

УДК 612.015.1:577.152.08

©Коллектив авторов

АССОЦИАЦИЯ ЦИТОХРОМА P450 2B4 С МОЛЕКУЛЯРНЫМИ ШАПЕРОНАМИ ПРИ ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ЭКСПРЕССИИ В *E.coli*

Т.В. ПРОЗОРОВСКИЙ¹, В.-Х. ШУНК², А.И. АРЧАКОВ¹

¹ Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, 119832 Москва, Погодинская ул., 10;
тел./факс (095)246-33-75, 245-08-57, эл. почта: PROZ@medic.ibmh.msk.su

² Центр Молекулярной Медицины Макса-Дельбрюка, Берлин, Германия

Для получения водорастворимой формы микросомального цитохрома P450 2B4 были созданы с помощью генетической инженерии несколько вариантов химерных белков с глутатион-S-трансферазой. В N-концевой район P450 2B4, лишенный сигнального якорного участка (2-27), были введены специфические аминокислотные последовательности (в позиции 46-49), узнаваемые протеолитическими ферментами (фактор Ха и тромбин). Предполагалось, что ограниченный протеолиз в данном районе даст возможность получить белок, лишенный гидрофобной N-концевой области (1-49). Однако, результаты показали, что выбранный район в P450 2B4 обладает устойчивостью к действию специфических протеиназ. Положительный результат был получен при проведении ограниченного протеолиза с IgA эндопротеиназой, узнающей нативную последовательность PPGP (31-34) в P450 2B4. Таким образом, впервые была получена укороченная форма цитохрома 2B4, лишенная 33 N-концевых аминокислотных остатка.

Обнаружено, что экспрессия генетически созданных вариантов GST-P450 2B4 в *Escherichia coli* сопровождается образованием прочного комплекса с молекулярными клеточными шаперонами GroEL и DnaK. Установлено, что диссоциация комплекса происходит после ограниченного протеолиза: в линкерной последовательности (позиция 6-7), соединяющей C-концевой район GST домена и N-концевой район P450 2B4, а также перед N-концевым метионином 2B4 и в позиции 33-34 (2B4). Полученные результаты дают основание предполагать, что взаимодействие с молекулярными шаперонами GroEL/DnaK, вероятно, является необходимым условием для фолдинга эукариотического цитохрома 2B4 в процессе его биосинтеза в *E.coli*.

Ключевые слова: P450 2B4, шапероны, DnaK, GroEL, химерный белок, глутатион-S-трансфераза

ВВЕДЕНИЕ Цитохромы P450 образуют обширное суперсемейство гемопротеинов [1]. Являясь компонентами монооксигеназных систем, они вовлечены в метаболизм широкого спектра эндогенных и экзогенных веществ [2]. У млекопитающих цитохромы P450 ответственны за окисление лекарств, канцерогенов, токсичных веществ, а также биосинтез стероидов и эйкозаноидов [3]. Большинство цитохромов P450 млекопитающих являются интегральными мембранными белками эндоплазматического ретикулума.

Они связаны с мембраной через N-концевую сигнальную последовательность, являющуюся якорной частью белка в мембране [7-11]. Каталитические функции выполняет цитозольный домен. Сигнальная последовательность играет важную роль при экспрессии белков в эукариотических клетках, но она не является необходимой при гетерологической экспрессии функциональных P450 млекопитающих в бактериальных клетках [12]. Выполняя функцию встраивания молекулы в мембрану, сигнальная последовательность, играет важную роль при сборке P450. По окончании фолдинга белка каталитическая активность не зависит от сигнальной части.

Одной из отличительных особенностей изолированных микросомальных P450 является их высокий уровень самоагрегации в растворе в отсутствие детергента, что приводит к потере функциональной активности. Использование липидов или детергентов восстанавливает ферментативную активность. Однако, их присутствие осложняет изучение каталитической активности и механизма белок-белковых взаимодействий в монооксигеназных системах [13], и кроме того, препятствуют получению белка в кристаллической форме.

Pernecky et al. [14] обнаружили, что N-концевой район P450 является одним из участков в белке, определяющим высокую склонность к агрегации молекул. Было установлено, что гидрофобный сегмент, который ответственен за связывание с мембраной, является так же районом, способствующим образованию агрегатов. Дальнейшие попытки получения водорастворимых мономерных форм P450 путем экспрессирования укороченных вариантов P450, лишенных N-концевого якорного района, в клетках млекопитающих [15], дрожжей [16] и бактериальных клетках [17,18] показали, что в микросомальных цитохромах существуют другие районы, участвующие в ассоциации с мембраной [14,19,20].

Используя различные биохимические подходы, мембранно-связывающие районы были определены в P450 2B4 печени кролика [21, 22].

Предполагается, что гидрофобный район, следующий непосредственно за N-концевой сигнальной последовательностью и не имеющий сходства с растворимыми бактериальными формами P450, может играть роль в связывании белка с мембраной и приводить к агрегации молекул в растворе [23]. Вместе с сигнальной последовательностью в P450 2B4 этот район составляет около 50 N-концевых аминокислотных остатка. Таким образом, можно предположить, что получение цитохрома, лишенного данного района будет способствовать снижению олигомеризационного состояния.

Основной задачей нашей работы являлось создание генетической конструкции для получения водорастворимой формы микросомального цитохрома P450 2B4, пригодной для последующей кристаллизации.

Цитохром P450 2B4 экспрессировали в виде химерного белка с глутатион-S-трансферазой (GST). Для эукариотических белков, плохо экспрессируемых в гетерологических системах, а также для простоты очистки целевого белка, использование химерных конструкций с глутатион-S-трансферазой нашло

широкое применение [24]. Данная система увеличивает растворимость отдельных белков и способствует повышению уровня экспрессии. Глутатион-S-трансфераза позволяет осуществлять аффинную очистку химерного белка с использованием глутатион-сефарозы, и может быть удалена протеолизом, благодаря встроенному тромбиновому сайту (табл.1).

Таблица 1. Конструкции P450 2B4.

Конструкция P450 2B4		Модификации в NH ₂ -концевой аминокислотной последовательности 2B4	
		S1	L1 S2
	1 10 20 30 40 50		
2B4(His) ₆	MEFSLLLLLA FLAGLLLLLF RGHHPKANGRL	PPGPSPLPVL GNLLQMDRKG LLR	
	1 10 →		
GST-(Δ2-27)2B4	GST...GGGGGRLVPR MAGRL	PPGPSPLPVL GNLLQIEGRG LLR*	
GST-(Δ2-27)2B4(gXa)(His) ₆	GST...GGGGGRLVPR MAGRL	PPGPSPLPVL GNLLQGGIEGRGG LLR*	
GST-(Δ2-27)2B4(Th)(His) ₆	GST...GGGGGRLVPR MAGRL	PPGPSPLPVL GNLVQGGMYPRGN LLR*	
GST-2E1:2B4(His) ₆	GST...GGGGGRLVPR MAWNL	PPGPFLPI I GNLVQGGMYPRGN LLR*	

Примечания: (·)-гидрофобные аминокислотные остатки. (S1 и S2) гидрофобные сегменты и промежуточный сегмент (L1) показаны над полноразмерной последовательностью 2B4. Район, выделенный курсивом, соответствует последовательности 2E1 в конструкции GST-2E1:2B4(His)₆. Полужирным шрифтом показаны специфические аминокислотные последовательности, узнаваемые соответствующими протеиназами: LVPR и MYPRGN -тромбиновые протеолитические сайты, PPGP-протеолитический сайт IgA-азы, IEGR-протеолитический сайт фактора Ха. Стрелка указывает N-концевой метионин 2B4, следующий за линкерной последовательностью состоящей из 5 глицинов и тромбинового сайта (1-10). Линкерная последовательность обеспечивает проведение ферментативного гидролиза пептидной связи между GST доменом и P450.

Были созданы конструкции для получения укороченной формы P450 2B4. Для введения протеолитических сайтов, дающих возможность отделить N-концевую гидрофобную область 2B4, был выбран участок 46-49. Данный район расположен непосредственно за гидрофобным сегментом (табл.1). В процессе работы, была также исследована возможность получения укороченной формы 2B4 за счет выявленной аминокислотной последовательности, являющейся специфичной для действия IgA эндопротеиназы (позиция 31-34) (табл. 1).

Уже на первых этапах работы, было обнаружено, что экспрессируемые химерные молекулы находятся в комплексе с другими высокомолекулярными белками. Результаты проведенных исследований позволили обнаружить ассоциацию химерных форм цитохрома 2B4 и молекулярных шаперонов GroEL и DnaK, что указывает на их возможное участие в фолдинге 2B4 при гетерологической экспрессии.

МЕТОДИКА. В работе использованы материалы и реактивы следующих фирм (представительства в Германии): дрожжевой экстракт, пептон и триптон для приготовления питательной среды *Escherichia coli* были приобретены в Serva и Difco; ампициллин, тиамин гидрохлорид, лизоцим (Serva); Δ-AJK и ИПТГ (ICN Biomedical Inc.); Chaps (Carl Roth. GmbH); эмульген 913 (Kao Corporation,

Япония); глутатион-сефароза 4B (Pharmacia Biotech AB); Ni²⁺-NTA смола, тромбин и фактор Ха (Sigma); материалы для Western Blot: хемилюминисцентный блоттинг-субстрат, Hyper Film™ ECL™ (Amersham Pharmacia Biotech, Англия), Roti Load (Carl Roth GmbH); рестрикционные эндонуклеазы, T4 ДНК лигаза и Taq ДНК полимеразы были приобретены в New England Biolabs (Англия); клеточная линия для экспрессии белка (Jm 109) была приобретена в Stratagene; IgA-эндопротеиназа (MoBiTec); набор для выделения плазмид и набор для экстракции ДНК из геля (Invitek GmbH). Синтез олигонуклеотидных праймеров был выполнен в BioTeZ GmbH.

Конструкции плазмид для экспрессии белка. На основе плазмиды pGEX-(Δ2-27)2B4, предоставленной лабораторией M.J. Coop (Мичиганский Университет, США) [14], и в результате работы по генетической инженерии P450 2B4 совместно с лабораторией «эндоплазматический ретикулум и P450» (МДЦБ Берлин, Германия) и лабораторией «Генной Инженерии» (Центр Биоинженерии, Москва, Россия), была получена плазмидная конструкция pGEX-(Δ2-27)2B4(gXa)(His)₆. Данная генетическая конструкция позволяет получать цитохром 2B4 с удаленной сигнальной последовательностью (Δ2-27) в виде химерного белка с GST доменом (табл.1). С-концевой район несет вставку из шести гистидиновых остатков, что дает возможность проводить очистку, используя металл хелатную хроматографию. Район 2B4 с 47 по 50 аминокислотный остаток (Met-Asp-Arg-Lys) был заменен последовательностью, узнаваемой фактором свертывания крови Ха (Gly-Gly-Ile-Glu-Gly-Arg-Gly, Ха сайт подчеркнут).

Дополнительная работа по созданию мутантных форм цитохрома P450 2B4 была выполнена с использованием технологии проведения кассетного мутагенеза. За счет создания точечных мутаций в плазмидной конструкции pGEX-(Δ2-27)2B4 было сконструировано два уникальных рестрикционных сайта для эндонуклеаз: BsrGI и AflII (рис.1). Полученная плазида служила основой для конструирования мутантных форм 2B4. Синтезированные полинуклеотидные линкеры, кодирующие заданные мутации вводились в плазмидную ДНК лиnearизованную с NotI и BsrGI/AflII эндонуклеазами. В результате были созданы плазмидные конструкции: pGEX-(Δ2-27)2B4Th(His)₆, позволяющая экспрессировать химерный цитохром с протеолитическим сайтом (положение в мутантном белке 45-52) для расщепления тромбином (GGMYPRGN) [26], и pGEX-2E1:2B4(His)₆, предназначенная для экспрессии химерного цитохрома, в которой 20 N-концевых аминокислотных остатков (Δ2-27)2B4 были заменены на 20 соответствующих остатков цитохрома P450(Δ3-29)2E1: MAWNLPPGPFPLPIGN (табл.1). Плазмидная конструкция pGEMEX1-2B4(His)₆, позволяющая экспрессировать полноразмерный вариант P450 2B4 была предоставлена лабораторией "Генной Инженерии" (Центр «Биоинженерия», Москва, Россия).

Получение и очистка белков. Плазмидные конструкции были трансформированы в клеточную линию Jm109(*E.coli*). Единичные колонии были засеяны на LB-агар чашки, содержащие 50 мкг/мл ампициллина, и оставлены расти на ночь в инкубаторе при 37°C. Затем, в 5 мл LB среды, содержащей 1 мМ тиамин гидрохлорида и 100 мкг/мл ампициллина, инокулировали единичную колонию и оставили расти на ночь в механическом инкубаторе при 37°C (30°C для полноразмерного 2B4) и горизонтальным перемешиванием 200 об/мин. На

следующий день, 1 мл культуры добавляли в 200 мл Terrific Broth (TB), содержащей 1 мМ тиамина гидрохлорида и 50 мкг/мл ампициллина.

<i>NotI</i>	<i>P450</i>	→
1 ggcggccgcc tggctcctcg tatggctggc cgcctccccc cgggaccctc ccctctgccc		
2 ggcggccgcc tggctcctcg tatggctggc cgcctccccc cgggaccctc ccctctgccc		
1 gtcctgggga accttctgca gatggacagg aagggcctgc tccgctcctt cctgcggctc		
2 gtcctgggga accttgtaca gatggacagg aagggcctct taaggctcctt cctgcggctc		
<i>BsrGI</i>		<i>AflII</i>

Рисунок 1.

Создание уникальных рестрикционных сайтов.

- (1)- нативная последовательность cDNA (плазмида pGEX-P450 (Δ2-27)).
 (2)-создание уникальных сайтов рестрикции для эндонуклеаз BsrGI и AflII. Полученная плазмида была использована для введения мутантных последовательностей с помощью синтезированных олигонуклеотидов. При создании AflII сайта были использованы не значимые мутации. Изменения нуклеотидной последовательности при создании BsrGI сайта привели к замене Leu на Val.

Примечания: (·)-гидрофобные аминокислотные остатки. (S1 и S2) гидрофобные сегменты и промежуточный сегмент (L1) показаны над полноразмерной последовательностью 2B4. Район, выделенный курсивом, соответствует последовательности 2E1 в конструкции GST-2E1:2B4(His)6. Полужирным шрифтом показаны специфические аминокислотные последовательности, узнаваемые соответствующими протеиназами: LVPR и MYPRGN - тромбиновые протеолитические сайты, PPGP-протеолитический сайт IgA-азы, IEGR-протеолитический сайт фактора Ха. Стрелка указывает N-концевой метионин 2B4, следующий за линкерной последовательностью состоящей из 5 глицинов и тромбинового сайта (1-10). Линкерная последовательность обеспечивает проведение ферментативного гидролиза пептидной связи между GST доменом и P450.

Культуру выращивали при 30°C, 160 об/мин в 500-мл колбе Эрленмейера до достижения оптической плотности $A_{600} \approx 0,8$, затем был добавлен индуктор lac-оперона ИПТГ одновременно с δ-АЛК до конечной концентрации 1 мМ каждого и выращивание клеточной культуры продолжали в течении 48-72ч при комнатной температуре (приблизительно 25°C), и 120 об/мин. Клетки были собраны центрифугированием при 5000 g, 4°C, в течении 15 мин и сохранены при -80°C.

Очистка рекомбинантного белка. Все операции по очистке белка были выполнены при 4°C. Клетки были ресуспендированы в 10 мл буфера А (50 мМ калий фосфатный буфер, pH 7,4, 20% глицерин, 150 мМ NaCl, 0,5% эмульген 913, 1 мМ ДТТ, 1 мг/мл лизоцим, 1 мМ PMSF) и лизированы ультразвуком (5 процедур по 10 сек) на клеточном дезинтеграторе Branson (Branson Sonic Power). Клеточные остатки были удалены центрифугированием при 10 000 g в течении 15 минут. Супернатант был дополнительно ультрацентрифугирован при 100 000 g в течении 1 часа на Beckman 45 Ti роторе (Beckman). В полученном супернатанте определяли концентрацию рекомбинантного цитохрома P450 2B4 и проводили очистку с использованием аффинной хроматографии.

Для выделения полноразмерной формы цитохрома 2B4 (конструкция 2B4(His)6) собранные при центрифугировании клетки ресуспендировали в буфере А, содержащем 1% CHAPS, вместо эмульгена 913. После инкубирования в течении 30 минут на льду проводили лизирование клеток ультразвуком.

Для очистки химерных белков с GST доменом, растворимый экстракт клеток *E.coli*, инкубировали в течении 30 мин при 4°C вместе с 200 мкл глутатион-сефарозы, уравновешенной буфером А. После центрифугирования при 500g в течении 5 мин супернатант удаляли и сорбент тщательно промывали буфером В (100 мМ калий фосфатный буфер, pH 7,4, 20% глицерин, 300 мМ NaCl, 0,5% Chaps, 5мМ ДТТ). Для удаления белков, неспецифически адсорбированных на глутатион-сефарозе или белков связанных с химерным белком, сорбент дополнительно промывали буфером С (100 мМ калий фосфатный буфер, pH 7,4, 20% глицерин, 0,5% Chaps, 10 мМ ДТТ, 100 мкМ ZnCl₂, 10 мМ АТР, 10 мМ MgSO₄), 3 колоночных объема в течении 30 мин. После этого, промывку повторяли дважды с соответствующим буфером, используемым при протеолизе.

Для очистки 2B4-6His использовали буферы, не содержащие ЭДТА. Супернатант, полученный при ультрацентрифугировании, наносили на смолу Ni²⁺-NTA. Контаминирующие белки удаляли многократной промывкой буфером В, содержащим 50 мМ имидазол. Рекombинантный P450 2B4 был элюирован со смолы буфером В, содержащим 500 мМ имидазол. Очищенные белки хранили при -80°C.

Ограниченный протеолиз химерных белков. Все протеолитические реакции были выполнены с химерными белками, адсорбированными на глутатион-сефарозе или на Ni(2⁺) хелатной смоле. Алликвоты исследуемого материала после ограниченного протеолиза были взяты для электрофоретического анализа в ПААГ и идентифицированы анализом N-концевой аминокислотной последовательности.

Ограниченный протеолиз с фактором Ха. Ограниченный протеолиз GST-(Δ2-27)2B4(Xa)(His)₆ и GST-(Δ2-27)2B4(gXa)(His)₆ с фактором Ха, проводили в буфере D (50 мМ Трис-HCl, pH 7,5, 20% глицерин, 150 мМ NaCl, 1 мМ CaCl₂, 0,2% Chaps) при комнатной температуре (а также при 4°C, отдельный эксперимент) в течении 16-24 часов (фермент-субстратное соотношение составляло 1:20). В ходе экспериментальной работы было определено, что буфер D является оптимальным для проведения ограниченного протеолиза с фактором Ха.

Ограниченный протеолиз с IgA эндопротеиназой. Ограниченный протеолиз проводили в буфере D (не содержащем 1 мМ CaCl₂) в течении 24 часов при комнатной температуре. При соотношении фермент-субстрат 50:1. Для изучения влияния GST домена и N-концевого участка 2B4 (27-33) на доступность протеолитического сайта (46-49) для фактора Ха, полученные полипептиды были очищены на Ni²⁺ хелатной смоле и вторично подвергнуты протеолизу с фактором Ха при тех же условиях.

Ограниченный протеолиз с тромбином. Ограниченный протеолиз GST-(Δ2-27)2B4Th(His)₆ с тромбином был выполнен в буфере F (100 мМ калий фосфатный буфер, pH 7,4, 20% глицерина и 0,1 мМ ЭДТА) в течении 16-24 часов, при комнатной температуре и соотношении фермент субстрат: 8U тромбина/нмоль P450.

Характеристика рекombинантных P450 и продуктов гидролиза. Для характеристики белков было использовано несколько методов.

1. *Определение концентрации рекombинантного гемопротеина.* Супернатант, полученный после ультрацентрифугирования, был анализирован в буфере А содержащим 0,1% холата и 1 мМ ЭДТА, используя спектрофотометр Uvikon 941 Plus (Bij-Tek Kontron Instruments). Концентрации P450 были

определены после восстановления дитионитом натрия и насыщения образца окисью углерода. Коэффициент молярного поглощения $p450 - 91 \text{ мм}^{-1} \text{ см}^{-1}$.

2. *Электрофоретический анализ в ПААГ и Western blot.* Очищенные с помощью аффинной хроматографии белки, а так же продукты ограниченного протеолиза были разделены с использованием электрофореза в ПААГ (10% акриламидный гель) в присутствии додецил сульфата натрия (SDS). Гель окрашивали в 0,2% растворе Кумасси бриллиантовый голубой R250 в 10% метаноле при комнатной температуре. После отмывки мембраны в том же растворителе гель высушивали. Western blot анализ был выполнен для белков, разделенных с помощью SDS-электрофореза в ПААГ с использованием антител против P450 2B4 и хемилюминисцентного блоттинг-субстрата. Мембраны проявляли при повышенной хемилюминисценции, согласно инструкции производителя (ECL, Amersham Англия).

3. *Определение N-концевой аминокислотной последовательности.* После электрофоретического разделения в ПААГ, отдельные белки и полипептиды, полученные при проведении ограниченного протеолиза, были фиксированы электроблоттингом на мембране Hyperbond. Электроблоттинг проводили в течении 60 мин при 1 мА/см^2 в 100 мМ буфере (циклогексинамино)пропан-1-сульфоуксусной кислоты (CAPS), содержащим 0,07% SDS. Мембрану окрашивали аналогично процедуре окрашивания геля при электрофорезе. После промывки и высушивания мембраны, электрофоретические зоны белка были вырезаны и проанализированы в белковом микросеквенсоре Beckman LF 3000.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. С целью получения водорастворимой формы P450 2B4 было генетически сконструировано несколько моделей химерного белка 2B4 с глутатион-S-трансферазой.

На первом этапе, для удаления гидрофобного N-концевого района, предположительно влияющего на олигомеризационное состояние молекул цитохрома, в положение 46-49 была введена аминокислотная последовательность (GGIEGRG). IEGR является сайтом узнавания для фактора Ха (табл. 1). Введение глицинов по обе стороны Ха сайта обусловлено тем, что окружение протеолитического сайта из аминокислот с минимальными радикальными группами способствует большей доступности для фактора Ха, как показано в работе Lamb et al. по созданию водорастворимой формы микросомального Erg11p (CYP51) [25]. Предполагалось, что удаление гидрофобного сегмента вместе с GST доменом даст возможность снизить олигомеризацию 2B4, имеющего гексамерную форму в растворе, в отсутствие детергента [14].

Очистку химерных белков проводили с использованием аффинной хроматографии на глутатион-сефарозе. SDS-электрофорезный анализ в ПААГ фракций элюированных с аффинного сорбента, показал, что наряду с химерным белком в элюате присутствуют два сопутствующих высокомолекулярных белка, представленные электрофоретическими зонами соответствующими $M 60000 \text{ Да}$ и $M 70000 \text{ Да}$ (рис.2)

Для выяснения вопроса, образуют ли сопутствующие белки комплекс с химерной молекулой или обнаруживаются за счет неспецифической сорбции на аффинном сорбенте, были выполнены эксперименты по дополнительной очистке при промывке буферами повышенной ионной силой и растворами с повышенной концентрацией детергента. Однако, данные попытки не привели к желаемому результату, что указывает на прочную ассоциацию сопутствующих белков с химерной молекулой.

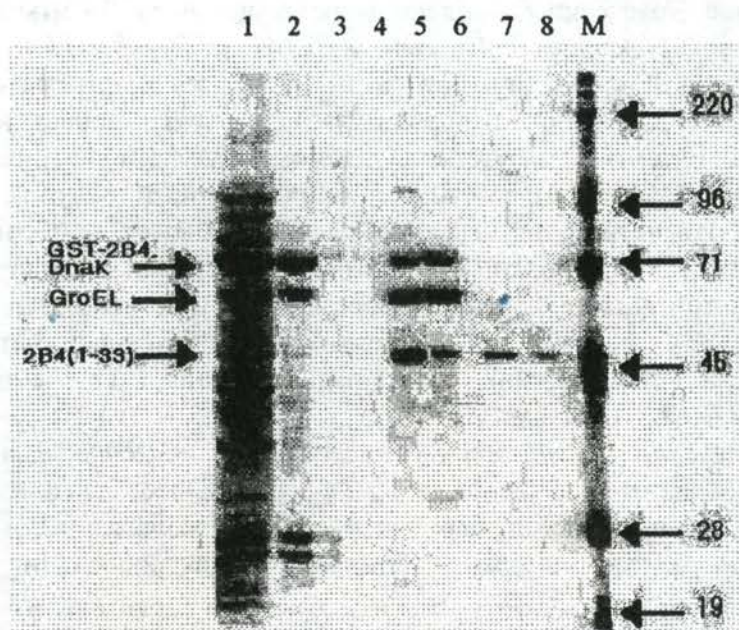


Рисунок 2

SDS-электрофоретическое разделение белков в 10% ПААГ. (1)-клеточный лизат после центрифугирования при 100000g; (2)-рекомбинантный GST-(Δ 2-27)2B4gXa(His)6 после очистки на глутатион-сефарозе 4B; (3)- промывка в «АТФ/Mg» буфере; (4)-промывка в «IgA-эндопротеиназой» буфере; (5)-протеолиз с IgA эндопротеиназой; (6)-протеолиз с фактором Ха; (7)-домен 2B4 после протеолиза химерного белка с IgA эндопротеиназой и очистки на Ni(2+)-хелатной смоле; (8)-домен 2B4 после протеолиза химерного белка с фактором Ха и очистки на Ni(2+)-хелатной смоле; (M)-маркеры молекулярного веса ($M_r \times 1000$: 220, 96, 71, 45, 28 и 19).

Для идентификации сопутствующих белков был выполнен анализ N-концевых последовательностей аминокислот. Расшифровка 15 N-концевых аминокислот для белка с M_r 60000 Да позволила идентифицировать последовательность AAKDVKGNDARVKM, которая, начиная со второго аминокислотного остатка, соответствует субъединице GroEL *E. coli*. Расшифровка 13 N-концевых аминокислот для белка с M_r 70000 Да выявила последовательность SKPIGIDLGTNS, которая начиная со второго остатка соответствует DnaK *E. coli*. GroEL принадлежит классу Hsp60, шаперонинов, индуцируемых при тепловом шоке. DnaK так же является шапероном и принадлежит Hsp70 классу.

Промывка возможного комплекса белков с Mg/АТФ буфером (буфер С), являющимся специфичным для диссоциации молекулярных шаперонов, также не привела к их элюированию с глутатион-сефарозы. Полученные результаты говорят о прочной ассоциации молекулярных шаперонов с химерным белком.

Анализ N-концевой аминокислотной последовательности полипептидов, полученных при ограниченном протеолизе химерных белков GST-(Δ 2-27)2B4(Xa)(His)6 и GST-(Δ 2-27)2B4(gXa)(His)6 с фактором Ха, выявил несколько основных продуктов реакции. Было обнаружено, что несмотря на встроенный сайт узнавания протеиназой, все продукты протеолиза были получены в результате неспецифического расщепления (рис. 4). Расщепление пептидной связи проходило преимущественно в районе сайта узнавания тромбином, встроенным в линкерную последовательность (позиция 6-7), соединяющую C-концевой район GST домена и N-концевой район P450 2B4, а также перед N-

концевым метионином домена 2B4 (табл.1). Встраивание аминокислот с минимальными боковыми группами по обе стороны протеолитического сайта не приводит к увеличению доступности его для ограниченного протеолиза.

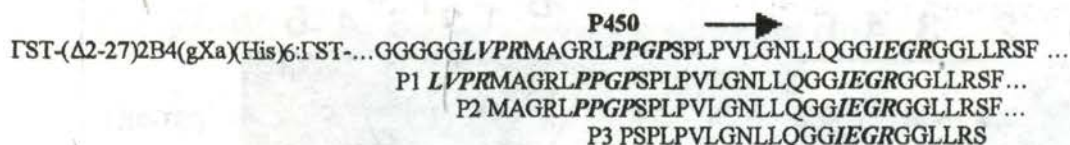


Рисунок 4.

Основные продукты протеолиза GST-(Δ2-27)2B4(gXa)(His)6 с фактором Ха и с IgA эндопротеиназой.

Обозначения: на рисунке представлен анализ N-концевых аминокислотных последовательностей продуктов ограниченного протеолиза (Δ2-27) 2B4(gXa)(His)6: P1 и P2 – с фактором Ха (соотношение P1:P2 как 3:2); P3 – с IgA эндопротеиназой.

Анализ N-концевой аминокислотной последовательности продуктов ограниченного протеолиза химерного цитохрома GST-(Δ2-27)2B4(Th)(His)6 с тромбином выявил два основных полипептида. Как и в случае неспецифического расщепления при протеолизе с Фактором Ха, они были получены за счет расщепления пептидной связи в районе сайта узнавания тромбином, встроенным в линкерную последовательность (позиция 6-7) и перед N-концевым метионином домена 2B4.

Суммируя результаты, можно сделать вывод, что белковая структура в выбранном районе P450 2B4 (46-49), обладает устойчивостью к действию специфических протеиназ.

В данной работе впервые показана возможность получения укороченной формы цитохрома 2B4, лишенного 33 N-концевых аминокислотных остатка, при проведении ограниченного протеолиза с IgA эндопротеиназой, специфически узнающей PPGP мотив в P450 2B4. PPGP мотив присутствует во многих микросомальных формах P450 млекопитающих и играет важнейшую роль в процессе экспрессии белка.

Продукты реакции, полученные при протеолизе химерного белка с IgA эндопротеиназой и фактором Ха (отдельный эксперимент), были элюированы с аффинной смолы. При этом сопутствующие белки также оказались в элюате (рис.2,3). Затем, элюат был нанесен на Ni⁽²⁺⁾-хелатную смолу. При этом сопутствующие белки (GroEL и DnaK), не связывались со смолой и были смыты при промывке, а конструкции 2B4 со встроенной последовательностью из 6 гистидинов оказались адсорбированными. Исходя из полученных результатов, было сделано предположение, что химерная молекула цитохрома 2B4 с GST доменом содержит сайт связывания с молекулярными шаперонами, который может быть локализован в N-концевом районе цитохрома и разрушается протеолизом в данном районе: в позиции 6-7 линкерной последовательности, перед N-концевым метионином 2B4, а также в позиции 33-34 (2B4).

Для изучения влияния GST домена и N-концевого участка 2B4 (27-33) на доступность протеолитического сайта (46-49) для фактора Ха, полученные при протеолизе с IgA-азой полипептиды (Δ1-34)2B4(gXa)(His)6 и (Δ1-34)2B4(Th)(His)6 были очищены на Ni²⁺ хелатной смоле и вторично подвержены протеолизу с фактором Ха и тромбином (соответственно). Однако,

было показано, что данный район (46-49) является попрежнему не доступным для действия протеолитических ферментов.

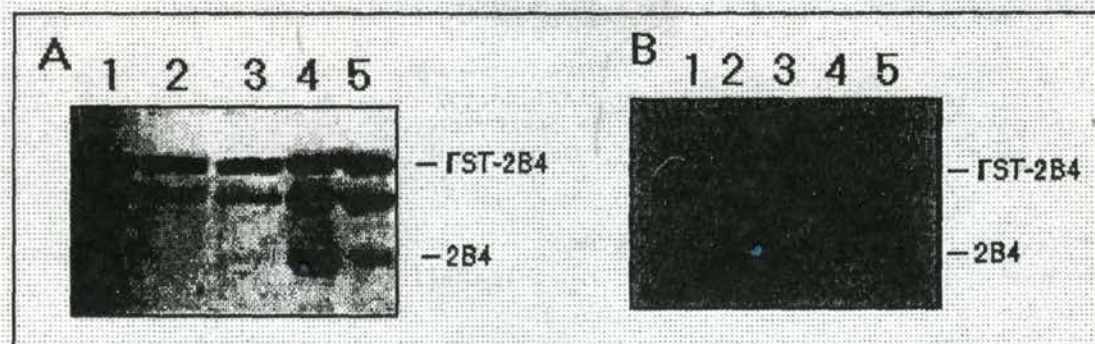


Рисунок 3

Western blot анализ химерного белка, элюированного с глутатион-сефарозы.

Обозначение: анализируемый материал до (1-3) и после проведения ограниченного протеолиза с тромбином(4) и фактором Ха(5). Образцы анализируемого материала были очищены на глутатион сефарозе, как описано в "Материалах и методах". Протеолиз был выполнен с адсорбированным белком. Электрофоретическое разделение в ПААГ (А) и Western Blot (В) (1) GST-(Δ2-27)2B4(Xa)(His)6; (2) GST-(Δ2-27)2B4(gXa)(His)6; (3) GST-2E1:2B4(His)6; (4) GST-(Δ2-27)2B4(Xa)(His)6 (после протеолиза с тромбином) (5) GST-(Δ2-27)2B4(gXa)(His)6 (после протеолиза с фактором X

Для изучения роли N-концевого района цитохрома P450 2B4 в образовании комплекса с шаперонами была создана конструкция GST-2E1:2B4(His)6, в которой 20 N-концевых аминокислотных остатка (Δ2-27)2B4 были заменены на последовательность из 20 соответствующих остатков (Δ3-29)2E1, а так же была проведена оптимизация экспрессии полноразмерного варианта P450 2B4, не связанного с GST доменом и содержащего 6 гистидиновых остатков в C-концевом районе 2B4(His)6.

Обе конструкции позволили экспрессировать спектрально активный белок, однако уровень экспрессии был значительно ниже по сравнению с другими моделями химерного цитохрома (табл. 2).

Таблица 2. Уровень экспрессии химерных форм цитохрома P450 2B4 в *E.coli*

Конструкция P450 2B4	Концентрация, нмоль/л
2B4(His)6	70-90
GST-(Δ2-27)2B4	270-330
GST-(Δ2-27)2B4(gXa)(His)6	230-280
GST-(Δ2-27)2B4(Th)(His)6	20-50
GST-2E1:2B4(His)6	25-70

Эксперименты показали, что экспрессия в *E.coli* полноразмерного цитохрома 2B4 без GST домена не приводит к образованию комплекса с GroEL и DnaK, в то время, как экспрессия GST-2E1:2B4(His)6 сопровождается ассоциацией с GroEL и DnaK (рис.5).

Таким образом, было показано, что все химерные формы цитохрома P450 2B4 с GST доменом образуют прочный комплекс с GroEL и DnaK (Табл.3). Замена

N-концевого района цитохрома 2B4 на 2E1 не влияет на ассоциацию с шаперонами.

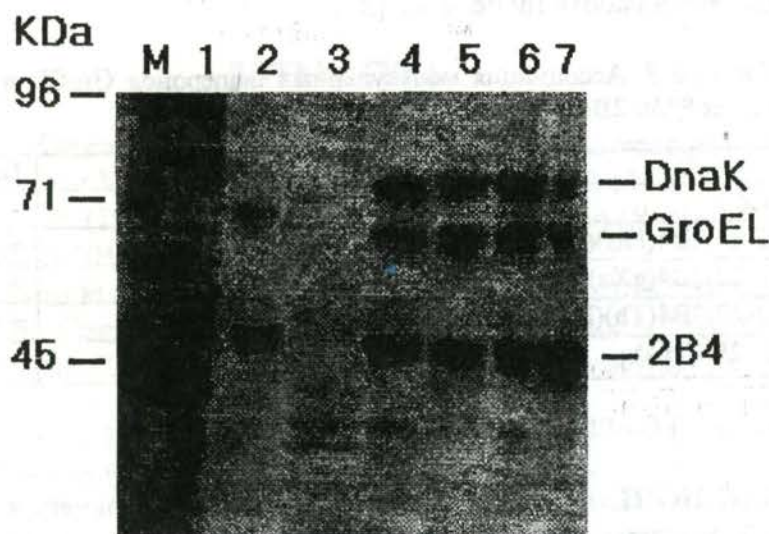


Рисунок 5

Электрофоретическое разделение белков в 10% ПААГ.

Описание: (М)-маркеры молекулярного веса; (1)-клеточный лизат, содержащий 2B4(His)₆; (2)-2B4(His)₆, после очистки на Ni²⁺-хелатной смоле; (3)-контроль (клеточный лизат JM109, не содержащий химерного белка, после очистки на Ni²⁺-хелатной смоле); продукты ограниченного протеолиза с тромбином: (4)-GST-2E1:2B4(His)₆; (5)-GST-(Δ2-27)2B4(gXa)(His)₆; (6)-GST-(Δ2-27)2B4(His)₆; (7)-GST-(Δ2-27)2B4, ассоциированных с шаперонами. Протеолиз был выполнен с химерными белками адсорбированными на глутатион-сепарозе.

К настоящему времени накопилось много данных о том, что гетерологическая экспрессия белков в виде химерной молекулы с глутатион-S-трансферазой сопровождается ассоциацией рекомбинантного белка с молекулярными шаперонами, такими как GroEL и DnaK [27]. Молекулярные шапероны принимают непосредственное участие в фолдинге белков и защищают полипептиды от нежелательного межмолекулярного взаимодействия в процессе фолдинга [28,29]. Связывание с полипептидами происходит преимущественно за счет гидрофобного взаимодействия [30]. Было показано, что почти половина экспрессируемых в *E.coli* белков, имеющих неправильный фолдинг, либо находящихся в частично нативном состоянии, образуют комплекс с молекулярными шаперонами [31].

Данные результаты говорят о том, что ассоциация молекулярных шаперонов GroEL/DnaK с химерным белком происходит, вероятно из-за локального нарушения структуры 2B4 в районе соединения с глутатион-S-трансферазой, либо локального нарушения структуры в С-концевом районе глутатион-S-трансферазы. Структурные элементы или мотивы, являющиеся недоступными для GroEL/DnaK в нативной молекуле GST и/или P450 2B4, при химеризации этих двух белков распознаются шаперонами и являются ответственными за образование комплексов. При разделении GST и P450 2B4 происходит восстановление целостности структур этих белков, возможно, благодаря тем же GroEL/DnaK, после чего комплекс диссоциирует. Интересно,

что непосредственное участие шаперонина GroEL в формировании фолдинга другой формы цитохрома млекопитающих, P450 3A7, недавно было подтверждено в работе Inoue et al. [32].

Таблица 3. Ассоциация молекулярных шаперонов GroEL и DnaK с химерными цитохромами P450 2B4.

	GroEL	DnaK
2B4(His) ₆	-	-
GST-(Δ2-27)2B4(His) ₆	+	+
GST-(Δ2-27)2B4(gXa)(His) ₆	+	+
GST-(Δ2-27)2B4(Th)(His) ₆	+	+
GST-2E1:2B4(His) ₆	+	+

Обозначение. (-) GroEL/DnaK не были обнаружены

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Ассоциация молекулярных шаперонов GroEL и DnaK с химерной молекулой глутатион-S-трансферазы - цитохром P450 2B4 может говорить о нарушенном или неправильном локальном фолдинге этих белков, составляющих химерную конструкцию. Наиболее вероятно, что данным районом с ненативной структурой является место соединения двух белков. Это подтверждается результатами о том, что диссоциация комплекса происходит после проведения ограниченного протеолиза в данном районе.

Искусственное сближение двух различных белковых структур (в данном случае глутатион-S-трансферазы и цитохрома P450 2B4) путем соединения пептидной связью, осуществленное при помощи генной инженерии, вероятно, приводит к локальному нарушению фолдинга нативных структур в районе «вынужденного» взаимодействия.

Накопленные сведения дают основание полагать, что данная проблема является общей для белков, экспрессируемых в системе с глутатион-S-трансферазой [27].

С другой стороны, ассоциация с GroEL и DnaK указывает на возможное участие данных шаперонов непосредственно и в фолдинге цитохрома P450 2B4. Роль этих шаперонов при гетерологической экспрессии в *E.coli* была подтверждена в работе Inoue et al. [32] с другой формой цитохрома - P450 3A7.

В настоящей работе впервые была показана возможность получения укороченной формы цитохрома P450 2B4, лишённого 33 N-концевых аминокислотных остатка. Данный белок представляет интерес в качестве модели для кристаллизации 2B4, а также для изучения его кинетических и спектральных характеристик. Попытка получения белка с более укороченной N-концевым сегментом оказалась неудачной. Выбранный район 46-49 в P450 2B4 является устойчивым к действию специфических протеиназ. Даже после удаления GST домена и ассоциированных с химерным белком молекулярных шаперонов, которые могли бы блокировать доступ к данному району, ограниченный протеолиз носит неспецифический характер и протекает не в заданном положении.

Работа поддержана грантом INTAS 96-1549.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nelson D.R., Koymans L., Nebert D.W. *et al.* (1996). *Pharmacogenetics*. **6**, 1-42.
2. Porter T.D., Coon M.J. (1991). *J. Biol. Chem.* **266**, 13469-13472.
3. Guengerich F.P. (1989). in *Frontiers in Biotransformation* (Ruckpaul K. and Rein H., eds). **1**, 101-150.
4. Cosme J., Johnson E.F. (2000). *J. Biological. Chemistry*. **275**, 2545-2553.
5. Williams P.A., Cosme J., Johnson E.F. (2000). *Mol. Cell*. **5**, 121-131.
6. Von Wachenfeldt C., Cosme J., Johnson E.F. (1997). *Arch. Biochem. Biophys.* **339**, 107-114.
7. Szczesna-Skorupa E., Kemper B. J. (1989). *Cell. Biol.* **108**, 1237-1243.
8. Szczesna-Skorupa E., Browne N., Kemper B. (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **85**, 738-742.
9. Sakaguchi M., Mihara K., Sato R. (1987). *EMBO J.* **6**, 2425-2431.
10. Sakaguchi M., Mihara K., Sato R. (1984). *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. **81**, 3361-3364.
11. Monier S., Van Luc P., Adesnik M. J. *et al.* (1988). *Cell. Biol.* **107**, 457-470.
12. von Wachenfeldt C., and Johnson, E.F. (1995) in „Cytochrome P450-Structure, Mechanism, and Biochemistry“ (Ortiz de Montellano P., ed), Plenum Publishing Corp., NY. 2nd Ed., 183-223.
13. Dean W.L., Gray R.D. (1987). *J. Biol. Chem.* **257**, 14679-85
14. Pernecky S.J., Olken N.M., Coon M.J. *et al.* (1989). *Arch. Biochem. Biophys.* **318**, 446-456.
15. Clark B.J., Waterman M.R. (1991). *J. Biol. Chem.* **266**, 5898-5904.
16. Cullin C. (1992). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **184**, 1490-1495.
17. Gillam E.M., Baba T., Guengerich F.P. *et al.* (1993). *Arch. Biochem. Biophys.* **305**, 123-131.
18. Pernecky S.J., Larson J.R., Coon M.J. *et al.* (1993). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **90**, 2651-2655.
19. Larson J.R., Coon M.J., Porter T.D. (1991). *J. Biol. Chem.* **266**, 7321-7324.
20. Mary L., Shank-Retzlaff F., Sligar S.G. *et al.* (1998). *Arch. of Biochem. and Biophysics*. **359**, 82-88.
21. Uvarov V.Yu., Sotnichenko A.I., Archakov A.I. *et al.* (1994). *Eur. J. Biochem.* **222**, 483-489.
22. Black S.D. (1992). *FASEB J.* **6**, 680-685.
23. Nelson D.R., Strobel H.W. (1988). *J. Biol. Chem.* **263**, 6038-6050.
24. Smith D.B., Johnson K.S. (1988). *Gene*. **67**, 31-40.
25. Lamb D.C., Kelly D.E., Kelly S.L. *et al.* (1999). *Biochemistry*. **38**, 8733-8738.
26. Chang J-Y. (1985). *Eur. J. Biochem.* **151**, 217.
27. Thain A., Gaston K., Clarkie A.R. *et al.* (1996). *Trends Genet.* **12**, 209-210.
28. Houry W.A., Frishman D., Hartl F.U. *et al.* (1999). *Nature*. **371**, 614-619.
29. Buchberger A., Schroder H., Bukau B. *et al.* (1996). *J.Mol.Biol.* **261**, 328-333.
30. Fenton W.A., Kashi Y., Horwich A.L. (1994). *Nature*. **371**, 614-619.
31. Viitanen P.V., Gatenby A.A., Lorimer G.H. (1992). *Protein. Sci.* **1**, 363-369.

32. Inoue E., Takahashi Y., Kamataki T. (2000). Biochem. And Biophys. Research. Comm. 269, 623-627.

Поступила 13.12.00.

**ASSOCIATION OF CYTOCHROME P450 2B4
WITH MOLECULAR CHAPERONES AFTER
HETEROLOGOUS EXPRESSION IN *E. COLI*.**

T.V. PROZOROVSKY¹, W.-H. SCHUNCK², AND A.I. ARCHAKOV¹

¹Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry RAMS, Pogodinskaya 10, Moscow, 119992;
tel/fax (095) 246-33-75, 245-08-57; E-mail: proz@medic.ibmh.msk.su

²Max-Delbruck-Centre for Molecular Medicine, Berlin, Germany

To produce a water-soluble form of microsomal P450 2B4, fusion proteins with glutathione-S-transferase were genetically engineered. Specific proteolytic sites recognized by Factor Xa and Thrombin have been introduced into N-terminus of P450 2B4 (46-49), lacking signal anchor sequence (2-27). It was supposed that proteolysis at this site could give the possibility to produce protein lacking hydrophobic N-terminus sequence (1-49). However, it was shown that given region in P450 2B4 is resistant against specific proteinase action. Positive result has been obtained at specific proteolysis with IgA endoproteinase, recognizing the native sequence PPGP (31-34) in P450 2B4. Thus, at first time truncated form of cytochrome 2B4, lacking its 33 N-terminal amino acid residues has been created.

It was found that the expression of genetically engineered variants of GST-2B4 in *Escherichia coli* is accompanied by tight complex formation with molecular chaperones GroEL and DnaK. Dissociation of the complex occurred after proteolysis in: linker sequence (position 6-7) between C-terminal part of GST domain and N-terminal part of 2B4, and also before N-terminal methionine 2B4 and at position 33-34 (2B4). These results suggest the possibility that interaction with a GroEL /DnaK molecular chaperones may be requirement for correct folding of eukaryotic cytochrome 2B4 during its biosynthesis in *E. coli*.

Key word: P450 2B4, chaperones, DnaK, GroEL, fusion protein, glutathione-S-transferase