

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 612.015.1:577.152.08

© Коллектив авторов

ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА РЕКОМБИНАНТНОГО “УСЕЧЕННОГО” (Δ2-27) ЦИТОХРОМА P450 2B4, ЭКСПРЕССИРОВАННОГО В КЛЕТКАХ *E.coli* В СОСТАВЕ ГИБРИДНОГО БЕЛКА С ГЛУТАТИОН-S-ТРАНСФЕРАЗОЙ

Н.Н. СОКОЛОВ, С.С. АЛЕКСАНДРОВА., Н.М. ОМЕЛЬЯНЮК.,
И.Д. КИРСАНОВА., И.В. ЧУПЫРИНА., Л.И. СОЛОДАРЬ, А.И. АРЧАКОВ.

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии РАМН, 119832
Москва, Погодинская ул., 10; Телефон/факс (095) 246-33-75, 245-08-57
Электронная почта: sokolov@medic.ibmh.msk.su

Описывается модификация метода Coop и Pernecky (Meth. Enzymol., 1996, 272, 25-34) получения очищенного препарата рекомбинантного “усеченного” (Δ2-27) цитохрома P450 2B4, экспрессированного в клетках *E.coli* в составе слитого белка с глутатион-S-трансферазой. Модификации метода касались условий реакции протеолиза химерного белка тромбином, удаления примесей этой протеазы из очищенных препаратов цитохрома путем колоночной хроматографии на оксиапатите, введения этапа получения сферопластов с использованием лизоцима, условий стабилизации фермента в процессе очистки и хранения. Препарат рекомбинантного цитохрома получен с выходом 20% и уд.содержанием цитохрома P450 около 14,5 нмоль/мг белка. Метод перспективен для препаративного выделения высокоочищенных препаратов цитохрома P450, необходимых для изучения структурно-функциональных взаимоотношений этого гемопротейна с белками-партнерами и исследования его структуры и механизма действия.

Ключевые слова: цитохром P450 2B4 (Δ2-27), гибридные белки, гетерологическая экспрессия в *E.coli* цитохрома P450, глутатион-S-трансфераза, тромбин.

ВВЕДЕНИЕ. Цитохром P450-содержащие монооксигеназные системы человека и животных играют ключевую роль в гидроксировании и метаболических превращениях как эндогенных (холестерин, стероидные гормоны, жирные кислоты, простагландины и др.), так и экзогенных (ксенобиотики, токсины, канцерогены и др.) соединений [1]. Для понимания механизма действия цитохромов P450 и их структурно-функциональных взаимоотношений с белками-партнерами (NADPH-цитохром P450 редуктаза, цитохром *b₅*) необходимы ясные представления о трехмерной структуре эукариотических цитохромов P450. В этом отношении лимитирующим фактором является отсутствие препаративных количеств гомогенных (кристаллических) препаратов данных белков, обусловленное трудностью получения этих интегральных мембранных белков эндоплазматического ретикулума. С помощью генно-инженерных манипуляций рядом исследователей были получены “усеченные” формы ряда цитохромов, к примеру, P450 2B4 (Δ2-27) [2] и 2E1 (Δ3-29) [3], произведены замены ряда гидрофобных аминокислот на гидрофильные в области N-концевого

гидрофобного сегмента цитохрома P450 [4]. В результате были получены штаммы-продуценты, обеспечивающие высокий уровень экспрессии рекомбинантных эукариотических цитохромов P450, и разработаны способы выделения этих белков в препаративных количествах [5-9]. В частности, для получения "усеченного" ($\Delta 2-27$) цитохрома P450 2B4 печени кролика Pernecky et al. сконструировали экспрессионный вектор, в котором ген цитохрома P450 2B4 слит через сайт расщепления для тромбина с геном, кодирующим глутатион-S-трансферазу (GST) [4,10]. Целью настоящей работы являлась разработка эффективного способа выделения высокоочищенного препарата этого цитохрома, экспрессированного в клетках *E.coli* в составе химерного белка с GST.

МЕТОДИКА Рекомбинантный штамм продуцент *E.coli* MV 11304 гес \bar{A} производное JM 105, трансформированный вектором pGEX-KT-2B4 ($\Delta 2-27$), был любезно предоставлен проф. Сооп (США). Конструкция экспрессионного вектора описана в работах [4, 10, 11]. Для получения химерного белка засеивали единичную колонию в 50 мл среды LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина. Культуру выращивали в течение ночи при 37° С. Ночную культуру переносили в 5 л среды TB [12] с ампициллином (100 мкг/мл) и выращивали в ферментере Ultraferm 11601 ("LKB", Швеция) при 37° С и 125-130 оборотах мешалки до достижения оптической плотности культуры $A_{600} = 0,8-1,0$ о.е. После этого добавляли индуктор *lac* оперона IPTG до конечной концентрации 1 мМ и ферментацию продолжали в течение 48 ч при температуре 28° С. Клетки собирали центрифугированием при 4 000 g, отмывали два раза от среды холодным 0,01 М трис-НСl буфером, рН 8,0 и хранили при -70° в течение 2-4 недель, при этом активность цитохрома P450 существенно не снижалась.

Электрофорез белков проводили по методике [13] в 12% ПААГ с 0,1% SDS.

Содержание активного цитохрома P450 в интактных клетках и во фракциях по ходу очистки определяли спектрофотометрически после восстановления дитионитом натрия и насыщения образца окисью углерода и рассчитывали исходя из коэффициента молярного поглощения 91 мМ⁻¹·см⁻¹ по формуле, предложенной в работе [14]. Для регистрации дифференциальных спектров использовали спектрофотометр Hitachi 557 в режиме автоматической коррекции базовой линии.

Модифицированный нами метод Сооп and Pernecky включает следующие этапы: (все операции по очистке белка проводятся при температуре + 4° С).

Получение фракции солиобилизованного цитохрома P450. Клетки, собранные с 2 л культуры ($\cong 10$ г), суспендировали в 150 мл 100 мМ трис-ацетатного буфера (рН 7,6), содержащего 500 мМ сахарозы и 0,5 мМ ЭДТА. Суспензию разбавляли равным объемом холодной H₂O и добавляли лизоцим (0,1 мг/мл). Полученную суспензию осторожно встряхивали в течение 30 мин, сферопласты собирали центрифугированием (4 000 g, 20 мин) и ресуспендировали в 100 мМ трис-НСl буфере (рН 7,4), содержащем 20% глицерин (об/об), 0,1 мМ ДТТ, 0,5 мМ ЭДТА и 1 мМ PMSF (буфер А). После этого клетки разрушали ультразвуком (30 с x 2) на дезинтеграторе MSE 150 WT (Англия). Цитохром солиобилизовали добавлением по каплям при перемешивании 20%-ного раствора эмульгена 913 до конечной концентрации 1%. Суспензию перемешивали в течение 60 мин и центрифугировали (10 000 g, 30 мин). Для получения солиобилизованной мембранной фракции, имеющую коричневатую-красный цвет надосадочную жидкость центрифугировали при 150 000 g в течение 60 мин.

Аффинная хроматография химерного белка на колонке с GSH-агарозой Надосадочную жидкость наносили на колонку (1,6x8 см) с GSH-агарозой (20 нмоль/мл смолы), уравновешенную буфером А, содержащим 0,3% эмульгена 913 и 120 мМ NaCl (буфер Б). После промывания колонки 10 объемами буфера Б гибридный белок элюировали восстановленным глутатионом (GSH; конечная концентрация 20 мМ) в буфере Б. Фракции с активностью цитохрома P450

диализовали в течение ночи для удаления детергента и GSH против 100 мМ трис-НСI-буфера (рН 7,4), содержащего 120 мМ NaCl, 20% глицерина и 0,1 мМ ДТТ.

Расщепление гибридного белка тромбином Реакцию проводили в течение 1 ч при 37° С в присутствии 1 мМ CaCl₂ и соотношении тромбин-белок 1:50 (6-8 ед.активности тромбина/1 нмоль P450). Протеолиз останавливали добавлением в пробу PMSF до конечной концентрации 1 мМ.

Удаление GST и нерасщепленного белка Препарат цитохрома P450 после гидролиза тромбином наносили на вторую колонку с GSH-агарозой (1,6x8 см), уравновешенную 10 мМ калий-фосфатным буфером рН 7,3, содержащим 0,5 мМ ДТТ, 1 мМ ЭДТА и 20% глицерина и собирали несорбированный на колонке материал.

Освобождение от тромбина Для этого активные фракции наносили на колонку с оксиапатитом (1,6x3 см), уравновешенную 10 мМ калий-фосфатным буфером рН 7,3, содержащим 0,5 мМ ДТТ, 1 мМ ЭДТА и 20% глицерина, и цитохром элюировали как описано ниже.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ Ранее Coon and Pernecky [4, 10] разработали способ получения очищенных препаратов цитохрома P450 2B4 (Δ 2-27), основанный на протеолизе гибридного белка GST-P450 2B4 (Δ 2-27) тромбином и аффинной очистке цитохрома на колонке с GSH-агарозой. Метод позволяет получать препараты "усеченного" цитохрома P450 с уд. активностью около 6 нмоль P450/мг белка (уд. активность гомогенного препарата фермента примерно 16-18 нмоль P450/мг белка). В процессе выделения цитохрома P450 по описанному методу нами был выявлен ряд существенных моментов, которые были либо опущены, либо им не было придано серьезного внимания. Между тем без их учета невозможно получить с высоким выходом достаточно очищенный препарат целевого белка для иммунизации животных, изучения механизма катализируемой цитохромом P450 реакции, кристаллизации, структурных исследований и др. целей. Это касается главным образом стадии расщепления гибридного белка тромбином (условия протеолиза, терминация реакции, удаление примеси тромбина из очищенных препаратов цитохрома). Кроме того, нами введены этап получения сферопластов с использованием лизоцима, ультразвуковая дезинтеграция клеток (взамен разрушения клеток на Френч-прессе), добавление в буферные смеси ДТТ, ЭДТА и PMSF с целью стабилизации активности фермента при очистке и хранении, дана количественная характеристика способа очистки, не отраженная в указанных выше работах.

Подробно этапы очистки рекомбинантного цитохрома P450 изложены в разделе "Методика". Здесь необходимо остановиться на существенных модификациях, внесенных нами в метод Coon and Pernecky

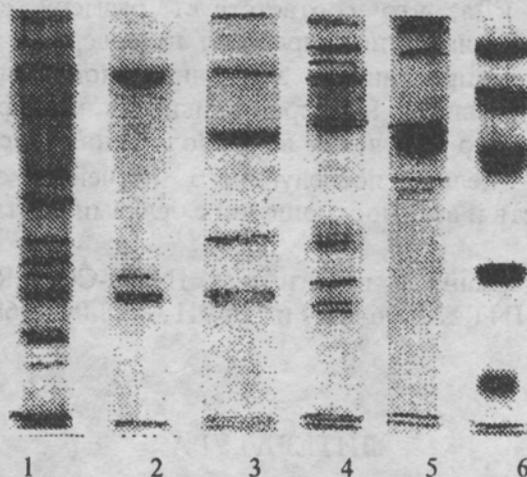
В имеющихся в литературе работах по культивированию рекомбинантных штаммов-продуцентов цитохромов P450 используются периодические культуры, выращиваемые в эрленмейровских колбах. Между тем, для препаративного получения этих белков необходимы большие количества биомассы, доступные при выращивании культур в ферментере. Поэтому, нами были подобраны оптимальные условия для накопления цитохрома P450 в бактериальных клетках при инкубации культуры *E.coli* в реакторе. При культивировании штамма-продуцента в течение 38-40 ч (после индукции IPTG) на среде ТВ при температуре 28° С и аэрации 0,25 объема воздуха на 1 объем среды в мин уровень экспрессии гемопротеина достигал 220-250 нмоль P450 на 1 л культуральной жидкости (примерно 15 мг чистого белка), что является вполне достаточным для целей препаративного выделения. Спектрофотометрический анализ содержания цитохрома P450 в бактериальных клетках свидетельствует о практическом отсутствии в них неактивной формы P420. Следует отметить, что мы проводили ферментацию культуры без добавления в среду в качестве предшественника гема дорогостоящего импортного препарата α -аминолевулиновой кислоты. Вероятно,

высокий уровень экспрессии в наших условиях связан с проведенной оптимизацией условий культивирования штамма-продуцента.

С целью солюбилизации рекомбинантного цитохрома в мембранной фракции и для последующего использования в опытах по хроматографической очистке были проверены ряд детергентов (нонидет NP 40, тритон -N-101, CHAPS (3-[[cholamidopropyl]-dimethylammonio]-1-propane-sulfonate), эмульген 913, *n*-октил- β -D-глюкопиранозид, твин-20 и тритон WR 1339). Наилучший результат в плане выхода рекомбинантного белка получен при солюбилизации цитохрома эмульгеном 913 и CHAPS. Ввиду низкого содержания неактивной формы P420 в присутствии этих детергентов, мы не добавляли в рабочий буфер при очистке цитохрома стабилизирующий субстрат 4-метилпиразол.

При хранении в течение 10-14 дней в оптимальных условиях фракции частично очищенного препарата цитохрома P450, полученной после расщепления гибридного белка тромбином, наблюдалось резкое снижение содержания гемопротейна, сопровождавшееся уменьшением размеров соответствующей этому белку зоны при электрофорезе в ПААГ с SDS. Естественно было предположить, что это связано с протеолитическим действием тромбина, остающимся в препарате после гидролиза химерного белка. Для остановки реакции протеолиза нами был использован широко известный ингибитор сериновых протеаз PMSF, добавление которого в инкубационную пробу в конечной концентрации 1 мМ полностью подавляло протеолитическую активность тромбина.

Тромбин, вносимый в достаточно очищенный после первого этапа хроматографии на GSH-агарозе препарат цитохрома P450, представляет собой гетерогенную популяцию молекул, о чем свидетельствуют результаты электрофореза в SDS-ПААГ, где выявляется несколько белковых зон (рис). Для удаления тромбина мы использовали колоночную хроматографию на оксиапатите, широко применяемую при выделении и концентрировании очищенных препаратов цитохрома P450, а также для удаления примесей



Рисунок

Электрофорез в SDS-ПААГ препаратов цитохрома P450 на разных стадиях очистки.

1) лизат клеток после индукции IPTG (48 час выращивания); 2) фракция после хроматографии на первой колонке с GSH-агарозой; 3) фракция после удаления тромбина на колонке с оксиапатитом; 4) препарат тромбина; 5) эукариотический полноразмерный цитохром P450 2B4 из печени кролика; 6) маркеры молекулярных масс: фосфорилаза *b* (94 кДа), сывороточный альбумин быка (67 кДа), овальбумин (43 кДа), карбоангидраза (30 кДа) ингибитор трипсина из соевых бобов (20,1 кДа), α -лактальбумин (14,4 кДа).

детергентов [5-7, 15] После нанесения белковой фракции и промывания колонки рабочим буфером цитохром элюировали либо линейным градиентом концентрации калий-фосфатного буфера, либо ступенчато (0,2 М буфер). Как видно из представленной электрофореграммы, хроматография на оксиапатите

позволяет удалить основную массу примесных белков тромбина. В то же время, попытка использования для этой цели хроматографии на колонке с бензамидин-сефарозой 6В (сорбент специфически связывает протеазы) оказалась менее удачной. При элюции цитохрома Р450 с этого сорбента не происходило достаточно полного освобождения препарата цитохрома Р450 от примесей тромбина, а также наблюдалось значительное снижение выхода целевого белка.

В таблице приведены некоторые характеристики модифицированного нами метода получения очищенного препарата рекомбинантного цитохрома Р450. По уд. содержанию цитохрома Р450 (14,5 нмоль/мг белка) очищенный препарат имеет чистоту не менее 80% (рис, дорожка 3). По электрофоретической подвижности в SDS-ПААГ молекулярная масса рекомбинантного белка

Таблица. Характеристика способа очистки рекомбинантного цитохрома Р450

Стадия очистки	Белок (мг)	Р450 (нмоль)	Уд.содержание Р450 (нмоль/мг белка)	Выход (%)	Очистка (раз)
1. Бактериальные клетки	930	241,8	0,26	100	1
2. Солубилизованный материал	32,75	157,2	4,8	65	18,5
3. Фракция после хроматографии на 1-ой колонке с GSH-агарозой	11,1	113,6	10,2	47	39,2
4. Фракция после хроматографии на 2-ой колонке с GSH-агарозой	20,5	88	4,3*	36,4	16,6
5. Фракция после удаления тромбина хроматографией на оксиапатите и диализа	3,3	48	14,5	20	55,8

* Снижение уд. содержания цитохрома Р450 обусловлено добавлением препарата тромбина для расщепления гибридного белка.

составляет около 55 кДа, что соответствует размеру «усеченного» ($\Delta 2-27$) цитохрома. Кроме того, очищенный препарат не содержит примеси неактивной формы Р420. Выход гемопротейна на заключительном этапе очистки составил около 20%. Все это указывает на перспективность модифицированного нами метода для препаративного получения высокоочищенных препаратов цитохрома Р450 2В4 ($\Delta 2-27$) с целью последующего изучения его структурных и функциональных свойств и взаимоотношений с белками партнерами.

Работа поддержана грантами INCO-COPERNICUS (Contract №ERBIC15CT960810). INTAS№96-1549 и РФФИ № 98-04-48684

ЛИТЕРАТУРА

1. Archakov A., Bachmanova G. (1990) Cytochrome P450 and Active Oxygen London: Taylor & Francis.
2. Pernecky S.J., Larson J.R., Philpot R.M., Coon M.J. (1993). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90, 2651-2655.
3. Larson J.R., Coon M.J., Porter T.D. (1991). J. Biol. Chem. 266, 7321-7324.
4. Pernecky S.J., Coon M.J. (1996). Methods in Enzymology. 272, 25-34.
5. Lehnerer M., Schulze J., Petzold A., Bernhardt R., Hlavica P. (1995). Biochem. Biophys. Acta. 1245, 107-115.
6. Scheller U., Juretzek T., Schunck W.-H. (1996). Methods in Enzymology. 272, 65-75.
7. Guengerich F.P., Martin M.V., Guo Z., Chun Y.-J. (1996). Methods in Enzymology. 272, 35-44.

8. Лепешева Г.И., Усанов С.А. (1998). **63**, 265-276.
9. A.A.Zhgoon, V.E.Sidorovoch, M.A.Eldarov, E.A.Apletalina, N.N.Sokolov, W.H.Schunck, A.I.Archakov and K.G.Skryabin,. (1998). 12th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidation, Montpellier, France, abstract 131.
10. Pernecky S.J., Olken N.M., Bestervelt L.L., Coon M.J (1995). Arch. Biochem. Biophys. **318**, 446-456.
11. Hakes D.J., Dixon J.E. (1992). Anal. Biochem. **202**, 293-298.
12. Sambrook J.F., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.*
13. Laemmli U.K. (1970). Nature (London) **227**, 680-685.
14. Omura T., Sato R. (1967). Methods in Enzymology. **10**, 556-561.
15. Wada A., Waterman M.R. (1992). J. Biol. Chem. **267**, 22877-22882.

Поступила 17.12. 1998 г.

ISOLATION AND PURIFICATION OF TRUNCATED (Δ 2-27) RECOMBINANT FORM OF CYTOCHROME P450 2B4 EXPRESSED IN *E.coli* AS FUSION PROTEIN WITH GLUTATHIONE-S-TRANSFERASE

N.N.Sokolov, S.S.Alexandrova, N.M.Omelyanuk, I.D.Kirsanova,
I.V.Chupirina, L.I.Solodar' and A.I.Archakov

Institute of Biomedical Chemistry RAMS, Pogodinskaya 10, Moscow, 119832; Tel/fax (095) 246-33-75, 245-08-57; E-mail:sokolov@medic.ibmh.msk.su

This paper describes the modification of the method by Coon and Pernecky (Meth. Enzymol. 1996, **272**, 25-34) for purification of truncated (Δ 2-27) recombinant form of cytochrome P450 2B4 expressed in *E.coli* as fusion protein with glutathione-S-transferase. The modifications included optimisation of conditions for proteolytic reaction of fusion protein with thrombin, removal of this protease from purified cytochrome P450 preparations using column chromatography on hydroxyapatite, introduction of the additional step for obtaining of spheroplasts using of lysozyme, and optimisation of conditions for enzyme stabilisation during of its purification and storage. The overall yield of purified cytochrome was 20% and the specific content of P450 was 14,5 nmol/mg protein was measured. This method is suitable for large-scale isolation of high purified cytochromes P450 which are necessary for study of structure-functional relationships of this hemoprotein with protein partners as well as for investigation of its structure and mechanism of action.

Key Word: cytochrome P450 2B4 (Δ 2-27), fusion proteins, heterologous expression of cytochrome P450 in *E.coli*, glutathion-S-transferase, thrombin