс-спектрометре UltraFlex TOF/TOF фирмы "Brucker Daltonics" (Германия), оснащенным источником ионизации MALDI. В линейном режиме детектировали положительно заряженные ионы.

**Взаимодействие рекомбинантного *ws-Lynx1* с мембранами из электрического органа ската *T. californica*** исследовали по методике работы [22] с некоторыми модификациями, используя [<sup>125</sup>I]-α-бунгаротоксин (2000 Ки/моль; GE Healthcare, Великобритания). Для связывания с мембранами и промывки использовали буферный раствор, содержащий 20 мМ Трис-НСl (pH 8.0), 1 мг/мл BSA. Время инкубации препаратов с *ws-Lynx1* составляло от 5 мин до 2 ч. Диапазон тестируемых концентраций рекомбинантного *ws-Lynx1* составлял от 1 до 50 мкМ. Экспериментальные данные анализировали в программной среде Origin 6.1 (MicroCalSoftware Inc.).

Работа была выполнена при финансовой поддержке Российской академии наук (программа

“Клеточная и молекулярная биология”), Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 09-04-01567-а) и в рамках реализации ФЦП “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 годы”.

Авторы выражают глубокую признательность Р.В. Тихонову и А.П. Криволаповой за помощь в наработке биомассы, содержащей ws-Lynx1.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Miwa J.M., Ibanez-Tallon I., Crabtree G.W., Sánchez R., Sali A., Role L.W., Heintz N. // *Neuron*. 1999. V. 23. P. 105–114.
2. Tekinay A.B., Nong Y., Miwa J.M., Lieberam I., Ibanez-Tallon I., Greengard P., Heintz N. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009. V. 106. P. 4477–4482.
3. Chimienti F., Hogg R.C., Plantard L., Lehmann C., Brakch N., Fischer J., Huber M., Bertrand D., Hohl D. // *Hum. Mol. Genet.* 2003. V. 12. P. 3017–3024.
4. Tsuji H., Okamoto K., Matsuzaka Y., Iizuka H., Tamiya G., Inoko H. // *Genomics*. 2003. V. 81. P. 26–33.
5. Sekhon H.S., Song P., Jia Y., Lindstrom J., Spindel E.R. // *Cell Tissue Res*. 2005. V. 320. P. 287–297.
6. Choo Y.M., Lee B.H., Lee K.S., Kim B.Y., Li J., Kim J.G., Lee J.H., Sohn H.D., Nah S.Y., Jin B.R. // *Neurosci*. 2008. V. 38. P. 224–235.
7. Tsetlin V.I., Hucho F. // *FEBS Lett*. 2004. V. 557. P. 9–13.
8. Miwa J.M., Stevens T.R., King S.L., Caldarone B.J., Ibanez-Tallon I., Xiao C., Fitzsimonds R.M., Pavlides C., Lester H.A., Picciotto M.R., Heintz N. // *Neuron*. 2006. V. 51. P. 587–600.
9. Lyukmanova E.N., Shulepko M.A., Shenkarev Z.O., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P. // *Russ. J. Bioorgan. Chemistry*. 2010. V. 36. P. 137–145 (Люкманова Е.Н., Шулепко М.А., Шенкарев З.О., Долгих Д.А., Кирпичников М.П. // *Биоорганическая химия*. 2010. Т. 36. С. 149–158).
10. Krabben L., van Rossum B.J., Jehle S., Bocharov E., Lyukmanova E.N., Schulga A.A., Arseniev A., Hucho F., Oschkinat H. // *J. Mol. Biol.* 2009. V. 390. P. 662–671.
11. Lyukmanova E.N., Shenkarev Z.O., Schulga A.A., Ermolyuk Y.S., Mordvinsev D.Y., Utkin Y.N., Shoulepko M.A., Hogg R.C., Bertrand D., Dolgikh D.A., Tsetlin V.I., Kirpichnikov M.P. // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. P. 24784–24791.
12. Bocharov E.V., Lyukmanova E.N., Ermolyuk Ya.S., Schulga A.A., Pluzhnikov K.A., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P., Arseniev A.S. // *Appl. Magn. Reson*. 2003. V. 24. P. 247–254.
13. Люкманова Е.Н., Шулепко М.А., Тихонов Р.В., Шенкарев З.О., Парамонов А.С., Вульфсон А.Н., Кашеверов И.Е., Устич Т.Л., Уткин Ю.Н., Арсеньев А.С., Цетлин В.И., Долгих Д.А., Кирпичников М.П. // *Биохимия*. 2009. Т. 74. С. 1400–1409.
14. Wang Y., Jing L., Xu K. // *J. Biotechnol.* 2002. V. 94(3). P. 235–244.
15. Chang L., Lin J., Wu P., Chang C., Hong E. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997. V. 230. P. 192–195.
16. Lyukmanova E.N., Schulga A.A., Arsenieva D.A., Pluzhnikov K.A., Dolgikh D.A., Arseniev A.S., Kirpichnikov M.P. // *Russ. J. Bioorgan. Chemistry*. 2004. V. 30. P. 25–34 (Люкманова Е.Н., Шульга А.А., Арсеньева Д.А., Плужников К.А., Долгих Д.А., Арсеньев А.С., Кирпичников М.П. // *Биоорганическая химия*. 2004. Т. 30. С. 30–40).
17. Peng L.S., Zhong X.F., Huang Y.S., Zhang Y., Zheng S.L., Wei J.W., Wu W.Y., Xu A.L. // *Toxicol.* 2003. V. 42. P. 753–761.
18. Fiordalisi J.J., al-Rabee R., Chiappinelli V.A., Grant G.A. // *Biochemistry*. 1994. V. 33. P. 12962–12967.
19. Chen J., Liu Y., Wang Y., Ding H., Su Z. // *Biotechnol. Prog.* 2008. V. 24(6). P. 1365–1372.
20. Golovanov A.P., Hautbergue G.M., Wilson S.A., Lian L.Y. // *J. Am. Chem. Soc.* 2004. V. 126. P. 8933–8939.
21. Provencher S.W., Glockner J. // *Biochemistry*. 1982. V. 20. P. 33–37.
22. Kasheverov I.E., Zhmak M.N., Fish A., Rucktooa P., Khrushchov A.Y., Osipov A.V., Ziganshin R.H., D'hoedt D., Bertrand D., Sixma T.K., Smit A.B., Tsetlin V.I. // *J. Neurochem.* 2009. V. 111. P. 934–944.

## Bacterial Expression of Water-soluble Domain of Lynx1, Endogenic Neuromodulator of Human Nicotinic Acetylcholine Receptors

M. A. Shulepko\*, E. N. Lyukmanova\*\*, I. E. Kasheverov\*,  
D. A. Dolgikh\*, \*\*\*, V. I. Tsetlin\*, and M. P. Kirpichnikov\*, \*\*\*

\*Phone/fax: +7 (495) 330-69-83; e-mail: ekaterina-lyukmanova@yandex.ru

\*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS,  
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP Moscow, 117997 Russia

\*\* Institute of Physics and Technology, Moscow region

\*\*\* Lomonosov Moscow State University, Moscow

Lynx1 expresses in the central nervous system and plays important role in a regulation of nicotinic acetylcholine receptors. Successful milligram-quantitative expression of ws-Lynx1 was achieved only in the case of its production in the form of cytoplasm inclusion bodies. Different conditions of ws-Lynx1 refolding for yield optimization were performed. The obtained recombinant protein was characterized by means of mass spectrometry and CD spectroscopy. The binding experiments on the nAChRs from *Torpedo californica* membranes revealed that ws-Lynx1 is biologically active and blocks muscle nAChR with  $IC_{50} \sim 20\text{--}30 \mu\text{M}$ .

**Keywords:** neuromodulators, Lynx, bacterial expression, nicotinic acetylcholine receptor.