

УДК 612.1.577.617.96

© Коллектив авторов

**ГЕТЕРОЛОГИЧНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ СУР450
1. ГЕТЕРОЛОГИЧНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ЦИТОХРОМА Р450 2В4 С
РАЗЛИЧНЫМИ КОНЦЕВЫМИ АФФИННЫМИ ГРУППАМИ В
ШТАММАХ *E. COLI***

А.А.ЖГУН¹, М.А.ЭЛЬДАРОВ¹, Л.И.СОЛОДАРЬ², Н.Н.СОКОЛОВ²,
А.И.АРЧАКОВ², К.Г.СКРЯБИН¹

¹Центр "Биоинженерия" РАН, 117312, Москва, Проспект 60-летия Октября, д. 7/1,
факс (095) 135-05-71;

²Институт биомедицинской химии им. В.Н.Ореховича РАМН 119832, Москва,
Погодинская ул., д.10; факс (095) 245-08-57.

Проведен сравнительный анализ уровня экспрессии вариантов цитохрома печени кролика Р450 2В4 с N- и С-концевыми модификациями; исследованы некоторые энзиматические характеристики рекомбинантных белков. Сконструированы С-концевые гибриды для гена СУР450 2В4 с последовательностями ДНК: 1) для белковой кассеты интеин - хитин связывающий домен и 2) олигопептида гексагистидина. Данные модификации сочетались с N-концевым гибридом гена 2В4 с нуклеотидной последовательностью белка глутатион-S-трансферазы [Pernecky S.J., et.al., (1995) Arch. Biochem. Biophys., 318, 446-456]. Полученные конструкции обеспечивали синтез полноразмерных белковых продуктов в штаммах *E.coli* с выходом спектрально-активного белка на уровне 200 – 1000 нмоль/л культуры. В случае С-концевых гибридов с белком интеином наблюдался частичный автопротеолиз, несмотря на вставку аминокислоты глицина на стыке двух белков. Показана принципиальная невозможность применения стандартной схемы очистки для продукта экспрессии с С-концевой интеиновой аффинной группой для СУР450 2В4. Дитиотреитол (40 мМ), воздействующий на гибридный белок, инактивирует цитохромный домен. Полноразмерная форма цитохрома 2В4 с С-концевой олигогистидиновой последовательностью под контролем Т7 промотора была экспрессирована и выделена из клеток *E.coli* с помощью аффинной хроматографии. Концевая модификация гексагистидином не влияет на каталитические свойства белка в реакции О-деалкилирования 7-пентоксирезорфуфина.

Ключевые слова: СУР450 2В4, гетерологичная экспрессия, *E.coli*, Ni-NTA, интеин

Принятые сокращения: ИПТГ - изопропил-β-D-тиогалактозид, ПААГ-ДСН - полиакриламидный гель с додецилсульфатом натрия, п.о. - пар оснований; DTT - DL-дитиотреитол, NTA - нитрилотриуксусная кислота, PMSF - фенолметилсульфонилфторид.

ВВЕДЕНИЕ. Прокариотическая система экспрессии является одним из наиболее распространенных инструментов для изучения взаимосвязи между структурой и функцией эукариотических CYP450 [1-3]. Оптимизация этапов очистки играет ключевую роль при гетерологичной экспрессии этих белков [4-6]. Один из основных подходов к оптимизации условий выделения заключается в гетерологичной экспрессии цитохромов P450 с различными концевыми аффинными группами [7, 4].

Индукцируемый фенобарбиталом цитохром CYP450 2B4 представляет собой мажорную фракцию цитохромов P450 эндоплазматического ретикулума клеток печени кролика. Впервые изоформы 2B4 (B0, B1 и B2) были получены из библиотек кДНК тканей легких и печени кролика [8]. Долгое время возникали трудности при гетерологичной экспрессии этого белка, в частности, при попытке экспрессии в клетках *S.cerevisiae* под контролем Gal10 промотора [9]. Был создан N-концевой усеченный аналог, который параллельно с геном дикого типа экспрессировали в конструкции pJL с выходом недостаточным для проведения экспериментов по препаративному выделению белка [10]. В 1995 была достигнута эффективная экспрессия для N-концевого гибрида с последовательностью глутатион-S-трансферазы под контролем Ptas промотора [7], позволившая изучать каталитические свойства цитохрома 2B4 методом сайт-направленного мутагенеза [11]. В недавней работе [5] описана эффективная система продукции рекомбинантных мутантных аналогов полноразмерного CYP450 2B4 под контролем T7 промотора. В настоящей работе были предложены новые подходы к экспрессии гена 2B4 в различных комбинациях с традиционными с целью получения системы для эффективной экспрессии как немодифицированного так и модифицированного CYP450 2B4.

МЕТОДИКА. В работе использовали следующие штаммы *E.coli*: BL 21(DE3) (F' *ompT hsdS_b* (r_b^- , m_b^-) *gal dcm* (DE3)) ("Novagen", США); BL 21(DE3)pLysS (F' *ompT hsdS_b* (r_b^- , m_b^-) *gal dcm* (DE3) pLysS (Cm^R)) ("Novagen"); DH5 α (ϕ 80d*lacZ*ΔM15, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17* (r_k^- m_k^+), *supE44*, *relA1*, *deoR*, Δ(*lacZYA-argF*)U196) ("Life Technologies", Англия); JM 109 (*endA1*, *recA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17* (r_k^- , m_k^+), *relA1*, *supE44*, Δ(*lac-proAB*), [F', *traD36*, *proAB*, *lac*/^qΔ M15] (DE3) pLysS (Cm^R)) ("Promega", США); JM 109 (DE3)pLysS (*endA1*, *recA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17* (r_k^- , m_k^+), *relA1*, *supE44*, Δ(*lac-proAB*), [F', *traD36*, *proAB*, *lac*/^qΔ M15]) ("Promega"); XL-1 Blue (*rec A1*, *end A1*, *gyr A96*, *thi*, *hsdR17* (r_k^- , m_k^+), *sup E44*, *rel A1*, *lac*, [F', *pro AB*+ *lac*/^qΔM15, :: Tn10(Tet^r)] ("Life Technologies").

Конструирование рекомбинантных плазмид проводили с использованием следующих векторов: pALTER-1 ("Promega"); pET21d(+) ("Novagen"); pGEMEX-1 ("Promega"); pTYP4 ("New England Biolabs", США). Плазмиды pJL/2B4(Δ2-27), pJL/2B4 [10] и pGEX-KN/2B4(Δ2-27) [7] были любезно предоставлены д-ром Куном М.Д. (Университет Мичиган, США). Плазмида pVC1 [12] любезно предоставлена д-ром Ларионовым В.Л. (Национальный Институт Здоровья, Бетезда, ДК, США).

Поликлональная антисыворотка мыши к цитохрому P450 2B4 кролика любезно предоставлена д-ром Колесановой Е.Ф. (НИИ БМХ РАМН, Москва). Препараты CYP450 2B4 и P450-NADPH-редуктазы из печени кролика любезно предоставлены д-ром Карузиной И.И. (НИИ БМХ РАМН, Москва). Конъюгаты

вторичных антител с пероксидазой хрена производства фирмы "Sigma" (США). IMPACT™ (Intein Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag) система – фирмы "New England Biolabs". Эмульген 913 – фирмы "Kao Chemicals" (Япония); NADPH – фирмы "Reanal" (Венгрия); октил-сефароза производства фирмы "Pharmacia" (Швеция).

Создание конструкций. Полноразмерный ген CYP450 2B4 из экспрессионной конструкции рJL клонировали в вектор рALTER1 по сайтам *XbaI* и *HindIII*. Для введения сайта *SacII* была проведена замена первого нуклеотида в триплете терминаторного кодона TGA гена 2B4 (T1474G) при помощи сайт-направленного мутагенеза, используя Altered Sites Systems ("Promega") с олигонуклеотидом 2B4*SacII* 5'-TTCCTGGCCCCGCGGAAGGGGCC-3' (промежуточная конструкция рALTER1/2B4/*SacII*). Полученную мутацию использовали для создания С-концевых гибридов гена цитохрома 2B4 с последовательностями ДНК: 1) гексагистидина (промежуточная конструкция рALTER1/2B4/HIS6 [13]) и 2) кассеты интеин/CBD. Во втором случае, 3'-нетранслируемая область была заменена по сайтам *SacII*, *HindIII* на синтетический фрагмент с использованием олигонуклеотидов:

Int*KpnI*Up 5'-GGATGCTTTGCCAAGGGTACC A-3';

Int*KpnI*Dw 5'-AGCTTGGTACCCTTGGCAAAGCGCCTGC-3'

(промежуточная конструкция рALTER1/2B4/*KpnI*). Последовательность 2B4 с этой С-концевой модификацией клонировали по сайтам *NcoI* и *KpnI* в вектор рTYB4 для экспрессии гибридной кассеты с белками интеином и хитин связывающим доменом. Полученная конструкция была названа рZE1.

В конструкции рGEX-KN/2B4(Δ2-27) последовательность *BglII*, *EcoRI* гена 2B4 была заменена на фрагмент, размером 600 п.о., из плазмиды рVC1 для введения сайтов *KpnI* и *ClaI*. Затем ее, в свою очередь, заменяли:

- А) по сайтам *BglII*, *KpnI* на фрагмент 2B4 из промежуточной конструкции рALTER1/2B4/*KpnI*. Потом по сайтам *KpnI* и *EcoRI* клонировали недостающий интеин-содержащий *KpnI/BspH1*-фрагмент из вектора рZE1. Полученная конструкция служила для экспрессии гибридной кассеты GST/(Δ2-27)2B4/интеин/CBD и была названа рZE2.

- Б) По сайтам *BglII*, *ClaI* на фрагмент CYP450 2B4 из промежуточной конструкции рALTER1/2B4/HIS6. Полученная конструкция служила для экспрессии гибридной кассеты GST/(Δ2-27)2B4/HIS6 и была названа рZE3.

Полноразмерный ген 2B4 из плазмиды рJL клонировали по сайтам *NcoI* и *HindIII* в вектор рET21d(+). Затем, фрагмент с последовательностями T7 промотора и 5'-концевой кодирующей областью гена 2B4 вырезали по сайтам *BglII*, липкие концы обрабатывали ферментом Кленова. Далее фрагмент расщепляли рестриктазой *BamHI* для направленного клонирования в вектор рGEMEX-1, последовательно обработанный *BglII*, ферментом Кленова, *BamHI* (на стыке "тупых" сайтов возникала последовательность, узнаваемая рестриктазой *ClaI*). В эту плазмиду вводили гексагистидиновую последовательность по сайтам *NcoI* и *HindIII* из промежуточной конструкции рALTER1/2B4/HIS6. Полученная конструкция служила для экспрессии полноразмерной формы 2B4 с С-концевой гексагистидиновой последовательностью и была названа рZE4.

Гетерологичная экспрессия цитохрома. Полученные конструкции экспрессировали в штаммах *E.coli* согласно [7, 11, 14] с некоторыми модификациями. Ночную культуру выращивали из стока замороженных клеток в

5 мл LB- среды, содержащей 100 мкг/мл ампициллина при 37°C и 150 оборотов в мин. Далее ночную культуру инокулировали (1:200) в среду ТВ (50 мл среды в колбе, объемом 1000 мл) с добавкой микроэлементов и инкубировали (37°C, 180 об/мин) до оптической плотности при $A_{600} = 0,8 - 1,0$ ОЕ. После этого проводили индукцию ИПТГ (0,5 мМ) и добавляли δ -аминолевулиновую кислоту до конечной концентрации 0,5 мМ. Инкубацию проводили в течение 36-72 час при 28-30°C и 150 оборотах в минуту. Уровень экспрессии для различных конструкций и штаммов составлял от 200 до 1000 нмоль гемопротеина/л культуры.

Вестерн-блоттинг. Перенос белков из ПААГ-ДСН (образцы на базе интеин-содержащих конструкций pZE1 и pZE2 наносили в буфере без DTT и 2- β -меркаптоэтанол [15]) на нитроцеллюлозную мембрану HybondTM-С ("Amersham", Англия) проводили в буфере для переноса по Таубину [16] на аппарате Trans-Blot^R SD Semi-Dry Transfer Cell ("Bio-Rad", США) в течение 45 мин при 30V. Для визуализации переноса мембрану прокрашивали раствором, содержащим 0,5% Ронсеау S, 1% уксусную кислоту. Положение маркеров молекулярного веса фиксировали проколами в мембране. Затем мембрану переносили в 100 мл 1 \times TSB (50 мМ Трис-HCl, pH 7,4; 150 мМ NaCl), содержащего 2% сухого молока (CM), и инкубировали 45 мин при 37°C и перемешивании (65 об/мин). Мембрану промывали в 50 мл 1 \times TSB, содержащего 0,06% CM (5 мин при 37°C, 65 об/мин.). Процедуру повторяли 3 раза. После этого мембрану инкубировали с первичными антителами (мышинные поликлональные антитела к 2B4 из микросом печени кролика с титром 1:1000) в 10 мл 1 \times TSB, содержащего 0,6% CM (45 мин; 37°C; 65 об/мин.). Мембрану промывали 3 раза в 50 мл 1 \times TSB с 0,06% CM (5 мин при 37°C; 65 об/мин). Далее мембрану инкубировали с раствором 1:5000 конъюгата IgG козы к IgG мыши с пероксидазой хрена (при соотношении IgG/пероксидаза = 1:2) в 10 мл 1 \times TSB, содержащего 0,6% CM (45 мин; 37°C; 65 об/мин). После 3-х кратной промывки мембраны в 50 мл 1 \times TSB с 0,06% CM (5 мин при 37 °C; 65 об/мин) мембрану окрашивали в 50 мМ Трис-HCl буфере, pH 7,4, содержавшем 0,066% (вес/объем) 3,3'-диаминобензидин, 0,1% (вес/объем) раствор хлорида никеля (II) и 10 мМ перекись водорода.

Фракционирование и очистка CYP2B4. Осажденные бактериальные клетки ресуспендировали на Potter-Elvehjem гомогенизаторе в растворе, содержащем 10 мМ К-фосфатный буфер (pH 7,4), 500 мМ NaCl, 0,1 мМ EDTA, 20% глицерин, 50 мкМ PMSF и 0,1 мг/л лизоцим. Далее все операции проводили при +4°C. Раствор инкубировали 30 минут, при мягком перемешивании; затем клетки разрушали ультразвуком (MSE дезинтегратор, 150W, 3 \times 30 сек) и осаждали при 10 000 g. В надосадочной жидкости фракцию цитохромов солюбилизировали Emulgen 913 (10%-ный раствор детергента вносили дробно в течение часа до конечной концентрации 1%), после чего собирали гемопротеин-содержащую фракцию ультрацентрифугированием (150 000 g; 60 мин). Фракцию CYP450 2B4, в зависимости от характера образцов, чистили на колонке с октил-сефарозой [17] и/или на соответствующих аффинных сорбентах. Хроматографию на глутатион-сефарозе и протеолитическое расщепление тромбином для рекомбинантных белков с GST доменом проводили, как описано ранее [11]. Фракционирование на

сорбенте Ni-NTA ("QUIAGEN", США) [18] и хитиновой смоле ("New England Biolabs") проводили согласно рекомендациям фирм-производителей.

Определение содержания CYP450. Содержание цитохрома P450 определяли спектрофотометрически по образованию карбоксикомплекса восстановленной формы гемопротейна [19] на спектрофотометре Hitachi 557 ("Hitachi", Япония). Опытная и контрольная кюветы содержали 600 мкг суммарного белка фракции в конечном объеме 700 мкл 50 мМ HEPES буфера, pH 7,4, 1 мМ DTT, 1 мМ EDTA, 0,4% эмульген-913. Гемопротейн в опытной и контрольной кювете переводили в восстановленное состояние добавлением нескольких кристаллов дитионита натрия. После насыщения опытной кюветы CO в течение 1 мин, записывали разностный спектр поглощения. Концентрацию цитохрома P450 2B4 определяли по разности величин оптической плотности при 450 и 490 нм. Коэффициент молярной экстинкции восстановленного CYP450 считали равным $91 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Определение 7-пентоксирезорурфин O-деалкилирующей активности рекомбинантных P450 2B4 в микросомальной фракции. O-деалкилирование 7-пентоксирезорурфина определяли прямым флуориметрическим методом [20] с небольшими модификациями при 30°C по образованию продукта реакции резорурфина при 570 нм (λ возбуждения = 540 нм) на флуориметре LS 50B ("Perkin-Elmer", Великобритания). Реконструируемая энзиматическая система (0,7 мл) содержала 0,1 нмоль CYP450 2B4, 0,2 нмоль NADPH-цитохром редуктазы, 8 мкМ 7-пентоксирезорурфина (в метаноле) и 5 мМ β -циклодекстрина в 100 мМ буфере HEPES, pH 7,4. Реакционную смесь преинкубировали 30 мин. при комнатной температуре и реакцию начинали добавлением NADPH до конечной концентрации 0,4 мМ. В качестве стандарта использовали 190 мкМ раствор резорурфина. Для количественного анализа результатов использовали программу "SPLAB4" [21]. Результаты выражали в нмоль резорурфина/(мин \times нмоль CYP450 2B4).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. На основе полученных конструкций (pZE1-4 - см. "Методика") и штаммах *E. coli* были собраны экспрессионные системы, индуцибельно продуцирующие различные белковые кассеты (рис. 1).

В качестве реципиентов для конструкций pZE1 и pZE4 использовали штаммы *E. coli* BL 21 (DE3), BL 21(DE3)pLysS и JM 109(DE3)pLysS. Штаммы (DE3)pLysS несут ген T7 РНК полимеразы, клонированной на бактериальной хромосоме как λ -лизоген и продуцируют T7 лизоцим, ингибитор T7 РНК полимеразы. Таким образом, блокируется низкий уровень T7 полимеразной активности вплоть до индукции ИПТГ. Наряду с этим, лизоцим, экспрессируемый с гена pLysS, позволяет упрощать процедуру разрушения клеточных стенок путем замораживания [22]. Для изучаемых систем были оптимизированы условия экспрессии на основании существующих подходов [7, 14]. Подобранные условия 1) аэрации (оптимальные объемы колбы, культуральной жидкости, их отношение; интенсивность качания), 2) инкубации (температура, время экспрессии) и 3) индукции (доза IPTG и специфических добавок) изложены в разделе "Методика".

Методом иммуноблоттинга с поликлональными антителами мышей, полученными против цитохрома P450 2B4, выделенного из тканей кролика (рис. 2.) было показано наличие полноразмерных продуктов экспрессии. Наряду с этим выявлен частичный автопротеолиз для интеин-содержащих последовательностей. Известна важная роль природы терминальной аминокислоты для автопротеолиза

in vivo С-концевых конструкций на основе белка интеина [23]. Так состыковка аминокислот Arg-Cys белка мишени и интеина соответственно, стимулирует до 75% автопротеолитической активности кассеты *in vivo*. Поэтому за С-концевым триплетом для Arg491 к последовательности 2B4 был добавлен GGA триплет для аминокислоты глицина (см. Методику и рис. 3). Также известно, что в случае терминального положения глицина перед гибридным интеином автопротеолиз *in vivo* не наблюдается [23]. В нашем опыте, по данным вестерн-блоттинга, полноразмерный продукт экспрессии составлял больше половины материала (при экспрессии в течении 36 часов после индукции) с постепенным автопротеолизом (в случаях экспрессии в течении 72-х часов после индукции и более). Поскольку автопротеолиз *in vivo* в оптимальных условиях экспрессии составлял в сконструированной нами гибридной кассете менее 50%, изучаемая система подходила для очистки цитохрома по стандартной схеме для гибридов с интеин/CBD [15].

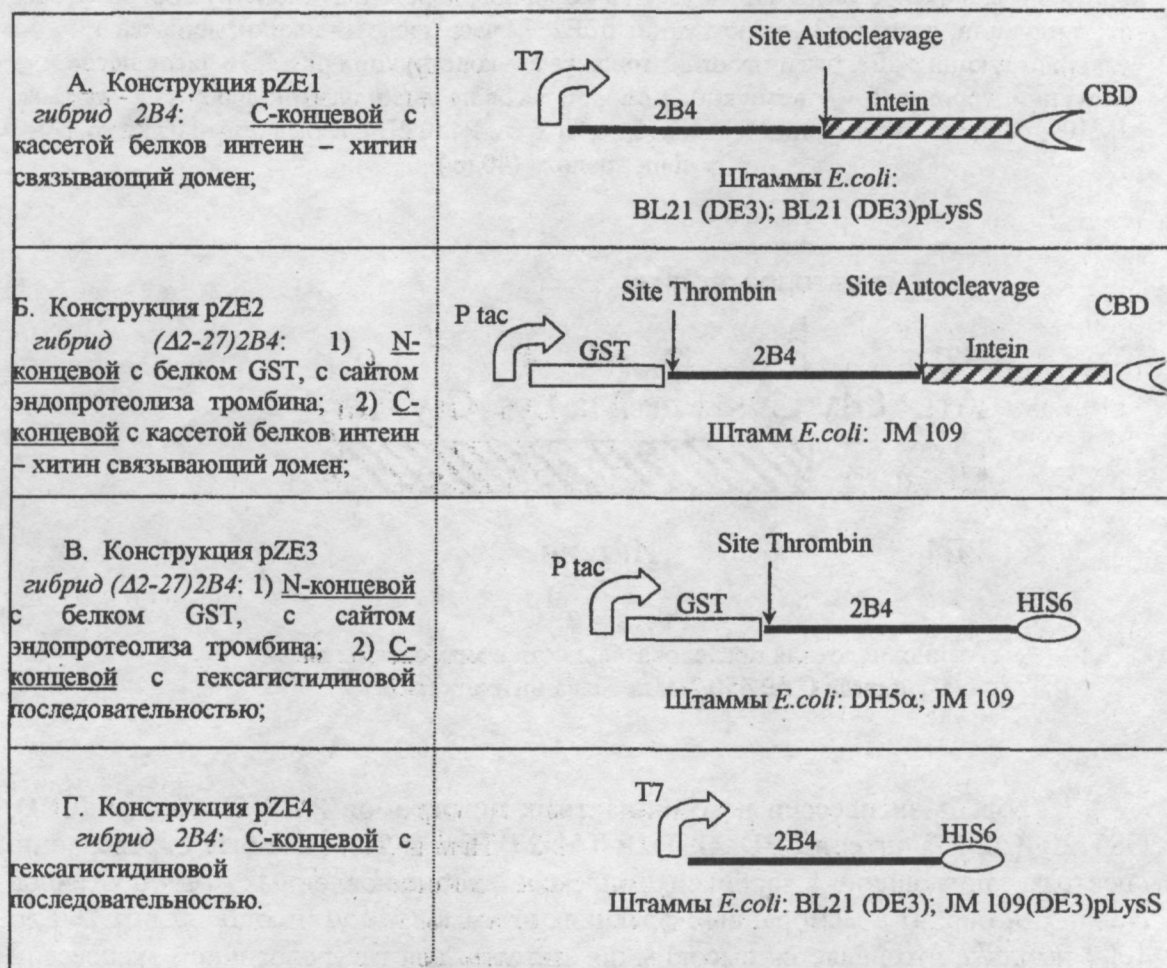


Рисунок 1.
Экспрессия CYP450 2B4 с различными концевыми аффинными группами в клетках *E.coli*.



Рисунок 2.

Иммуноблоттинг клеток *E. coli*, экспрессирующих цитохром P450 2B4 с различными концевыми аффинными группами. Дорожка 1 - маркерные белки молекулярного веса с положением, фиксированным проколами в мембране; дорожка 2 - конструкция pZE2, без индукции; дорожка 3 - конструкция pZE2, 72 часа после индукции; дорожка 4 - конструкция pZE3, без индукции; дорожка 5 - конструкция pZE3, 36 часов после индукции; дорожка 6 - конструкция pZE4, 36 часов после индукции; дорожка 7 - штамм JM109, 48 часов экспрессии; дорожка 8 - цитохром P450 2B4, выделенный из микросом печени кролика (40 нг).

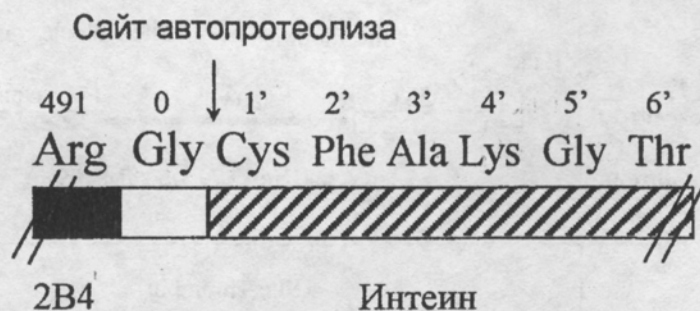


Рисунок 3.

Аминокислотная последовательность в месте состыковки гибрида CYP 450 2B4 и белка интеина (pZE1,2).

Уровень экспрессии рекомбинантных цитохромов P450 2B4/интеин/CBD, GST/2B4(Δ 2-27)/интеин/CBD, GST/2B4(Δ 2-27)/His6 и 2B4/His6 был определен по спектрам поглощения карбоксикомплексов восстановленных гемопротеинов (табл. 1. и рис. 4) в мембранных фракциях штаммов *E. coli* и составлял от 200 до 1000 нмоль/л, что является высоким показателем для гетерологичной экспрессии CYP450 2B4 [24]. В отдельных экспериментах для конструкции pZE3 в штамме JM 109 выход P450 достигал 2000 нмоль/л [25].

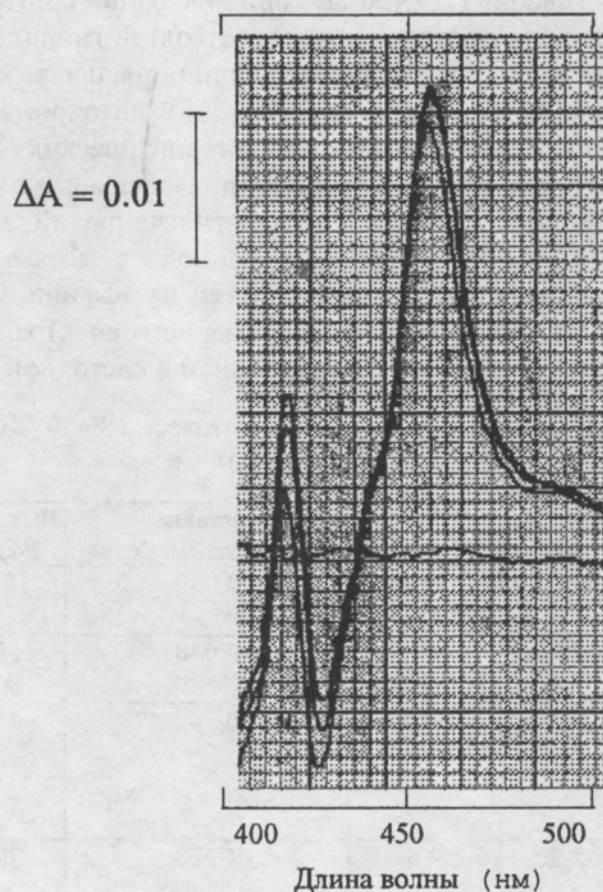


Рисунок 4.

Разностные (Fe^{2+} против $\text{Fe}^{2+} \text{CO}$) спектры поглощения мембранной фракции штамма JM 109(DE3)pLysS, содержащего конструкцию pZE4 для экспрессии P450 2B4/HIS6 (при концентрации белка в образце 1,8 мг/мл).

Таблица 1. Содержание цитохрома P450 2B4 в различных системах экспрессии *E.coli*

Экспрессионная конструкция	Экспрессионная система (штамм <i>E.coli</i> ; промотор)	Экспрессионная кассета 2B4	Уровень экспрессии (нмоль/л)
pZE1	BL 21(DE3); T7	2B4/Intein/CBD	300 – 600
pZE1	BL 21(DE3)pLysS; T7	2B4/Intein/CBD	400 – 900
pZE2	JM 109; Ptac	GST/2B4(Δ 2-27)/Intein/CBD	600 - 1000
pZE3	DH5 α ; Ptac	GST/2B4(Δ 2-27)/His6	700 - 900
pZE3	JM 109; Ptac	GST/2B4(Δ 2-27)/His6	700 - 1000
pZE4	BL 21(DE3); T7	2B4/His6	400 - 600
pZE4	JM 109(DE3)pLysS; T7	2B4/His6	600 - 1000

Мембранную фракцию CYP450, полученную на первом этапе этой работы, предварительно чистили на колонке с октил-сефарозой (только для полноразмерных форм цитохрома P450 2B4) [17] и/или наносили на соответствующий аффинный сорбент: Ni-NTA-сефарозу (для белков с гексагистидином), глутатион-сефарозу (для белков с GST), хитиновую смолу (для

гибридов с интеином). На этапе очистки с использованием хитиновой колонки происходила полная инактивация СУР450 2В4 при инкубации с дитиотрептолом в концентрациях, требуемых для протекания автопротеолиза гибридного белка (от 40 до 5 мМ). В результате была показана принципиальная невозможность использования стандартного протокола очистки [15] цитохрома Р450 2В4 с использованием хитинового сорбента и автопротеолитических свойств белка интеина, присоединенного с С-конца. В табл. 2 приведены данные по очистке рекомбинантного цитохрома Р450 2В4 с олигогистидиновой последовательностью (из конструкции рZE4, экспрессированной в штамме *E.coli* JM 109(DE3)pLysS). Удельная активность после очистки на аффинном сорбенте Ni-NTA возрастает в 101,7 раз. При этом выход суммарного спектрально активного препарата составлял 30% по сравнению с содержанием в клеточной биомассе.

Таблица 2. Очистка полноразмерной формы цитохрома Р450 2В4 с С-концевой гексагистидиновой последовательностью (система рZE4).

Стадия очистки	Белок (мг)	Р450 (нмоль)	Уд. содержание Р 450 (нмоль/мг белка)	Выход (%)	Очистка (раз)
1. Бактериальные клетки	740,0	31,4	0,042	100	1,0
2. Солюбилизованный материал	378,0	18,2	0,048	58	1,1
3. Фракция после хроматографии на колонке с октил-сефарозой	26,1	14,2	0,544	45	13,0
4. Фракция после хроматографии на колонке с Ni-NTA-сефарозой	2,2	9,4	4,273	30	101,7

Кинетические параметры реакции О-деалкилирования 7-пентоксирезорифина, катализируемой полноразмерной формой СУР450 2В4 с С-концевой гексагистидиновой последовательностью (выделенной после экспрессии конструкции рZE4) и GST-(Δ2-27)2В4 гибрида (после экспрессии в модифицированных нами условиях конструкция рGEX-KN, [7]) приведены в табл. 3. Как видно из таблицы, V_{\max} модифицированного СУР 2В4 возрастает в 3,11 раз после стадии очистки на колонке с октил-сефарозой. Кроме того, V_{\max} очищенного препарата полноразмерного цитохрома примерно в 2 раза выше, чем у его (Δ2-27) аналога (из конструкции рGEX-KN). Эти данные подтверждают предыдущие наблюдения, демонстрирующие понижение каталитической активности усеченного аналога цитохрома Р450 2В4 (Δ2-27) [6].

Наряду с этим, в нашем эксперименте показано, что введение С-концевой гексагистидиновой последовательности не влияет на каталитические свойства цитохрома Р450 2В4 в реакции О-деалкилирования 7-пентоксирезорифина.

Созданные нами системы продукции аналогов СУР450 2В4 в клетках *E.coli* и отработанные условия экспрессии и аффинной очистки рекомбинантных белков открывают перспективы для дальнейших структурно-функциональных исследований данного цитохрома. Например, вектор рZE3, несущий кассету GST/2В4/HIS6, перспективен для получения водорастворимых аналогов

цитохрома P450 2B4, поскольку значительно облегчает процедуру освобождения препарата рекомбинантного белка от сайт-специфических протеаз – тромбина, фактора Ха [26]. С-концевая HIS6–последовательность также может использоваться для иммобилизации рекомбинантных цитохромов на поверхности электродов, что может оказаться полезным при создании сенсоров на основе P450 2B4.

Таблица 3. Каталитическая активность полноразмерной формы цитохрома P450 2B4 с С-концевой гексагистидиновой последовательностью на этапах очистки в реакции О-деалкилирования 7-пентоксирезорфуфина.

Стадия очистки модифицированного CYP450 2B4	V_{max} , нмоль продукта/(мин×нмоль P450)	
	2B4HIS6 (pZE4)	(Δ2-27)2B4 (pGEX-KN)
До стадии очистки ¹⁾	0,46	-
Очищенный препарат ²⁾	1,87	0,95

1) – мембранная фракция препарата 2B4HIS6 (pZE4); 2) – препарат, очищенный на колонке с октил-сефарозой (для белка 2B4HIS6) и глутатион-сефарозой (для белка (Δ2-27)2B4)

Авторы выражают благодарность И.И.Карузиной за препараты P450 2B4 и P450-NADPH-редуктазы, Е. Ф. Колесановой за предоставленные поликлональные антитела против белка CYP450 2B4, также Е.В.Бобровниковой за помощь в снятии каталитических характеристик препаратов P450.

Работа выполнена при частичном финансировании со стороны Фонда Эльба (Италия), а также поддержана грантами ИНТАС 96-1549 и ИНКО-КОПЕРНИКУС № ERB3512PL965070 (контракт № ERBIC15CT960810)

ЛИТЕРАТУРА

1. Porter T.D. and Larson J.R. (1991) Meth.Enzymol. **206**, 108-111.
2. Waterman M.R. (1994) Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol. **68**, 37-66.
3. Waterman M.R., Jenkins C. M., Pikuleva I. (1995) Toxicol. Lett. **82/83**, 808-813.
4. Scheller U., Juretzek T., Schunck W.-H. (1996) Meth. Enzymol. **272**, 65-75.
5. Bridges A., Gruenke L., Chang Y.-T. et al. (1998) J. Biol. Chem. **273**, 17036-17045.
6. Lehnerer M., Schulze J., Pernecky S.J. (1998) J. Biochem. (Tokyo). **124**, 396-403.
7. Pernecky S.J., Olken N.M., Bestervelt L.L., Coon M.J. (1995) Arch. Biochem. Biophys. **318**, 446-456.
8. Gasser R, Negishi M, Philpot R.M., (1988) Mol. Pharmacol. **33(1)**, 22-30.
9. Kedzie K.M., Philpot R.M., Halpert J.R. (1991) Arch. Biochem. Biophys. **291**, 176-186.
10. Pernecky S.J., Larson J.R., Philpot R.M., and Coon M.J. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **90**, 2651-2655.
11. Vaz A.D.N., Pernecky S.J., Raner M.J., Coon M.J. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **93**, 4644-4648.
12. Larionov V., Kouprina N., Graves J. et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **93**, 491-496.
13. Сидорович В.Е. (2000) Автореферат диссертации. Москва.
14. Соколов Н.Н., Александрова С.С., Омельянюк Н.М. и др. (1999) Вopr. мед. химии. **45**, 24-29.
15. New England Biolabs CIIA (1998) Каталог.

16. Towbin J., Staehelin T., Gordon J. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76, 4350-4354.
17. Imai Y., Hashimoto-Yutsudo C., Satake H. et al. (1980) J. Biochem. (Tokyo). 88(2), 489-503.
18. Hochuli E., Dobeli H., Schacher A. (1987) J. Chromatogr. 411, 177-184.
19. Omura T. and Sato R. (1964) J. Biol. Chem. 239, 2370-2378.
20. Prough R.A., Burke M.D., and Mayer R.I., (1978) Meth. Enzymol. 52C, 372-377
21. Davidov D.R., Deprez E., Hoa G.H.B. et al. (1995) Arch. Biochem. Biophys. 320, 330-344.
22. Novagen CIIA (1998) Каталог.
23. Chong S, Mersha F.B., Comb D.G. et al. (1996) Gene. 192, 271-281.
24. Coon M.J., Pernecky S.J. (1996) Methods Enzymol. 272, 25-34.
25. Jgoun A.A., Sidorovich V.E., Eldarov M.A. et al. (1998) 12th International Symposium on MDO, Montpeller, abstract 131.
26. Prozorovsky T., Schuck W.H, Archakov A.I. (2000) International workshop "From sequence to function: experimental and bioinformatic studies of cytochrome P450 superfamily", Moscow, p.62.

Поступила 13.01.2001.

HETEROLOGOUS EXPRESSION OF EUKARYOTIC CYTOCHROMES P450 **1. HETEROLOGOUS EXPRESSION OF CYTOCHROME P450 2B4 IN *E. COLI* AS** **FUSION PROTEINS WITH DIFFERENT AFFINITY PURIFICATION TAGS**

A.A.JGOUN¹, M.A.ELDAROV¹, L.I.SOLODAR², N.N.SOKOLOV²,
A.I. ARCHAKOV², K.G.SKRYABIN¹

¹Centre "Bioengineering" RAS, Prospect 60-letya Otyabrya, 7/1, Moscow 117571;
tel/fax: (095) 135-62-19/(095) 135-05-07; e-mail: Zhgun@biengi.msk.su

²Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry RAMS, Pogodinskaya 10, Moscow 119832;
tel/fax: (095) 246-33-80/(095) 245-08-57; e-mail: sokolov@medic.ibmh.msk.su

The expression levels of cytochrome P450 2B4 variants with N- and C-terminal modifications were compared and some of the enzymatic characteristics of recombinant proteins studied. Following C-terminal hybrids for CYP2B4 gene were constructed: 1) with intein-chitin binding domain cassette 2) with hexahistidine tag. These modifications were combined with P450 2B4 glutathione-S-transferase N-terminal fusions [Pernecky S.J., et al., (1995) Arch. Biochem. Biophys., 318, 446-456]. The obtained constructs provided for the synthesis of full-length protein products in *E. coli* cells with holoenzyme yield at the levels of 200-1000 nmoles/l of the bacterial culture. Partial *in vivo* proteolysis was observed for C-terminal fusions with intein moiety despite the presence of glycine amino acid residue at the junction of two proteins. The principle inapplicability of standard purification scheme for isolation of P450 2B4-intein fusions is demonstrated, since the P450 domain is inactivated at 40 mM DTT concentrations. The recombinant full-length CYP 2B4 with C-terminal oligohistidine tail was expressed under the control of T7 promoter and purified using immobilized metal-ion chelating chromatography. The C-terminal hexahistidine tag does not affect the catalytic properties of recombinant enzyme in 7-pentoxoresorufin O-dealkylation reaction.

Key words: CYP 450 2B4, heterologous expression, *E. coli*, Ni-NTA, intein