**Апробация неканонических полигистидиновых меток**

***Тарабарова А.Г.,1,2 Юркова М.С.,2* *Лопухов А.В.,3 Федоров А.Н.2***

*Студент 2 курса магистратуры*

*1Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,*

*биотехнологический факультет, Москва, Россия*

*2 ФИЦ Биотехнологии РАН, Москва, Россия*

*3Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,*

*химический факультет, Москва, Россия*

*E-mail: tarabarovan*[*@yandex.ru*](mailto:ivanov@yandex.ru)

Присоединение полигистидиновой метки к N- или C-концу белка — это распространенная стратегия эффективного и быстрого выделения рекомбинантных белков. Хотя и считается, что добавление His-метки практически не оказывает эффекта на функцию белка и его пространственную структуру, это не всегда так. Классические метки могут изменять каталитические свойства ферментов, связываться с активным сайтом, нарушать взаимодействие субъединиц олигомерных белков, вызывать агрегацию. Расположенные подряд гистидиновые остатки могут нарушать нативную вторичную структуру белка. Мы предположили, что введение глициновых остатков между триадой остатков гистидина позволит увеличить локальную конформационную подвижность метки, поэтому включение такой метки в состав полипептидной цепи позволит сохранить общую конформацию белка близкой к нативной, при этом придав ему аффинность к Ni2+-содержащим смолам.

Таким образом, в настоящей работе было исследовано влияние неканонических гистидиновых меток, введенных в состав полипептидной цепи, на вторичную структуру модельного белка и его аффиность к Ni2+-содержащей смоле.

В качестве модельного объекта использовался GrAD207, пермутированный вариант апикального домена шаперона GroEL, входящий в состав разработанной в лаборатории системы стабилизации нерастворимых белков [1] в качестве фьюжн-партнера [2].

Исследование вторичной структуры вариантов GrAD207 с различными гистидиновыми метками методом кругового дихроизма подтверждает, что классическая гистидиновая метка нарушает вторичную структуру GrAD207, вызывая его агрегацию. Спектры вторичной структуры образцов с тремя остатками гистидина и неканоническими вариантами 3His1Gly3His и 3His3Gly3His наиболее приближены к спектру GrAD207. Качественное исследование взаимодействия белка с металл-аффинной смолой и измерение термодинамической константы равновесия методом поверхностного плазмонного резонанса показало, что все предложенные варианты меток в составе полипептидной цепи способны связываться с Ni2+-сефарозой.

Полученные данные позволяют заключить, что введение неканонических гистидиновых меток 3His1Gly3His и 3His3Gly3His сохраняет общую конформацию белка близкой к нативной и при этом придает белку аффинность к металл-хелатным смолам. Вероятно, включение подобных меток в состав полипептидной цепи можно расширить и на случаи других белков при необходимости их очистки в нативных условиях и невозможности применения классической полигистидиновой метки.

*Работа выполнена при частичной поддержке гранта на развитие генетических технологий (№ 075-15-2021-1071 от 28.09.21)*

**Литература**

1. Sharapova O. A., Yurkova M.S., Fedorov A.N. A minichaperone-based fusion system for producing insoluble proteins in soluble stable forms // Protein Engineering, Design & Selection. 2016. Vol. 29. No. 25. P. 57-64

2. Yurkova M. S. *et al.* Versatile format of minichaperone-based protein fusion system // Scientific Reports. 2019. Vol. 9. No. 1. P. 15063-1574.