



УДК 577.322

ЭКСПРЕССИЯ МУТАНТНЫХ ГЕНОВ ЦИТОХРОМА *c* ЛОШАДИ В *Escherichia coli*

© 1998 г. Д. А. Долгих[#], Р. Ф. Латышов*, З. Х. Абдуллаев, В. Колон**,
Х. Родер**, М. П. Кирпичников

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

* Институт белка РАН, Пуццоно Московской обл.;

** Раковый Центр Фокс Чейз, Филадельфия, Пенсильвания, США

Поступила в редакцию 26.12.97 г. Принята к печати 17.03.98 г.

Получены генно-инженерные конструкции для экспрессии в *Escherichia coli* мутантных вариантов гена цитохрома *c* лошади, в которых гены цитохрома экспрессируются совместно с геном гем-лигазы – белка, обеспечивающего ковалентную сшивку цитохрома с гемом. Анализ различных штаммов-продуцентов и подбор условий экспрессии позволили достичь уровня продукции до 10–15 мг белка с 1 л культуры, что на порядок выше достигнутого ранее уровня экспрессии в дрожжах. С помощью новой системы экспрессии получен ряд мутантных вариантов цитохрома *c* лошади.

Ключевые слова: цитохром *c*; гем-лигаза; экспрессия; мутагенез.

Цитохромы *c* – семейство гемсодержащих белков, участвующих в транспорте электронов [1, 2]. В отличие от других гемсодержащих белков в цитохромах *c* имеется ковалентная связь между гемом и полипептидной цепью, которая образуется с помощью специальных ферментов – гем-лигаз. Это осложняет экспрессию цитохромов *c* в бактериях, так как бактериальные гем-лигазы не обеспечивают эффективное образование ковалентной связи белка с гемом (по-видимому, из-за иной локализации ферментов в клетке) [3–5], а апоцитохром *c* не способен образовывать холоформу без ферментативной помощи [6]. Достигнутый же к настоящему времени уровень экспрессии цитохромов *c* в эукариотических системах, прежде всего в дрожжах [7, 8], составляет, как правило, доли миллиграмма белка с 1 л культуры, что существенно осложняет проведение с ними белково-инженерных работ. В то же время цитохромы *c*, несомненно, одни из наиболее интересных объектов для белковой инженерии, так как большое количество известных белков в этом семействе (и значительное количество расшифрованных пространственных структур) позволяет использовать их в качестве удобной модели для исследований структуры и механизма сворачивания белка.

Недавно был разработан новый подход к поиску центров нуклеации сворачивания белка для цитохрома *c* на основе теоретического анализа свыше 100 различных структур цитохромов [9], с помощью которого был предложен набор

точечных мутаций, позволяющий экспериментально проверить гипотезу нуклеации сворачивания. Согласно этой гипотезе, ключевую роль в самоорганизации белка играют несколько аминокислот, взаимодействующих между собой в начале процесса сворачивания белка и образующих центр нуклеации, вокруг которого быстро происходит дальнейшее сворачивание. В случае цитохрома *c* лошади это прежде всего аминокислоты в положениях 10 (N-спираль) и 97 (C-спираль). Очевидно, что мутации в центре нуклеации должны сильно изменять кинетику ренатурации белка. Часть таких мутаций была ранее введена нами в ген цитохрома *c* лошади, и мутантные гены были проклонированы в дрожжевой экспрессирующей системе [7], однако невысокий уровень экспрессии не позволил наработать достаточное количество мутантных белков для кинетических исследований.

Недавно появилось сообщение о создании генно-инженерной конструкции для коэкспрессии в *Escherichia coli* генов дрожжевого цитохрома *c* и гем-лигазы дрожжей, дающей возможность получать до 15 мг нативного гемсодержащего цитохрома *c* с 1 л культуры [10]. В настоящей работе мы сообщаем о конструировании и оптимизации системы экспрессии для получения цитохрома *c* лошади, в которой ген этого белка экспрессируется совместно с геном дрожжевой гем-лигазы, а также о получении ряда мутантных вариантов белка с использованием новой схемы его очистки. Использование предлагаемой системы экспрессии позволяет эффективно нарабатывать препаративные количества различных мутантных вариантов цитохрома *c* для исследования механизма сворачивания белка.

Получение генно-инженерной конструкции для экспрессии. Для клонирования гена цитохро-

Сокращения: SDS-ПААГ – полиакриламидный гель с додецилсульфатом натрия, IPTG – изопропил-β-D-тиогаляктопиранозид.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 336-80-11; e-mail: dolgikh@nmr.ru).

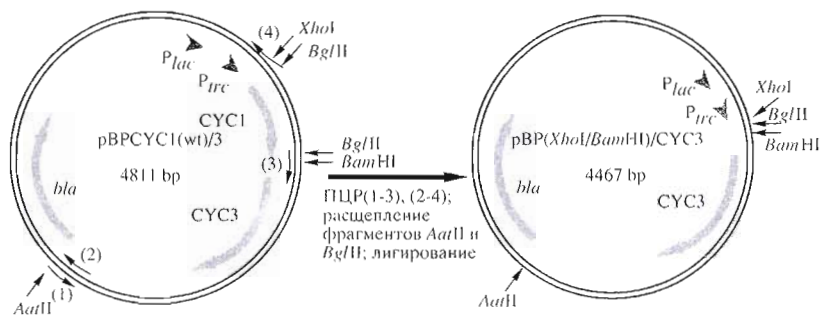


Рис. 1. Схема получения плазмиды рВР(XhoI/BamHI)/CYC3. Показаны олигонуклеотидные праймеры для ПЦР (1)–(4) и места их отжига на исходной плазмиде рВРСУС1(wt)/CYC3. P_{lac} и P_{irc} – тандем промоторов. Остальные пояснения в тексте.

ма с лошади была использована плаزمида рВРСУС1(wt)/3 [10], содержащая гены дрожжевых цитохрома *c* (CYC1) и гем-лигазы (CYC3) под двумя последовательными промоторами *lac* и *trc* (рис. 1). При этом плазмида была модифицирована с помощью ПЦР. Вначале были синтезированы четыре праймера для ПЦР. Два из них, (1) и (2), представляли собой комплементарные друг другу 20-членные олигонуклеотиды, соответствующие участку плазмиды с сайтом рестрикции *AatII*. Два других, более длинных праймера, (3) и (4), были комплементарны участкам плазмиды, соответствующим началу и концу гена дрожжевого цитохрома *c*. Каждый из них содержал на 5'-конце сайт рестрикции *BglII*; кроме того, праймер (3) включал в себя участок плазмиды с сайтом *BamHI*, а праймер (4) – новый сайт *XhoI* (отсутствующий в исходной плазмиде рВРСУС1(wt)/3). Были проведены две ПЦР с праймерами (1), (3) и (2), (4) и исходной плазмидой в качестве матрицы и наработаны два фрагмента модифицированной плазмиды – *AatII* – *BglII* и *BglII* – *AatII* (рис. 1), которые были сшиты между собой по названным сайтам. (В принципе, видимо, можно было провести только одну ПЦР с праймерами (3), (4), однако в этом случае нужно было получить фрагмент длиной около 4500 п.о., что сложнее технически.) В результате была получена новая плазмида рВР(XhoI/BamHI)/CYC3, в которой содержался ген цитохром-лигазы (CYC3), а вместо гена цитохрома *c* дрожжей был включен небольшой участок, содержащий новые сайты рестрикции *XhoI* (сразу после области Шайна–Дальгарно) и *BglII*.

Гены мутантных вариантов цитохрома *c* лошади нарабатывали для клонирования также с помощью ПЦР, используя в качестве матрицы плазмиду рАВ [7], содержащую мутантные гены и праймеры, несущие на 5'-концах сайты рестрикции *XhoI* и *BamHI*, по которым и проводили клонирование в полученной модифицированной плазмиде для экспрессии. Плазмиды с клонированными мутантными вариантами цитохрома проверяли секвенированием и использовали для трансформации *E. coli*. В результате в составе описанной экспрессирующей конструкции были получены гены следующих вариантов цитохрома с лошади: дикого типа, Н33N и двойных мутантов,

содержащих “фоновую” мутацию Н33N и одну из следующих мутаций: F10A, F10I, K13M, H26Q, L64A, L68A, Y74A, L94A, I95A, Y97A, Y97V. “Фоновая” мутация была введена, чтобы избежать неправильного образования лигандной связи гема с гистидиновым остатком в положении 33 при исследовании процесса сворачивания белка.

Экспрессия генов цитохрома *c*. Для анализа экспрессии генов цитохрома *c* в различных штаммах *E. coli* нами были использованы два гена цитохрома, а именно ген дикого типа и мутантный ген, соответствующий аминокислотным заменам Н33N и L94A. Плазмиды с названными генами, полученными на основе плазмиды рВР(XhoI/BamHI)/CYC3, были трансформированы штаммы *E. coli* HB2151, DH5α, JM109 и BL21. С каждой чашки отбирались три колонии, которыми засеивали пробирки с 3 мл среды SB [11], содержащей 1% глицерин. После 15–30 ч роста из пробирок отбирали по 1 мл культуры и осаждали в микроцентрифуге. При хорошей экспрессии осадок приобретал характерный розовый оттенок, по интенсивности которого проводилась предварительная оценка уровня экспрессии. Выяснилось, что наилучшая экспрессия достигается при выращивании культуры в течение ~24 ч в штамме JM109 и (несколько меньше) в HB2151. Штамм DH5α давал

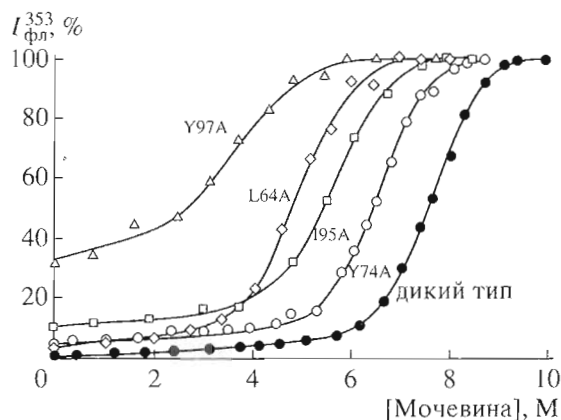


Рис. 2. Зависимость относительной интенсивности флуоресценции при 353 нм цитохрома *c* лошади и его мутантных вариантов от концентрации мочевины при их равновесном разворачивании мочевиной.

Уровень экспрессии гена цитохрома *c* лошади и его мутантных вариантов в *E. coli*. Для части белков приведена стабильность при денатурации мочевиной (точка полуперехода – см. рис. 2).

Вариант (мутация)	Уровень экспрессии (мг белка/1 л культуры)	Точка полуперехода при денатурации (моли мочевины)
Цитохром <i>c</i> (дикий тип)	10–12	7.6*
H33N	8–10	
F10A, H33N	Не детектируется	
F10I, H33N	2–3	
K13M, H33N	6–8	
H26Q, H33N	6–8	
L64A, H33N	8–10	4.8
L68A, H33N	6–8	
Y74A, H33N	5–7	6.4
L94A, H33N	12–15	
I95A, H33N	3–5	5.5
Y97A, H33N	4–6	3.8
Y97V, H33N	5–7	

* Данные для коммерческого препарата цитохрома *c* производства Sigma.

меньшую интенсивность окраски, а в штамме BL21 окраска вообще не наблюдалась. Так как при экспрессии дрожжевого цитохрома *c* в клетках HB2151 наблюдалась нестабильность экспрессии [10], мы проанализировали на примере мутанта H33N + L94A, как долго сохраняется окраска при последовательном заражении пробирок с культурой, когда из каждой 24-часовой культуры берется 30 мкл и заражается новая пробирка с 3 мл среды, которая используется в свою очередь для заражения новой пробирки через 24 ч, и т.д. Выяснилось, что в штамме JM109 окраска сохраняется по меньшей мере на протяжении 4–5 таких последовательных заражений, в то время как в штамме HB2151 она пропадала после 2–3 заражений. Поэтому для дальнейшей работы по экспрессии цитохрома *c* был выбран штамм JM109. Необходимо подчеркнуть, что экспрессия всегда осуществлялась без обычной индукции клеток с помощью IPTG, так как добавление индуктора в концентрации 0.05–0.5 мМ приводило к исчезновению экспрессии (как наблюдалось ранее и для дрожжевого цитохрома *c* [10]). Очевидно, тандем двух промоторов (*lac* и *trc*) обладает значительной силой и обеспечивает хорошую экспрессию за счет протекания промоторов, в то время как их индукция с помощью IPTG, по-видимому, приводит к перегрузке системы и резкому ухудшению ее работы.

Получение и тестирование мутантных белков. В таблице приведены варианты цитохрома *c* и уровень их синтеза в *E. coli* в конструкциях, полученных на основе плазмиды pVP(*XhoI/Vam-NI*)/СУСЗ. Видно, что уровень экспрессии генов весьма высок и доходит до 15 мг белка с 1 л культуры, причем наблюдается определенная корреляция эффективности экспрессии и значимости му-

тации с точки зрения гипотезы о центре нуклеации. Так, низкий уровень выхода продукта наблюдался в случае белков, содержащих мутации в районе контакта N- и C-концевых спиралей, а один из белков, содержащий мутацию в этом районе (F10A), вообще не удалось детектировать. Анализ стабильности части мутантных вариантов по разворачиванию в растворах мочевины (рис. 2, таблица) показывает, что из исследованных белков наименее стабилен именно мутант с заменой в районе контакта N- и C-концевых спиралей (Y97A), что также коррелирует с предположением о ключевой роли в структуре цитохрома *c* аминокислот, входящих в предполагаемый центр нуклеации.

Таким образом, в результате нашей работы получена новая эффективная система экспрессии гена цитохрома *c* лошади в *E. coli*, которая позволяет получать приблизительно на порядок больше белка с 1 л культуры, чем используемые ранее системы экспрессии гена цитохрома в дрожжах. Это позволило наработать ряд мутантных вариантов цитохрома *c* в количествах, достаточных для кинетических исследований, и провести тестирование части этих вариантов. Предварительный анализ мутантных белков показывает, что те из них, которые содержат мутации в местах, соответствующих предполагаемому центру нуклеации, обладают особенностями, отличающими их от остальных белков (более низкий уровень экспрессии, низкая стабильность). Очевидно, кинетические исследования мутантных вариантов цитохрома *c*, которые мы проводим в настоящее время, позволяют выявить роль аминокислот, входящих в центр нуклеации, в процессе сворачивания цитохрома и глубже понять механизм сворачивания белка.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы: реактивы производства фирм Sigma, Fisher, Serva, Bio-Rad, Difco и отечественного производства; T4-ДНК-лигаза и эндонуклеазы рестрикции – продукты фирм New England Biolabs и Pharmacia; ДНК-полимераза AmpliTaq (Perkin-Elmer).

Генно-инженерные методы. Выделение плазмид, расщепление эндонуклеазами рестрикции, лигирование, трансформацию и другие генно-инженерные работы выполняли по стандартным методикам [11, 12]. ПЦР проводили с помощью полимеразы AmpliTaq согласно методике фирмы-изготовителя.

Экспрессия генов мутантных вариантов цитохрома *c* в *E. coli* и выделение мутантных белков. Штаммы *E. coli*, содержащие плазмиды с мутантными генами цитохрома *c*, выращивали в течение 18–24 ч при 37°C и хорошей аэрации в SB-среде, содержащей 1% глицерин. Для препаративного выделения клетки, выращенные в 5–6 л среды, осаждали центрифугированием (5000 об/мин, 10 мин, 4°C), осадок ресуспендировали в ~80 мл 0.1 М Трис-НСl (рН 7.0) и разрушали с помощью установки French Press (American Instrument Corp.). Затем клеточный дебрис осаждали центрифуги-

рованием при 15000 об/мин (20 мин, 4°C), после чего проводили ступенчатое высаливание белков из супернатанта сульфатом аммония – при 50, 60 и 95% насыщения с последующим центрифугированием (15000 об/мин, 20 мин, 4°C). Полученный раствор содержал цитохром *c* и относительно небольшое количество (30–40%) других белков, не высаливающихся при 95% насыщения сульфата аммония. После этого супернатант диализовали в течение 1–2 сут против нескольких смн 50 мМ Na-фосфатного буфера (рН 7.0) и наносили на небольшую (объем ~10 мл) колонку с ионообменной смолой BioRex-70 (Bio-Rad), уравновешенную тем же буфером. После тщательной промывки колонки буфером для нанесения (5–10 объемов) белки элюировали 100 мл градиента NaCl от 0 до 0.6 М в том же буфере. Окрашенные в красно-коричневый цвет фракции, соответствующие цитохрому *c*, сходили с колонки в интервале концентраций NaCl 0.4–0.5 М, а затем анализировались электрофорезом в 15% SDS-ПААГ [13] и спектрофотометрически. Фракции, содержащие наиболее чистый белок, объединяли, освобождали от соли с помощью диализа и концентрировали. Чистота полученных мутантных вариантов цитохрома *c* составляла, по данным электрофореза, не менее 95%.

Количество белка. Расчет количества белка проводили по молярному коэффициенту поглощения $1.06 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ для окисленной формы цитохрома *c* при длине волны 409 нм. Перед определением концентрации белок окисляли 1 мМ $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$.

Спектры флуоресценции. Спектры флуоресценции измеряли с помощью спектрофлуориметра Aminco SFP-1000cs (American Instrument Corp.) с термостатируемым кюветным отделением. Измерения проводили при 20°C в 20 мМ Na-фосфатном буфере (рН 7.37). Концентрация белка составляла 0.1 мг/мл. Относительную интенсивность флуоресценции для каждого белка получали нормированием интенсивности флуоресценции при данной концентрации мочевины по интенсивности флуоресценции этого белка при максимальной концентрации мочевины.

Авторы выражают благодарность О.Б. Птицыну (Институт белка, г. Пуццано; National Institute of Health, Bethesda, USA) за постоянную поддержку работы и обсуждение результатов, F. Sherman и T. Cardillo (University of Rochester School of Medicine and Dentistry, Rochester, USA), а также W.B.R. Pollock (University of British Columbia, Vancouver, Canada) за предоставление плазмид pAB и pVPCYC1(wt)/3.

Работа была частично финансирована за счет гранта Российского фонда фундаментальных исследований (№96-04-49188) и гранта Fogarty (NIH/FIRCA).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Mattews F.S.* // *Progr. Biophys. Molec. Biol.* 1985. V. 45. P.1–56.
2. *Moore G.R., Pettigrew G.W.* *Cytochrome c: Evolutionary, Structural and Physicochemical Aspects.* B.: Springer-Verlag, 1990.
3. *McEwan A.G., Kaplan S., Donohue T.J.* // *FEMS Microbiol Lett.* 1989. V. 50. P. 253–258.
4. *Sambongi Y., Ferguson S.J.* // *FEBS Lett.* 1994. V. 340. P. 65–70.
5. *Pollock W.B., Voordouw G.* // *Biochimie.* 1994. V. 76. P. 554–560.
6. *Dumont M.E., Corin A.F., Campbell G.A.* // *Biochemistry.* 1994. V. 33. P. 7368–7378.
7. *Hickey D.R., Jayaraman K., Goodhue C.T., Shah J., Fingar S.A., Clements J.M., Hosokawa Y., Tsunawawa S., Sherman F.* // *Gene.* 1991. V. 105. P. 73–81.
8. *Colon W., Elove G.A., Wakem L.P., Sherman F., Roder H.* // *Biochemistry.* 1996. V. 35. P. 5538–5549.
9. *Ptitsyn O.B.* // *J. Mol. Biol.* 1997. In press.
10. *Pollock W.B., Dumont M.E., Rosell F.I., Mauk A.G.* // *FASEB J.* 1996. V. 10. P. 2235.
11. *Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A., Struhl K.* *Current Protocols in Molecular Biology.* N. Y.: Greene Publ. Assoc., Inc. and J. Wiley & Sons, Inc., 1993.
12. *Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.* *Molecular Cloning: a Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
13. *Laemmli U.K.* // *Nature.* 1970. V. 227. P. 680–685.

Expression of Mutant Genes for Horse Cytochrome *c* in *Escherichia coli*

D. A. Dolgikh*, R. F. Latypov**, Z. Kh. Abdullaev*, V. Kolon***, H. Roder***, and M. P. Kirpichnikov*

* *Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya, 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia*

** *Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow oblast, 142292 Russia*

*** *The Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA 19111, USA*

Here we describe genetically engineered constructs for the expression in *Escherichia coli* of genes for horse cytochrome *c* mutants. These constructs allow the expression of the cytochrome *c* genes together with heme-ligase, an enzyme which covalently links heme to cytochrome. Careful selection of producer strains and the adjustment of the conditions of expression provided for expression levels of 10–15 mg of protein per liter of culture. This is by an order of magnitude greater than the expression previously achieved in yeast. A series of horse cytochrome *c* mutants were obtained in this way.

Key words: cytochrome c, expression, heme-ligase, mutagenesis

* *To whom correspondence should be addressed; phone: tel. +7 (095) 336-8011; e-mail: dolgikh@nmr.ru*