

ПОЛУЧЕНИЕ ШТАММА *PICHIA PASTORIS* - ПРОДУЦЕНТА РЕКОМБИНАНТНОГО ХИМЕРНОГО БЕЛКА SUMO3-АРОА-I И ЗРЕЛОГО БЕЛКА АРОА-I ЧЕЛОВЕКА

Мамаев А.Л., Пыхтина М.Б., Беклемишев А.Б.

ФГБНУ «НИИ биохимии», Новосибирск, e-mail: alexeymamaev@inbox.ru

Целью настоящего исследования было получение рекомбинантного зрелого аполипопротеина А-I (apoA-I) человека. В результате работы был сконструирован рекомбинантный штамм дрожжей *Pichia pastoris*, продуцирующий химерный полипептид, включающий с N-конца аминокислотную последовательность убиквитин-подобного белка SUMO3, а с C-конца – зрелого apoA-I человека. Установлено, что рекомбинантный химерный белок SUMO3-apoA-I с высокой эффективностью синтезировался в клетках дрожжей *P. pastoris*, секретировался в культуральную жидкость и не вызывал лизис клеток дрожжей, который происходил в случае прямой экспрессии гена зрелого apoA-I человека в клетках *P.pastoris*. Зрелый apoA-I получали с помощью ферментативного гидролиза химерного белка SUMO3-apoA-I SUMO3-специфичной протеазой SP2. Полученный рекомбинантный зрелый apoA-I человека по молекулярной массе соответствовал природному apoA-I, его чистота достигала 90 %, и общий выход составил около 400 мг/л.

Ключевые слова: клонирование, экспрессия гена, apoA-I, SUMO3, *Pichia pastoris*, штамм-продуцент.

PREPARATION OF *PICHIA PASTORIS* STRAIN PRODUCING RECOMBINANT CHIMERIC PROTEIN SUMO3-APOA-I AND A MATURE HUMAN APOA-I

Мамаев А.Л., Pykhtina M.B., Beklemishev A.B.

Research Institute of Biochemistry, Novosibirsk, e-mail: alexeymamaev@inbox.ru

The aim of this study was to obtain the mature recombinant human apolipoprotein A-I (apoA-I). As a result of the work the recombinant yeast strain *Pichia pastoris*, producing a chimeric polypeptide comprising amino acid sequence SUMO3 from N-terminus, and mature human ApoA-I at C-terminus, was constructed. It was found that the recombinant chimeric protein SUMO3-apoA-I was synthesized in the *P. pastoris* yeast cells with high efficiency, was secreted into the culture fluid and did not cause lysis of producer cells which was occurred in the case of direct gene expression of the mature human apoA-I. Mature ApoA-I was obtained by enzymatic hydrolysis of the chimeric protein SUMO3-apoA-I using SUMO-specific protease SP2. The molecular weight of the resulting mature recombinant human apoA-I corresponded to the molecular weight of natural apoA-I, the purity of the protein was 90% and the overall yield was about 400 mg / L.

Keywords: cloning, gene expression, apoA-I, SUMO3, *Pichia pastoris*, producing strain.

Аполипопротеин А-I (apoA-I) человека является основным белковым компонентом липопротеинов высокой плотности (ЛПВП) и имеет широкий спектр физиологических функций, включающих участие в регуляции метаболизма холестерина и уровня липидов в крови, а также обладающих противовоспалительными и антиокислительными свойствами. [5, 8]. Кроме того, apoA-I в составе ЛПВП осуществляет в организме транспорт витаминов, стероидных гормонов и различных ксенобиотиков [2]. Эти свойства apoA-I и ЛПВП делают их перспективными кандидатами в качестве антисклеротических препаратов, а также как природных переносчиков противоопухолевых препаратов гидрофобной природы, антибиотиков и диагностических агентов. Функциональная значимость ЛПВП и их белкового компонента apoA-I для терапевтических и исследовательских целей обуславливает необходимость разработки и совершенствования методов его получения.

Выделение ароА-I из сыворотки крови человека имеет ряд недостатков, таких как низкий выход белка, высокая стоимость из-за ограниченных объемов доступной донорской крови, опасность вирусной контаминации и другие, что не позволяет достичь промышленных объемов производства и существенно ограничивает применение нативного ароА-I в медицине. Получение рекомбинантного ароА-I человека методами генной инженерии представляется наиболее перспективным подходом к достижению крупномасштабного производства этого белка.

Получение рекомбинантного химерного ароА-I в клетках *E. coli* зачастую характеризуются низким выходом белка и его загрязненностью эндотоксинами. С этой точки зрения получение рекомбинантного ароА-I в системе дрожжей *Pichia pastoris* представляет особый интерес, поскольку позволяет получать очищенные от эндотоксинов белки, секретируемые в культуральную жидкость и с гораздо большим выходом, чем в *E. coli*. Feng M.Q. с соавт. получали рекомбинантный ароА-I в дрожжах *Pichia pastoris*, однако выход секретируемого белка ароА-I составил всего 90 мг на литр, что является недостаточным для промышленного производства [3].

В данной работе для получения зрелого ароА-I человека предлагается использовать рекомбинантный химерный белок SUMO3-ароА-I, включающий с N-конца аминокислотную последовательность убиквитин-подобного белка SUMO3 человека, слитую с C-конца с аминокислотной последовательностью зрелого белка ароА-I человека. Предполагается, что SUMO3-специфичная протеаза SP2 будет распознавать аминокислотную последовательность SUMO3 в N-концевой области химерного белка и осуществлять высокоспецифичный гидролиз пептидной связи между C-концевым аминокислотным остатком SUMO3 и N-концевым аминокислотным остатком целевого белка в составе химера.

Материалы и методы

Реактивы: акриламид, N,N'-метилен-бисакриламид, додецилсульфат натрия (SDS), персульфат аммония, N, N, N', N'-тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД), бромфеноловый синий, 2-меркаптоэтанол, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), канамицин, агароза, изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) корпорации «Sigma-Aldrich» (США). Дрожжевой экстракт, пептон, агар фирмы «Difco» (Великобритания). Ni-NTA-сефароза 6B-CL, набор для выделения ДНК из агарозного геля фирмы «Qiagen» (США). Набор для ПЦР с полимеразой REDTaq фирмы «Sigma-Aldrich» USA. Набор для ПЦР с использованием высокоточной полимеразы Phusion (ThermoFisher Scientific USA). Набор для лигирования фрагментов ДНК с применением ДНК-лигазы фага T4 фирмы «Сибэнзим» (РФ, Новосибирск). ТХУ (трихлоруксусная кислота), фенол, хлороформ, этиловый, изоамиловый и изопропиловый спирты, кислоты, щелочи, соли квалификации «ХЧ» или «ОСЧ»

производства «Реахим» (Россия). Эндонуклеазы рестрикции – от компании «Сибэнзим» (РФ, Новосибирск).

Штамм *Escherichia coli*: BL 21 (DE3) {F⁻ ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])}.

Штамм *Pichia pastoris*: X-33

Плазмидные ДНК: pJ201 (DNA2.0, США), pPsecSUMO3 (Lifesensors, USA).

Методы

Проектирование синтетического гена apoA-I

Нуклеотидная последовательность синтетического гена apoA-I человека была спроектирована и оптимизирована по кодоновому составу для экспрессии в *P. pastoris* с использованием компьютерной программы «Gene designer» (фирма “DNA 2.0”, США). Кроме того, в проектируемом гене apoA-I человека были выявлены и заменены пары кодонов, которые, по данным [4], затрудняют или даже останавливают трансляцию мРНК. Оптимизированный ген зрелого белка ApoA1 был синтезирован и клонирован по сайтам рестрикции XhoI и SalI в составе коммерческого плазмидного вектора pJ201.

Конструирование рекомбинантной плазмиды pPsecSUMO3-apoA-I

Синтетический ген зрелого apoA-I был амплифицирован с вектора pJ201-apoA-I методом ПЦР с помощью термостабильной полимеразы Phusion. При амплификации использовали праймеры, достраивающие на 5'-концах 2-х цепей ампликона сайты рестрикции BsmBI и XbaI: праймер №1 5'-CAGCGTCTCTAGGTGATGAGCCACCACAGTC-3' и праймер №2 CGTCTAGATCATTTGCGTGTTAACTTCTTAGTG-3'. Ампликон гена apoA-I гидролизовали эндонуклеазами рестрикции BsmBI и XbaI и с помощью ДНК-лигазы фага T4 встраивали в плазмиду pPsecSUMO3, предварительно линейаризованную рестриктазой BsmBI. Полученной лигазной смесью трансформировали клетки *E.coli* BL21 (DE3). Отбор клонов, содержащих рекомбинантную плазмиду pPsecSUMO3-apoA-I, проводили на агаризованной среде LB, содержащей 50 мкг/мл зеоцина. Наличие целевой ДНК-вставки определяли методом ПЦР колоний. Клон, содержащий плазмиду pPsecSUMO3-apoA-I, использовали для её препаративной наработки.

Получение штамма дрожжей *Pichia pastoris* – продуцента рекомбинантного химерного белка SUMO3-apoA-I

Трансформацию компетентных клеток дрожжей *Pichia pastoris* шт. X-33 проводили плазмидой pPsecSUMO3-apoA-I, предварительно гидролизованной рестриктазой BstXI. Отбор трансформированных клонов осуществляли на селективной агаризованной среде ЛБ, содержащей 500 и 2000 мкг/мл зеоцина. Отобранные колонии дрожжей выращивали в течение 2 суток на орбитальном шейкере при 300 об/мин в среде BMGY, после чего вносили

индуктор метанол до 0,5 %. По окончании индукции клетки осаждали центрифугированием при 3500 g в течение 20 мин при +4 °С. Белки из супернатантов осаждали 5 % ТХУ. Осадки промывали ацетоном и анализировали электрофорезом в SDS-ПААГ. Клон, продуцирующий наибольшее количество целевого химерного полипептида, отбирался для дальнейшей работы.

Получение химерного полипептида SUMO3-ароА-I

Клон продуцент химера SUMO3-ароА-I выращивали в 50 мл среды BMGY в течение 2 суток на орбитальном шейкере при 300 об/мин, после чего вносили индуктор метанол до 0,5%. На 4-е сутки после индукции клетки осаждали центрифугированием, а в супернатант вносили сульфат аммония до конечной концентрации 60 % от насыщения. Преципитаты белка осаждали центрифугированием при 14000 об/мин 20 минут при комнатной температуре. Полученный осадок, содержащий главным образом рекомбинантный химерный белок SUMO3-ароА-I человека, растворяли в фосфатно-солевом буфере (PBS) и диализовали против PBS в течение ночи при +4°С.

Гидролиз химера SUMO3-ароА-I с высвобождением зрелого ароА-I человека

Для ферментативного гидролиза химерного белка SUMO3-ароА-I использовали ранее полученный нами фрагмент (240 а.о.) рекомбинантной SUMO3-специфичной протеазы SP2 (SP2_f), содержащий аминокислотные остатки с 342 по 582 полноразмерного фермента (589 а.о.). Химерный белок SUMO3-ароА-I инкубировали с SP2_f в PBS с 2 mM дитиотреитола в молярном соотношении химерный белок/фермент 200/1 в течение 3-х часов при +30 °С. Выделение и очистку зрелого белка ароА-I проводили с помощью аффинной хроматографии на колонке со смолой Ni-NTA в нативных условиях.

Результаты и обсуждение

Конструирование рекомбинантной плазмиды pPsecSUMO3-ароА-I и получение штамма продуцента химерного белка SUMO3-ароА-I

Оптимизированный для экспрессии в *Pichia pastoris* ген зрелого ароА-I был клонирован в составе вектора pJ201. Полученная плазида pJ201-ароА-I была использована в качестве ДНК-матрицы при амплификации гена зрелого ароА-I. Ампликон был клонирован в составе плазмиды pPsecSUMO3. Колонии, выросшие на селективной агаризованной среде ЛБ, содержащей 50 мкг/мл зеоцина, отбирали с помощью ПЦР с праймерами № 1 и № 2 на наличие целевых генов. Штамм дрожжей *Pichia pastoris* – продуцента рекомбинантного химерного белка SUMO3-ароА-I, получали путем трансформации дрожжей *Pichia pastoris* линеаризованной плазмидной ДНК pPsecSUMO3-ароА-I. Отбор рекомбинантных клонов проводили на агаризованной среде LB, содержащей антибиотик зеоцин в концентрации от 500 мкг/мл до 2000 мкг/мл. Отобранные клоны исследовали на способность продуцировать

целевой рекомбинантный белок с помощью электрофореза лизата клеток, индуцированных метанолом. По результатам электрофореза был отобран клон, продуцирующий наибольшее количество рекомбинантного химерного белка SUMO3-ароА-I (около 600 мкг/мл культуральной жидкости).

Ранее мы исследовали прямую экспрессию зрелого гена ароА-I в клетках *Pichia pastoris* [1]. При таком варианте экспрессии наблюдалось появление в культуральной среде наряду с целевым белком множества белков, синтезируемых *Pichia pastoris* (рис.1,А). Это свидетельствовало о имеющем место лизисе дрожжевых клеток, обусловленном, по-видимому, мембранолитическим действием ароА-I. В случае получения белка SUMO3-ароА-I лизиса дрожжевых клеток не наблюдалось и в культуральной жидкости присутствовал главным образом целевой белок SUMO3-ароА-I (рис.1,Б).

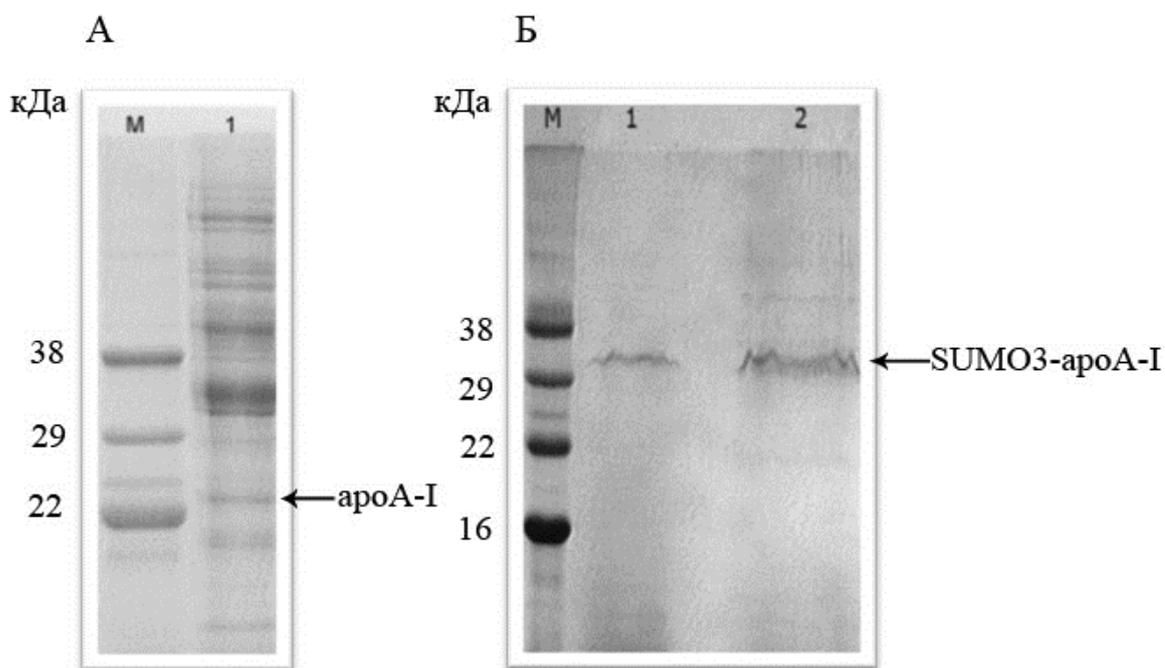


Рис.1. Электрофореграмма белков культуральной жидкости, полученной при экспрессии генов зрелого белка ароА-I человека и химерного полипептида SUMO3-ароА-I в клетках *P. pastoris*. (А) М – маркёр молекулярных масс; 1 – экспрессия гена зрелого белка ароА-I человека (Б) М – маркёр молекулярных масс; 1 и 2 – экспрессия гена химерного белка SUMO3-ароА-I человека, 1 – образец культуральной жидкости, 2 – образец культуральной жидкости, сконцентрированной в 5 раз

Получение зрелого аполипопротеина А-I человека путем ферментативного гидролиза рекомбинантного химерного белка SUMO3-ароА-I протеазой SP2_f

Выращивание клеток клона-продуцента химера SUMO3-ароА-I и индукцию синтеза белка проводили, как описано в методах. Белок осаждали сульфатом аммония, полученный осадок растворяли и диализовали против PBS. Чистота полученного рекомбинантного

химерного белка SUMO3-ароА-I человека составляла не менее 85 % по результатам электрофоретического анализа (рисунок не представлен).

Зрелый аполипопротеин А-I человека получали путем ферментативного гидролиза рекомбинантного химерного белка SUMO3-ароА-I протеазой SP2_f. Эта протеаза распознаёт аминокислотную последовательность SUMO3 в N-концевой области химерного белка и осуществляет высокоспецифичный гидролиз пептидной связи между С-концевым аминокислотным остатком SUMO3 и N-концевым аминокислотным остатком целевого белка в составе химера [6, 7]. Как видно из рис. 2, с увеличением количества протеазы повышается эффективность гидролитического расщепления белка SUMO3-ароА-I с образованием целевого зрелого ароА-I человека. Для наиболее полного гидролиза необходимо практически эквивалентное количество протеазы, однако, даже при этих условиях гидролизу подвергается не более 70 % молекул химера. Необходимость в избыточном внесении фермента может быть связана с недоступностью сайта протеолиза в химерном полипептиде, обусловленной конформацией этого белка. В пользу такого заключения свидетельствуют результаты наших ранних экспериментов, в которых был продемонстрирован полный гидролиз химерного полипептида SUMO3-GFP низкими концентрациями этой же рекомбинантной протеазы (данные не представлены).

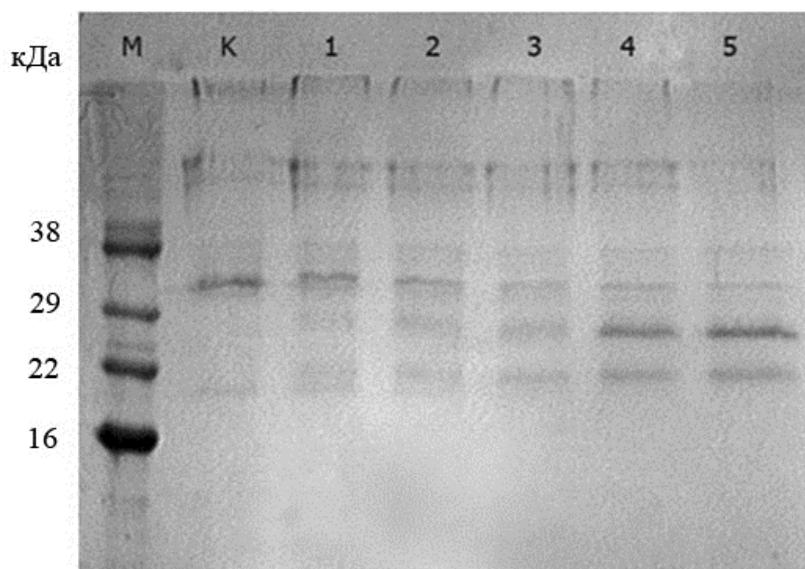


Рис.2. Электрофореграмма продуктов гидролиза химерного белка SUMO3-ароА-I протеазой SP2_f. М – маркер молекулярных масс; К – контроль (химер SUMO3-ароА-I не подвергнутый гидролизу протеазой SP2_f; (1-5) – химер SUMO3-ароА-I, гидролизованный разными количествами протеазы SP2_f: (1) – однократным количеством, (2) – 2-х кратным, (3) – 3-х кратным, (4) – 6-ти кратным, (5) – 10-ти кратным

По данным электрофоретического анализа хроматографически очищенный

рекомбинантный зрелый белок ароА-I по молекулярной массе (28,3 кДа) соответствовал природному ароА-I человека, его чистота составила не менее 90 % [рис. 3] с выходом около 400 мг/л.

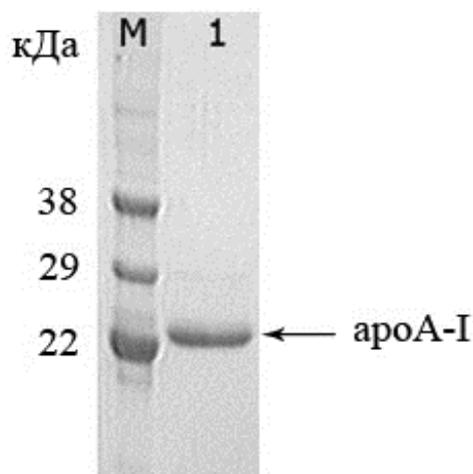


Рис.3. Электрофореграмма образца рекомбинантного зрелого белка ароА-I человека, полученного на конечной стадии очистки. М – маркёр молекулярных масс; 1 – зрелый рекомбинантный ароА-I

Заключение

Получение нативного аполипопротеина А-I человека в промышленных масштабах является актуальной задачей медицинской биотехнологии. Существующие способы получения рекомбинантного ароА-I генно-инженерными методами с помощью экспрессии в клетках *E. coli* имеют существенные недостатки, такие как: загрязнение целевого белка бактериальными эндотоксинами, сложность, трудоёмкость и сравнительно высокая экономическая затратность процедуры выделения и очистки, а также, как правило, низкий выход конечного целевого белка.

В настоящей работе в целях получения зрелого рекомбинантного ароА-I человека была предпринята попытка создания штамма *Pichia pastoris* – продуцента химерного полипептида SUMO3-ароА-I. Предполагалось, что синтезированный химер за счёт сигнальной последовательности SUMO3 будет эффективно секретироваться в культуральную жидкость, а входящий в его состав ароА-I не будет вызывать лизиса клеток. Получение же зрелого ароА-I можно будет осуществлять с помощью гидролиза химера SUMO3-специфической протеазы.

Результаты экспериментов свидетельствуют, что рекомбинантный химер SUMO3-ароА-I высокоэффективно синтезировался в клетках дрожжей *Pichia pastoris*, секретировался

в культуральную жидкость и не вызывал лизиса клеточных мембран штамма-продуцента. Гидролиз данного химера SUMO3-специфической протеазой позволил получить зрелый apoA-I человека, соответствующий по молекулярной массе нативному белку apoA-I. Для обеспечения протеолиза всех молекул химерного полипептида потребуются дополнительные исследования по подбору оптимальных условий реакции и оптимизации конструкции рекомбинантной SUMO3-специфической протеазы. Все это позволит существенно улучшить способ получения зрелого apoA-I человека, который будет положен в основу создания технологии промышленного производства белка для нужд медицины.

Список литературы

1. Мамаев А.Л., Беклемишев А.Б. Клонирование и анализ экспрессии синтетических генов аполипопротеина А-I человека в клетках *Escherichia coli* и метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris* // Сиб. научный мед. журнал. – 2014. – Т. 5. – С. 37–42.
2. Поляков Л.М., Часовских М.И., Панин Л.Е. Липопротеины – уникальная транспортная система для ксенобиотиков и биологически активных веществ // Успехи соврем. биол. – 1992. – Т. 112, № 4. – С. 601–608.
3. Feng M.Q., Cai Q.S., Song D.X., Dong J.B., Zhou P. High yield and secretion of recombinant human apolipoprotein AI in *Pichia pastoris* // Protein Expr. Purif. – 2006. – Vol. 46, № 2. – P. 337-42.
4. Hatfield G.W., Roth D.A. Optimizing scaleup yield for protein production. Computationally Optimized DNA Assembly (CODA) and Translation Engineering // Biotechnol. Annu Rev. – 2007. – Vol. 13. – P. 27-42.
5. Mahley R.W., Innerarity T.L., Rall SC. Jr., Weisgraber K.H. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function // J. Lipid Res. – 1984. – Vol. 25, № 12. – P. 1277-94.
6. Malakhov M.P., Mattern M.R., Malakhova O.A., Drinker M., Weeks S.D. SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins // J. Struct. Funct. Genomics. – 2004. – Vol. 5, № 1-2. – P. 75-86.
7. Marblestone J.G., Edavettal S.C., Lim Y., Lim P., Zuo X., Comparison of SUMO fusion technology with traditional gene fusion systems: enhanced expression and solubility with SUMO // Protein Sci. – 2006. – Vol. 15, № 1. – P. 182-9.
8. Tabet F., Rye K.A. High-density lipoproteins, inflammation and oxidative stress // Clin. Sci. – 2009. – Vol. 116, № 2. – P. 87-98.