

КЛОНИРОВАНИЕ И АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ СИНТЕТИЧЕСКИХ ГЕНОВ АПОЛИПОПРОТЕИНА А-I ЧЕЛОВЕКА В КЛЕТКАХ *ESCHERICHIA COLI* И МЕТИЛОТРОФНЫХ ДРОЖЖЕЙ *PICHIA PASTORIS*

Алексей Львович МАМАЕВ, Анатолий Борисович БЕКЛЕМИШЕВ

ФГБУ НИИ биохимии СО РАМН
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

В работе проведено клонирование и изучена экспрессия синтетических генов белка апо А-I человека в метилотрофных дрожжах *Pichia pastoris* X-33 и в клетках *E. coli* Rosetta 2(DE3). Показано, что в клетках дрожжей экспрессия гена белка апо А-I сопровождается лизисом клеток и накоплением в культуральной жидкости непротессированного белка апо А-I, что связано, вероятно, с его амфифильными свойствами. Экспрессия гена зрелого белка апо А-I в клетках *E. coli* позволяет получить целевой белок, при этом выход апо А-I составляет 50 мг/л культуры. По своему размеру и способности реагировать с антисывороткой к нативному апо А-I рекомбинантный полипептид соответствует нативному белку.

Ключевые слова: Клонирование, экспрессия генов, аполипопротеин А-I, *Pichia pastoris* X-33, *E. coli* Rosetta 2(DE3), рекомбинантный белок, аффинная очистка.

Аполипопротеин А-I (апо А-I) человека является главным белком плазмы крови, участвующим в образовании липопротеинов высокой плотности (ЛПВП). Апо А-I состоит из одной полипептидной цепи из 243 аминокислотных остатков, его молекулярная масса составляет 28,3 кДа [12, 13]. Как главный структурный белок частиц ЛПВП, апо А-I является многофункциональным обменным протеином и имеет широкий спектр физиологических функций. Апо А-I участвует в регуляции метаболизма холестерина, а также регулирует уровень липидов в крови. Апо А-I обладает противовоспалительными, антиокислительными и противоопухолевыми свойствами [3, 9]. Недавно на поверхности гепатоцитов были идентифицированы рецепторы к апо А-I и ЛПВП [1, 7, 14]. Предполагается, что апо А-I может быть использован в качестве переносчика лекарственных средств к клеткам печени, что особенно важно для терапии рака печени.

Ранее единственным источником для получения препаратов апо А-I была человеческая сыворотка. Однако выделение и очистка апо А-I из сыворотки крови – достаточно сложная, трудоемкая и дорогостоящая процедура при небольшом выходе белка. Для крупномасштабной наработки апо А-I человека в исследовательских и, тем более, в терапевтических целях более перспективным подходом представляется получение апо А-I генно-инженерными методами. Известны попыт-

ки наработки рекомбинантного апо А-I в клетках *E. coli* [2, 8, 11], в клетках яичника китайского хомячка (СНО) [5, 6], а также в клетках насекомых (бакуловирусная система экспрессии) [10, 15]. Ни в одной из названных гетерологичных систем экспрессии не был достигнут высокий уровень синтеза рекомбинантного апо А-I.

В последние годы начала широко использоваться система экспрессии гетерологичных генов в метилотрофных дрожжах *Pichia pastoris*, которая позволяет получать большие количества целевых белков, секретируемых в культуральную среду, практически не загрязненную секретируемыми белками дрожжей [4]. Целью настоящего исследования было получение рекомбинантных штаммов *P. pastoris* и *E. coli*, продуцирующих апо А-I человека.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Реактивы. Акриламид, N,N'-метилен-бисакриламид, додецилсульфат натрия (SDS), персульфат аммония, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин, бромфеноловый синий, 2-меркаптоэтанол, ЭДТА, канамицин, агароза, изопропил-β-D-1-тиогаляктопиранозид (ИПТГ) корпорации «Sigma-Aldrich» (США). Дрожжевой экстракт, бакто-триптон, агар фирмы «Difco» (Великобритания). Ni-NTA-сефароза 6B-CL, набор для выделения ДНК из агарозного геля фирмы «Qiagen»

(США). Набор для быстрого лигирования фрагментов ДНК с применением ДНК-лигазы фага T4 фирмы «Thermo Scientific» (США). Трихлоруксусная кислота, фенол, хлороформ, этиловый, изоамиловый и изопропиловый спирты, кислоты, щелочи, соли квалификации «ХЧ» или «ОСЧ» производства «Реахим» (Россия). Эндонуклеазы рестрикции XhoI, SalI, NdeI, BstXI – от компании «Сибэнзим» (РФ, Новосибирск).

Микроорганизмы. Штаммы *E. coli*: BL 21 (DE3) $\{F^- ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B^- m_B^-) \lambda(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])\}$, NovaXGF' Zappers™ $\{mcrA \Delta(mcrC-mrr) endA1 recA1 \phi 80dlacZDM15 DlacX74 araD139 \Delta(ara-leu)7697 galU galK rpsL nupG \lambda^- tonA F^+[lacI^q Tn10] (Tet^R)\}$, поставленные фирмой EMD Biosciences (Германия) и Rosetta 2(DE3) $\{F^- ompT hsdS_B(r_B^- m_B^-) gal dcm (DE3) pRARE2 (Cam^R)\}$ фирмы Novagen (Германия). Штамм метилотрофных дрожжей дикого типа *P. pastoris* X-33 фирмы Invitrogen (США).

Плазмиды, гены. В работе использовались вектор pPICZαA, предназначенный для клонирования и экспрессии генов в клетках *P. pastoris* (Invitrogen), и три отличающихся по нуклеотидной последовательности варианта синтетического гена зрелого апо А-I человека в составе коммерческой плазмиды pJ201 фирмы DNA2.0 (США). Условные обозначения генов: ApoA1_1946/1, ApoA1_1946/21 и ApoA1_1946/15.

Клетки *E. coli* выращивали в среде LB (0,5 % дрожжевого экстракта, 1 % триптона и 0,5 % NaCl). Электрокомпетентные клетки этих штаммов трансформировали плазмидой и проводили отбор клонов на агаризованной среде LB (0,5 % дрожжевого экстракта, 1 % триптона, 0,5 % NaCl и 2 % агарозы) с антибиотиком канамицином (30 мкг/мл). Дрожжи *P. pastoris* выращивали в жидкой среде YPD (2 % пептона, 1 % дрожжевого экстракта и 2 % глюкозы) или агаризованной среде YPD (2 % пептона, 1 % дрожжевого экстракта, 2 % глюкозы и 2 % агарозы) без селективного антибиотика или с добавкой селективного антибиотика зеоцина (Invitrogen).

Конструирование рекомбинантных штаммов *P. pastoris* – продуцентов апо А-I. Каждый из двух вариантов гена зрелого апо А-I (1 и 21) был вырезан из плазмид pJ201:ApoA1_1946/1 и pJ201:ApoA1_1946/21 по сайтам рестрикции XhoI и SalI и встроен в плазмиду pPICZαA по тем же сайтам рестрикции при помощи ДНК-лигазы фага T4. Полученными лигазными смесями были трансформированы компетентные клетки NovaXGF' Zappers™, затем при помощи ПЦР отобраны клоны, содержащие плазмиды со вставками целевых генов. Выделены и наработаны в препаративных количе-

ствах две плазмиды: pPICZαA:ApoA1_1946/1 и pPICZαA:ApoA1_1946/21. Полученные плазмиды были гидролизованы рестриктазой BstXI и использованы для трансформации компетентных клеток *P. pastoris* X-33 посредством электропорации. Немедленно добавляли 1,0 мл стерильного охлажденного на льду 1М сорбитола, разбавленные клетки переносили в подготовленную стерильную пробирку. Инкубировали пробирку при 30 °С в течение 30 мин без встряхивания; добавляли 1,0 мл 1М сорбитола и продолжали инкубирование еще в течение часа. Высеивали на чашки с агаризованной YPD с высокой концентрацией зеоцина (2 мг/мл) и инкубировали в течение 72 ч при 30 °С. Было получено около 30 колоний каждого варианта с высокой устойчивостью к зеоцину. Клетки из этих колоний были проверены на предмет встройки гена апо А-I при помощи ПЦР.

Аналитическая наработка рекомбинантного апо А-I в клетках *P. pastoris*. Клетки из отдельных колоний высеивали в пробирки с 5 мл бессолевого среды LB с 1 % глицерина (1 % дрожжевого экстракта, 2 % пептона, 1 % глицерина) и инкубировали при 30 °С на орбитальном шейкере в течение 2-х суток. Затем проводили индукцию в течение 3-х суток, добавляя в пробирки 10 % метанол до конечной концентрации 0,5 % через каждые 24 ч. Клетки осаждали центрифугированием, супернатанты анализировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (PAGE). Пробы предварительно концентрировали в 10 раз, осаждая белки трихлоруксусной кислотой. Пробы для вестерн-блота наносили без концентрирования.

Конструирование рекомбинантного штамма *E. coli* – продуцента апо А-I. Плаزمида pJ201:ApoA1_1946/15 содержала ген предшественника человеческого апо А-I, оптимизированный для экспрессии в системе *P. pastoris*. При помощи двухраундовой ПЦР с праймерами PR 327 5'-CCATATGGACGAACCTCCTCAATCTCCTTG-3' (прямой праймер для первого раунда), PR 328 5'-GGAATGCCATATGGACGAACCTCCTC-3' (прямой праймер для второго раунда), обратного праймера PR 329 5'-GATGTTTCGCGAGCTGCTGAATTC-3' и высокоточной термостабильной ДНК-полимеразы Phusion («Thermo Scientific») был наработан ампликон гена зрелого апо А-I с достроенными на 5'- и 3'-концах гена сайтами рестрикции NdeI и SalI соответственно. Ампликон (1 мкг) был гидролизован соответствующими рестриктазами, очищен фенол-хлороформной экстракцией и осажден этанолом. Экспрессирующая плаزمида pJExpress401 (DNA2.0) была обработана рестриктазами NdeI и XhoI, необходимый фраг-

мент выделен из агарозного геля и очищен набором «Qiagen». Лигирование гидролизованных рестриктазами плазмидной ДНК и ампликона гена зрелого апо А-I проводили Т4-лигазой, затем фермент инактивировали, лигазную смесь диализовали и проводили электропорацию компетентных клеток *E. coli*. ПЦР-анализ ДНК из полученных клонов показал наличие вставки целевого гена. Была наработана и выделена плаزمида рJExpress401:АроА1_1946/15. Далее проводили анализ экспрессии клонированного гена в полученных клонах. Ночной культурой, выращенной из единичной колонии, инокулировали пробирку с 5 мл среды LB с канамицином и растили культуру при 37 °С и 120 об/мин на орбитальном шейкере до оптической плотности OD = 1. Затем вносили ИПТГ до конечной концентрации 1 мМ и продолжали культивирование в течение ночи при 30 °С и 120 об/мин. Клетки осаждали центрифугированием, супернатант отбрасывали, к осадкам добавляли по 70 мкл 1х электродного буфера, 20 мкл 4х загрузочного буфера, инкубировали при 100 °С 5 минут и наносили на гель SDS-PAGE по 15 мкл.

Препаративная наработка апо А-I в клетках *E. coli*. Клетки *E. coli* штамм Rosetta 2(DE3), содержащие плазмиду рJExpress401:АроА1_1946/15, выращивали в колбах, содержащих 500 мл среды LB с канамицином и хлорамфениколом, на качалке при 37 °С и 120 об/мин до оптической плотности OD₆₀₀ = 0,6, затем вносили ИПТГ до конечной концентрации 2 мМ и проводили индукцию в течение 3-х часов при 30 °С.

Очистка в нативных условиях. Клетки после индукции собирали центрифугированием, ресуспендировали в буфере «А» (250 мМ NaH₂PO₄, рН 8,0, 0,25 М NaCl), озвучивали при 0 °С 8 раз по 30 с, полученный лизат центрифугировали 15 мин (15000 g, 4 °С), супернатант инкубировали при комнатной температуре с 2 мл смолы Ni-NTA, уравновешенной буфером «А», при перемешивании в течение 30 мин. Смолу промывали 10 мл буфера «А», содержащего 50 мМ имидазола, затем переносили смолу на колонку и элюировали фермент буфером «А», содержащим 250 мМ имидазола, собирая фракции по 500 мкл. Затем фракции анализировали электрофорезом по Лэммли (SDS-PAGE), фракции, содержащие целевой белок, объединяли, раствор белка диализовали против воды.

Электрофоретический анализ белка. Электрофорез по Лэммли проводили в 13 % PAGE с последующим окрашиванием кумасси G250.

Вестерн-блот. Рекombинантный белок апо А-I анализировали вестерн-блоттингом. Белки разделяли в SDS-PAGE, переносили на поливини-

лиденфторидную мембрану, блокировали 5%-м обезжиренным молоком в 0,1М Трис-НСI буфере. Первичные поликлональные антитела (кроличьи IgG к человеческому апо А-I, любезно предоставленные Л.М. Поляковым) были использованы для детекции рекомбинантного апо А-I. Вторичные антитела, меченные пероксидазой хрена, были использованы для детекции кроличьих IgG. Блот окрашивали 4-хлор-1-нафтолом с H₂O₂ в 0,1М Трис-НСI буфере.

Определение концентрации белка проводили флуоресцентным методом при помощи прибора Qubit® (Invitrogen).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Конструирование рекомбинантного штамма *E. coli* – продуцента апо А-I. Синтетический ген АроА1_1946/15 с С-концевым участком, кодирующим шестигистициновую аминокислотную последовательность, оптимизированный по встречаемости кодонов для экспрессии в клетках *P. pastoris*, клонирован в составе коммерческого экспрессирующего прокариотического вектора рJExpress401. На основе специального штамма *E. coli* Rosetta 2(DE3), предназначенного для экспрессии генов чужеродных белков, и полученной рекомбинантной плазмиды рJExpress401:АроА1_1946/15 сконструирован штамм-продуцент апо А-I. На рис. 1 показана электрофореграмма фракций, полученных при очистке рекомбинантного апо А-I с помощью двойной аффинной хроматографии на Ni-NTA-сефарозе 6В-CL в нативных условиях. Необходимо отметить, что как нативный апо А-I человека, так и рекомбинантные формы зрелого апо А-I имеют аномальную электрофоретическую подвижность в SDS-PAGE и находятся на уровне примерно 22 кДа. На рисунке можно видеть, что в процессе аффинной хроматографии рекомбинантного апо А-I из цитоплазматической фракции штамма *E. coli* Rosetta 2(DE3), несущего плазмиду рJExpress401:АроА1_1946/15, достигается удовлетворительная очистка целевого белка. Рекombинантный апо А-I связывается с антителами к апо А-I человека и имеет такую же молекулярную массу. Количественная наработка рекомбинантного апо А-I и дальнейшая его аффинная очистка дает выход чистого белка около 50 мг/л культуры.

Конструирование рекомбинантных штаммов *P. pastoris* – продуцентов апо А-I. Сконструированы две плазмиды с двумя вариантами гена зрелого человеческого апо А-I, рPICZαА:АроА1_1946/1 и рPICZαА:АроА1_1946/21; ими трансформированы клетки *P. pastoris* штамм X-33

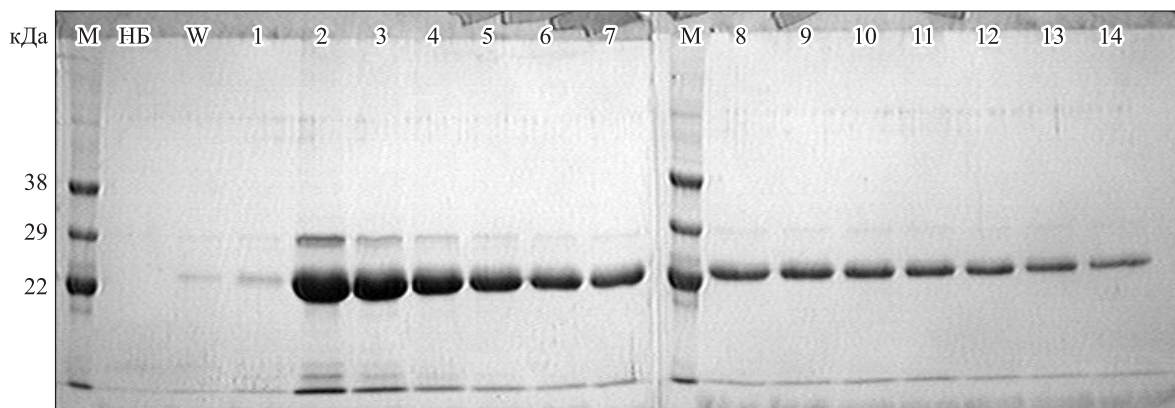


Рис. 1. Электрофореграмма фракций, полученных при аффинной очистке на колонке с Ni-NTA-сефарозой 6B-CL рекомбинантного апо А-I человека, наработанного в клетках *E. coli*. Дорожки: М – маркер молекулярных масс; 1–14 – номера фракций, полученных при элюции

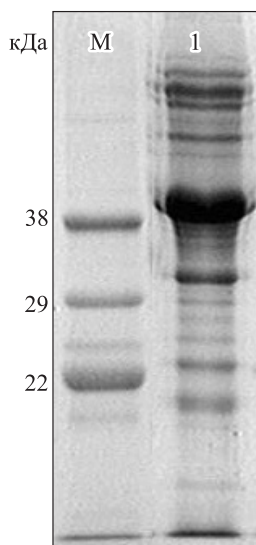


Рис. 2. Электрофореграмма белков, присутствующих в культуральной среде после индукции метанолом клеток *P. pastoris*, трансформированных плазмидой pPICZαA: ApoA1_1946/21. Дорожки: М – маркер молекулярных масс белков; 1 – клон № 8

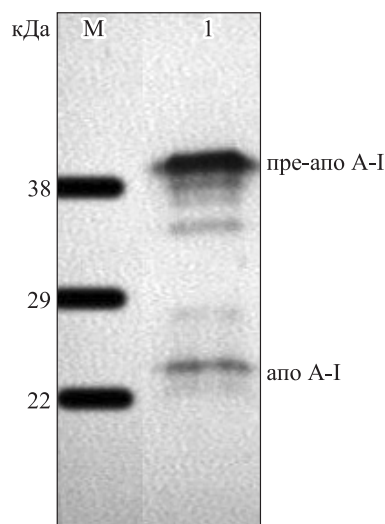


Рис. 3. Вестерн-блот анализ исследуемых образцов на присутствие в них апо А-I человека. Дорожки: М – маркер молекулярных масс белков; 1 – блот белков культуральной жидкости индуцированного клона № 8 *Pichia pastoris*. Справа указаны положения зрелой (апо А-I) и непротессированной (пре-апо А-I) форм апо А-I

и отобраны клоны, имеющие наиболее высокую устойчивость к зеоцину, а значит, и наибольшее количество копий гена апо А-I [4]. Анализ клонов при помощи ПЦР показал наличие встройки гена апо А-I в геномную ДНК клеток *P. pastoris*. При анализе клонов, содержащих оба варианта гена зрелого белка апо А-I, отобран единственный клон № 8, содержащий вариант гена ApoA1_1946/21, клетки которого, судя по результатам электрофоретического анализа, в процессе индуцируемого культивирования лизируются с выходом в культуральную среду наряду с собственными белками зрелой и непротессированной форм реком-

бинантного апо А-I человека с молекулярными массами ~23 и ~40 кДа соответственно (рис. 2). Вестерн-блот показал, что рекомбинантные формы апо А-I (зрелый и непротессированный) связываются с антителами, полученными к нативному апо А-I человека (рис. 3). Мы предполагаем, что это связано с высокой мембранотропностью рекомбинантного амфифильного белка. Связывание рекомбинантного апо А-I с мембраной дрожжевой клетки может, вероятно, приводить либо к лизису клеток, либо к нарушению каких-либо функций цитоплазматической мембраны и гибели клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Получены штаммы *P. pastoris* и *E. coli*, способные экспрессировать клонированные в них гены зрелого апо А-I человека.

2. Рекомбинантные формы апо А-I, полученные в клоне 8 *P. pastoris*, по своим размерам соответствуют пре-апо А-I и зрелому апо А-I человека и реагируют с антителами к нативному апо А-I человека.

3. Рекомбинантный белок, полученный экспрессией синтетического гена зрелого апо А-I человека в клетках *E. coli*, как по антигенным свойствам, так и по молекулярной массе, с учетом размера С-концевого шестистигидинового тракта, соответствует зрелой форме апо А-I человека.

4. Сконструированные штаммы *E. coli* и *P. pastoris*, продуцирующие рекомбинантный зрелый апо А-I человека, по-видимому, могут быть использованы для получения препаратов апо А-I человека, которые могут найти применение как в биологических исследованиях, так и в практической медицине для лечения атеросклероза и в качестве транспортеров лекарственных средств.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Acton S., Rigotti A., Landschulz K.T. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor // Science. 1996. 271. 518–520.

2. Bergeron J., Frank P.G., Emmanuel F. Characterization of human apolipoprotein A-I expressed in *Escherichia coli* // Biochim. Biophys. Acta. 1997. 1344. 139–152.

3. Brouillette C.G., Anantharamaiah G.M., Engler J.A. Structural models of human apolipoprotein A-I: a critical analysis and review // Biochim. Biophys. Acta. 2001. 1531. 40–46.

4. Cregg J.M. Distinctions between *Pichia pastoris* and other expression systems // Methods Mol. Biol. 2007. 389. 1–10.

5. Hartmut H.J., Janine J.G., Regina H. Expression and purification of recombinant human apolipoprotein A-I in Chinese hamster ovary cells // Protein Expr. Purif. 1997. 10. 226–236.

6. Mallory J.B., Kuser P.J., Protter A.A. Expression and characterization of human apolipoprotein A-I in Chinese hamster ovary cells // J. Biol. Chem. 1987. 262. 4241–4247.

7. Martines L.O., Jacquet S., Esteve J.P. Ectopic b-chain of ATP synthase is apolipoprotein A-I receptor in hepatic HDL endocytosis // Nature. 2003. 421. 75–79.

8. Mcguire K.A., Davidson W.S., Jonas A. High yield overexpression and characterization of human recombinant proapolipoprotein A-I // J. Lipid Res. 1996. 37. 1519–1528.

9. Michael J.H., Mohammad H., Areyoud M. Suppression of apolipoprotein A-I gene expression in HepG2 cells by TNF and IL-1 // Biochim. Biophys. Acta. 2003. 1623. 120–128.

10. Pyle L.E., Fidge N.H., Barton P.A. Production of mature human apolipoprotein A-I in a Baculovirus-insect cell system: pro-peptide is not essential for intracellular processing but may assist rapid secretion // Anal. Biochem. 1997. 25. 253–258.

11. Robert O.R., Trudy M.F., Michael N.O. Optimized bacterial expression of human apolipoprotein A-I // Protein Expr. Purif. 2003. 27. 98–103.

12. Scanu A.M., Edelstein C., Keim P. Serum lipoproteins // The Plasma Proteins. Vol. 2. Ed. F. Puntam. N. Y.: Acad. Press, 1975. 317–391.

13. Vitello L.B., Scanu A.M. Studies on human serum high density lipoproteins: self-association of apolipoprotein A-I in aqueous solutions // J. Biol. Chem. 1976. 251. 1131–1136.

14. Wei Q., Wu M.P., Chen P.F. Cooperation of HDL receptor and hepatic lipase in the selective uptake of HDL2-CE by rat hepatic sinusoidal cells // Acta Biochim. Biophys. Sin. 1996. 28. 659–664.

15. Zhu Y.E., Xu H.B., Zhao Zh.A. Expression of human apolipoprotein A-I in Baculovirus-insect cell system // Chin. J. Biotechnol. 2003. 19. 692–697.

CLONING AND ANALYSIS OF EXPRESSION OF SYNTHETIC HUMAN APOLIPOPROTEIN A1 GENES IN *ESCHERICHIA COLI* AND METHYLOTROPHIC YEASTS *PICHIA PASTORIS*

Alexey L'vovich MAMAEV, Anatoly Borisovich BEKLEMISHEV

*Institute of Biochemistry of SB RAMS
630117, Novosibirsk, Timakov str., 2*

The expression of synthetic genes of human ApoA-I protein in the methylotrophic yeasts *Pichia pastoris* X-33 and *E. coli* Rosetta 2(DE3) cells were studied. It is shown that expression of the ApoA-I genes in yeast cells is accompanied by cell lysis and accumulation of unprocessed ApoA-I protein in the growth medium, which is probably due to the amphiphilic properties of the protein. Expression of ApoA-I gene in *E. coli* Rosetta™ (DE3) cells provides the protein of interest with the yield of 50 mg/l. Recombinant polypeptide reacts with antibodies against native human ApoAI and has close molecular weight as native protein.

Key words: cloning, gene expression, apolipoprotein A-I, *Pichia pastoris* X-33, *E. coli* Rosetta 2(DE3), recombinant protein, affinity purification.

*Mamaev A.L. – researcher of the genetic engineering laboratory, e-mail: alexeymamaev@inbox.ru
Beklemishev A.B. – doctor of biological sciences, professor, head of the genetic engineering laboratory,
e-mail: beklem@niibch.ru*