

На правах рукописи



ГЕРАСИМОВ АНДРЕЙ СЕРГЕЕВИЧ

**Синтез гетерологичных функционально активных GPCR
в клетках метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris***

03.01.03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва-2012

Работа выполнена в лаборатории готовых лекарственных форм,
федерального государственного бюджетного учреждения науки Центр «Био-
инженерия» РАН

Научные руководители:

кандидат биологических наук

Зейналов Орхан Ахмедович

кандидат биологических наук

Шульга Алексей Анатольевич

Официальные оппоненты:

доктор химических наук, профессор

Чупин Владимир Викторович

кандидат биологических наук

Соколова Ольга Сергеевна

Ведущая организация:

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт
Биохимии им. А.Н. Баха РАН**

Защита диссертации состоится «02» марта 2012 г. в ____ часов на заседании
Совета Д 501.001.76 по защите докторских и кандидатских диссертаций
при Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова
по адресу: 119992, Москва, Ленинские горы, МГУ, НИИ физико-
химической биологии имени А.Н. Белозерского, ауд. 536.

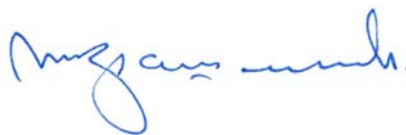
С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Биологического
факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

Автореферат разослан «02» февраля 2012 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,

кандидат биологических наук



И.А. Крашенинников

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Способность воспринимать и оперативно реагировать на информацию, получаемую из окружающей среды, является одним из важнейших свойств живых организмов. На сегодняшний день подробно изучены физиологические основы сигнальных механизмов, однако, их понимание невозможно без детальных биофизических и биохимических исследований всех вовлеченных молекулярных структур, к числу которых относятся рецепторы, сопряженные с G-белком.

Рецепторы, сопряженные с G-белком, (GPCR или 7ТМ-рецепторы) представляют собой крупнейшее семейство белков. Эти рецепторы являются ключевыми элементами механизмов молекулярного распознавания и саморегуляции эукариот. Последние исследования выявили их участие во многих и важнейших и слабо изученных внутриклеточных процессах. Важно отметить, что рецепторы семейства GPCR являются молекулярными мишенями для более половины известных лекарственных препаратов, поэтому закономерен интерес к ним со стороны фарминдустрии.

Несмотря на свою уникальность и важность, на сегодняшний момент подробно изучены кристаллические структуры всего лишь нескольких представителей GPCR: родопсина человека и быка, бета1- и бета2-адренергических, дофаминового D₃, аденозинового A_{2A} и хемокинового CXCR4, гистаминового H₁ рецепторов человека. Отсутствие прогресса в структурных исследованиях GPCR объясняется низким содержанием рецепторов в природном сырье, а также трудностями, связанными с поддержанием правильной пространственной структуры рецепторов вне мембранного окружения. В связи с этим, представляется целесообразным разработка гетерологичных систем экспрессии, которые бы обеспечивали получение любых необходимых количеств GPCR в функционально активном состоянии. Как показывает практика, системы на основе *Pichia pastoris* идеально подходят для получения высокотоксичных трансмембранных белков, поскольку дрожжи можно выращивать в больших объемах до высоких плотностей и эффективно контро-

лизовать уровень транскрипции целевых генов, используя строго индуцибельные промоторы.

Цель и задачи исследования

Целью настоящей диссертационной работы является создание эффективных систем гетерологичной экспрессии генов GPCR на основе клеток метилотрофных дрожжей *P. pastoris* и разработка методов выделения и очистки рецепторов в функционально активном состоянии.

Исходя из поставленной цели, были сформулированы и решены следующие основные задачи:

1. Разработка эффективных систем экспрессии генов представителей семейства GPCR: бета2-адренергического рецептора, рецептора-3 дофамина, рецептор-1 галанина, рецептора 174, рецептора-2 меланокортинов.
2. Разработка метода тестирования функциональной активности рецепторов.
3. Разработка эффективных протоколов выделения и очистки гетерологичных функционально активных рецепторов из мембранной фракции дрожжей.

Научная новизна и практическая значимость работы

В настоящей диссертационной работе предложены новые стратегии получения рецепторов в клетках *P. pastoris*, позволяющие наработать миллиграммовые количества функционально активных белков для структурных и биологических исследований.

Разработана универсальная система получения адренокортикотропного гормона и его производных, содержащих специфические узнаваемые последовательности аминокислот, для молекулярно-биологических исследований.

Впервые показано, что рецептор меланокортинов (hMC2R), локализованный в мембранной фракции дрожжей, способен связываться со своим лигандом – адренокортикотропным гормоном. Разработанный метод тестирования функциональной активности открывает путь для изучения других рецепторов с лигандами белковой природы.

Показана возможность использования рекомбинантного hADRB2 в качестве антигена для определения титра аутоантител против рецептора hADRB2 в

сыворотках крови больных миастенией и рассеянным склерозом. Изучено влияние лекарственных субстанций, применяемых в медицинской практике, на взаимодействие гетерологичного hADRB2 с аутоантителами, что дает возможность применения полученных результатов в фармакологии.

Личный вклад автора заключается в проведении экспериментальных и теоретических исследований. Результаты работы получены лично автором или же при его непосредственном участии в планировании и проведении экспериментов. Имена соавторов указаны в соответствующих публикациях.

Апробация работы

Основные результаты диссертационной работы были представлены на всероссийской научной школе для молодежи «Горизонты нанобиотехнологии». (Москва, 2009 г); научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика-2010» (Москва, 2010 г), международном симпозиуме «Взаимодействие нервной и иммунной систем в норме и патологии» (Санкт-Петербург, 2011).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 9 работ, из них в рецензируемых журналах – 2, в российских и иностранных журналах, входящих в перечень ВАК – 2, тезисы докладов на международных конференциях и семинарах – 2, тезисы докладов на российских научных конференциях – 5.

Объем и структура диссертации

Материалы диссертации изложены на 128 страницах машинописного текста и включают 28 рисунков и 4 таблицы. Диссертация состоит из разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждения», «Выводы», «Список цитируемой литературы», который содержит 280 ссылок, в том числе 271 иностранный источник.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Выбор объектов исследования

Для продукции рецепторов применяют различные системы гетерологичной экспрессии. Использование клеточной системы *E. coli* позволяет наработать достаточные количества GPCR. Однако бактериальные клетки зачастую не способны синтезировать рецепторы с нативной третичной структурой, осуществлять посттрансляционные модификации, вследствие чего, уменьшается или не наблюдается функциональная активность. Длительность, трудоемкость и дороговизна являются характерными признаками систем на основе клеточных линий млекопитающих и насекомых. Перспективной является система экспрессии на основе клеток метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris*, которые обладают развитым субклеточным аппаратом для осуществления посттрансляционных модификаций белков и схожим с клетками млекопитающих строением цитоплазматической мембраны. К тому же клетки дрожжей отличаются простотой и удобством в работе.

В настоящей работе описана экспрессия бета2-адренергического рецептора hADRB2, рецептора-3 дофамина hDRD3, рецептора-1 галанина hGALR1, рецептора 174 hGPR174, рецептора-2 меланокортина или АСТН-рецептора hMC2R. Они являются важными участниками процессов передачи сигналов и мишенями для многих лекарственных субстанций. К тому же, их получение затруднительно или невозможно в более простых экспрессионных системах, таких как *E. coli* (неопубликованные результаты). Наиболее изученными среди исследуемых объектов являются hDRD3 и hADRB2. В частности, известно, что бета2-адренергический рецептор эффективно нарабатывается в *P. pastoris*. Уровень его биосинтеза составляет 4 мг/л (Noguchi et al, 2006). В исследуемую группу входят рецепторы с лигандами пептидной природы (hMC2R, hGALR1). Особо отметим практическую значимость изучаемых GPCR. К примеру, ген hGPR174 активно экспрессируется лишь в метастазирующих меланомах, что является платформой для создания противоопухолевых препаратов селективного действия.

В данном исследовании методы получения GPCR в функционально активном состоянии были разработаны только для двух рецепторов hMC2R и

hADRB2, в силу того объективного обстоятельства, что работы такого рода являются очень затратными и трудоемкими. Один из этих рецепторов (hMC2R) имеет лиганд пептидной природы, другой – низкомолекулярный лиганд. При выборе рецепторов также учитывались такие факторы, как доступность лигандов, наличие минимально необходимых сведений о свойствах рецепторов в литературе.

Позднее, если это будет востребовано практикой, опыт выделения активной формы рецепторов, накопленный в процессе выполнения данной работы, может быть применен и к другим рецепторам, биосинтез которых был налажен в дрожжах. Главное, что было продемонстрировано в данной работе, – это принципиальная возможность получения функционально активных рецепторов из метилотрофных дрожжей.

Создание эффективных систем экспрессии генов GPCR

Работа по получению дрожжевых штаммов-продуцентов рецепторов состоит из нескольких этапов. Все первоначальные генетические манипуляции проводятся в клетках *E. coli*. В результате получают плазмидный вектор, содержащий все необходимые элементы для успешной экспрессии целевого гена. Затем полученной ДНК трансформируют клетки *P. pastoris*. При этом происходит интеграция целевого гена в генетический аппарат клетки-хозяина посредством гомологичной рекомбинации. Количество вставок экспрессионной кассеты в геноме можно оценить по устойчивости трансформантов к различным концентрациям селективного агента. В конечном счете, следует отобрать 6 – 10 трансформантов для определения уровня экспрессии целевого гена.

В качестве основы для создания плазмидного вектора использовали плазмиду pVR2 (Редо и др., 2011), предоставленную ведущим научным сотрудником Центра «Биоинженерия» РАН Эльдаровым М.А. Конструкция была усовершенствована введением последовательности, кодирующей девять остатков гистидина. Полученная плазида pVR2His служила вектором, в который по сайтам *NdeI* и *XhoI* клонировали гены исследуемых рецепторов. В итоге были получены экспрессионные кассеты pVR2GPCRHis (рис. 1), которые использовались для получения GPCR с полигистидиновой последовательностью. Для выделения таких GPCR может применяться металлохелатная аф-

финная хроматография (МХАХ), один из универсальных методов очистки рекомбинантных белков.

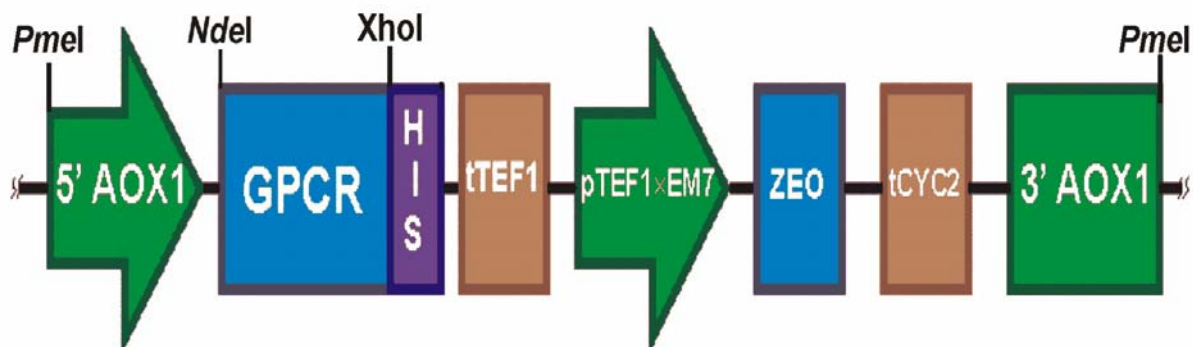


Рисунок 1. Графическая схема экспрессионной кассеты. GPCR – гены hADRB2, hDRD3, hGALR1, hMC2R, GPR174. Ген ZEO находится под контролем конститутивного гибридного промотора транскрипции pTEF1/EM7 и терминатора tCYC2.

Гены рецепторов в полученных векторах находятся под контролем сильного индуцибельного промотора AOX1, который активируется в ответ на добавление в питательную среду метанола. Отбор и селекцию трансформантов осуществляли благодаря наличию экспрессионной кассеты ZEO, которая обеспечивает устойчивость к зеоцину.

Основной отличительной особенностью конструкций, используемых в настоящей работе, является отсутствие на 5'-концах целевых генов сигнальной последовательности альфа-фактора *S. cerevisiae*. Синтез GPCR в виде гибрида с данным пептидом широко распространен и обеспечивает транслокацию молекул рецептора по котрансляционному механизму путем последовательного процессинга в шероховатом ЭПР и компартментах Гольджи. На наш взгляд, при синтезе сложных и токсичных полипептидов нет необходимости в использовании механизма секреции. Объектами нашей работы являются интегральные трансмембранные белки, которые, благодаря своей природе, способны самостоятельно встраиваться в клеточную мембрану.

Клетки *P. pastoris* штамма GS115 (*his4*, *mut*⁺) трансформировали векторной конструкцией, предварительно гидролизованной эндонуклеазой *PmeI*, методом электропорации (Cregg et al, 1995). Отбор трансформантов осуществляли на плотной питательной среде YPDS, содержащей зеоцин в концентрациях от 100 до 1500 мкг/мл среды. Биосинтез рекомбинантных белков осуществляли при культивировании клеток сначала на среде BMGY, а затем на индукци-

онной среде ВММУ, содержащей метанол в количестве 10 г/л среды. Индукцию проводили 36 часов, добавляя каждые 12 часов по 10 г/л метанола.

Уровень экспрессии целевых генов в трансформантах оценивали методом дот-блота путем нанесения фиксированного объема мембранного экстракта (Zeder-Lutz et al, 2006) на нитроцеллюлозную мембрану и выявления полигистидиновой последовательности, входящей в состав рецепторов, при помощи специфических моноклональных антител (рис. 2). Отметим, что в данном случае методу дот-блота нет альтернативы, поскольку он очень надежен, чувствителен, и позволяет быстро, буквально «на потоке», оценить уровень биосинтеза белка, содержащего специфический «таг». Из рис. 2 нетрудно убедиться, что экстракты дрожжевой клетки-хозяина (К(-)) не прокрашиваются в цветной реакции.

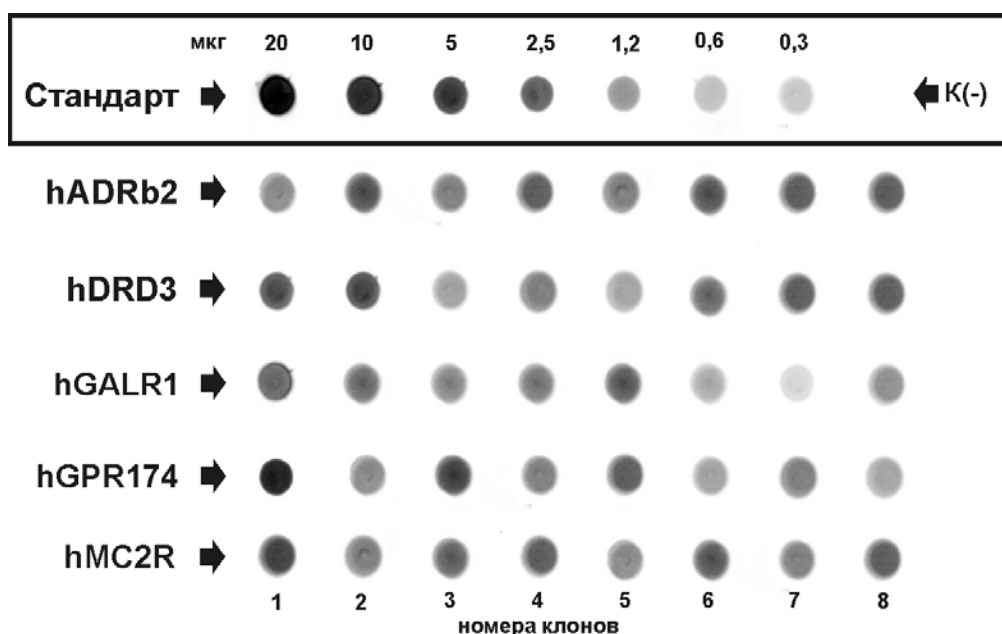


Рисунок 2. Результаты дот-блота мембранных экстрактов. **Стандарт** – образец белка с С-концевой полигистидиновой последовательностью известной концентрации. Сверху указаны количества стандарта для построения калибровочной прямой. **К (-)** – образец мембранного экстракта *P. pastoris* штамма GS115. Слева указаны виды рецепторов, а внизу – номер исследуемого клона.

Наиболее высокое содержание исследуемых рецепторов отмечалось у трансформантов, выросших на плотной питательной среде с высокой концентрацией селективного агента, что, по-видимому, говорит о наличии корреляции между копийностью гена и уровнем синтеза рецепторов. Максимальная продукция целевых белков, локализованных в цитоплазматической мембране, достигалась на 25 – 30-й час индукции. Исследование клеточной культуры с

помощью световой микроскопии показывает гибель клеток на 60-й час индукционной фазы, что подтверждает высокую токсичность целевых белков, выражающуюся в деструкции клеточной мембраны.

В связи с этим были проведены работы по оптимизации условий выращивания продуцентов с целью повышения продукции рецепторов. При снижении температуры культивирования во время индукционной фазы до 20⁰ С уровень биосинтеза GPCR значительно повысился. Данное обстоятельство можно объяснить повышенной продукцией клетками белков теплового шока, которые стабилизируют молекулы полипептидов. В свою очередь, замедление процессов миграции и встраивания гидрофобных рецепторов в цитоплазматическую мембрану при пониженной температуре культивирования может обеспечить правильную конформацию молекул и их функциональную активность.

Введение гистидина в состав индукционной питательной среды влияло также положительно. Хотя его действие не достаточно изучено, считается, что данная аминокислота обладает антиоксидантным свойством (Murakami et al, 1997).

Добавление в питательную среду диметилсульфоксида (ДМСО) является распространенным подходом при культивировании клеток *P. pastoris* (Murata et al, 2003, Salunkhe et al, 2010). Являясь по своей природе универсальным растворителем, ДМСО способствует увеличению проницаемости и вязкости цитоплазматической мембраны, что приводит к увеличению доли функционально активных молекул рецепторов (Andre et al, 2006). С той же целью для трех рецепторов – hADRB2, hMC2R, hDRD3 во время индукции добавляли лиганды – альпренолол, адренокортикотропный гормон, дофамина гидрохлорид.

Применение, наряду с рассмотренными подходами, дополнительного внесения биотина, тиамин и рибофлавина приводило к существенному повышению уровня биосинтеза рецепторов, локализованных в дрожжевой мембране, который, в конечном счете, составил не менее 20 мг/л среды.

Создание эффективной бактериальной системы экспрессии для гена адренокортикотропного гормона и его производных.

Для выделения активной формы рецептора hMC2R и изучения его лиганд-связывающих характеристик необходимо было обеспечить получение его

пептидного лиганда, а также некоторых его производных, содержащих специфические узнаваемые последовательности аминокислот.

Адренкортикотропный гормон (АСТН, кортикотропин) – природный и единственный лиганд hMC2R. Для успешной реализации задач, поставленных в данном исследовании, необходимо было также получить два производных АСТН. Первое производное – это АСТН с C-концевой последовательностью BIO (MASSLRQILDSQKMEWRSNAGGS). Наличие такой последовательности дает возможность биотинилировать полипептид *in vivo*. Белки, меченые биотином, являются универсальным средством для решения многих задач молекулярной биологии. Взаимодействие биотин-стрептавидин относится к разряду наиболее прочных и характеризуется константой ассоциации порядка 10^{-15} M^{-1} , что использовалось при получении аффинных сорбентов для выделения активной формы рецептора hMC2R.

Вторая разновидность лиганда, получение которого необходимо было наладить в данном исследовании, – это АСТН с C-концевой последовательностью эпитопа парамиксовируса V5 (GKPIPPLLGLDST), которая распознается коммерчески доступными, высокоспецифичными моноклональными антителами. Лиганд АСТН-V5 в данной работе применялся для постановки тест-системы определения активности рецептора, локализованного в мембране дрожжей. Следует отметить, что биотинилированный лиганд не может использоваться для этих целей, поскольку в состав мембранного компартмента входит эндогенный биотин. Добавочные последовательности необходимо было размещать только на C-конце, поскольку сайт связывания с рецептором («HFRW» мотив) расположен вблизи N-конца АСТН.

В ходе исследования обнаружено, что прямая бактериальная экспрессия гена малоэффективна (неопубликованные данные). Поэтому была применена технология гибридной экспрессии кортикотропина, слитого с белком SUMO. С этой целью в плазмиду pGEMEX1 (Novagen, США) по сайтам *NdeI* и *EgeI* был проклонирован ген, кодирующий SUMO с N-концевой полигистидиновой последовательностью. Затем в полученную конструкцию pTS по сайтам *EgeI* и *VamHI* клонировали гены АСТН и его производных, которые собирали из синтетических олигонуклеотидов («Евроген», Россия) методом ПЦР. В результате

были получены экспрессионные векторы pTSA, pTSBIO и pTSAV5 для продукции SUMO-ACTH, SUMO-ACTH-Bio и SUMO-ACTH-V5, соответственно.

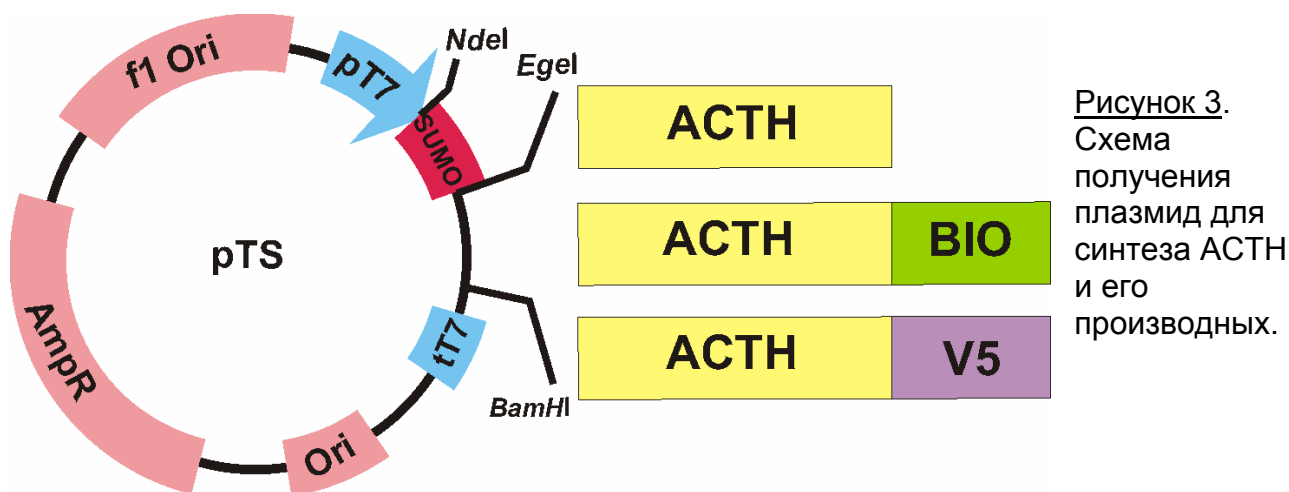


Рисунок 3.
Схема получения плазмид для синтеза АСТН и его производных.

При синтезе целевого белка в виде гибрида с SUMO заметно увеличился выход АСТН и его производных. Другим положительным качеством является простота расщепления гибридных продуктов SUMO-гидролазами, которые узнают третичную структуру белка-партнера, а не специфическую последовательность аминокислот.

Для биосинтеза SUMO-ACTH и SUMO-ACTH-V5 использовали штамм *E. coli* BL21(DE3), который выращивали на автоиндукционной среде TB-5052 при температуре 37⁰ С. Выход гибридов составил 500 мг/л среды.

Для биосинтеза SUMO-ACTH-BIO использовали штамм *E. coli* Origami (BirA), осуществляющий коэкспрессию гена биотин лигазы. Максимальная продукция гибридного белка достигалась в результате выращивания при 28⁰ С, с добавлением 0.01 мМ ИПТГ и 0.05 мМ биотина. Уровень биосинтеза гибрида составил 100 мг/л среды.

Выделение и очистку вариантов адренокортикотропных гормонов проводили в три стадии. Вначале выделяли гибридный белок при помощи металлохелатной аффинной хроматографии. После расщепления его при помощи гидролазы Ulp1 проводили выделение кортикотропина при помощи катионообменной хроматографии (рис. 4).

В конечном счете, выходы целевых гормонов (при пересчете на чистый белок) составили 100 мг/л АСТН, АСТН -V5 и не менее 15 мг /л АСТН-ВЮ. При помощи дот-блота показано, что АСТН -V5 взаимодействует с моноклональными антителами против эпитопа V5, а АСТН-ВЮ со стрептавидином, конъюгированным с щелочной фосфатазой (отрицательным контролем служил АСТН).

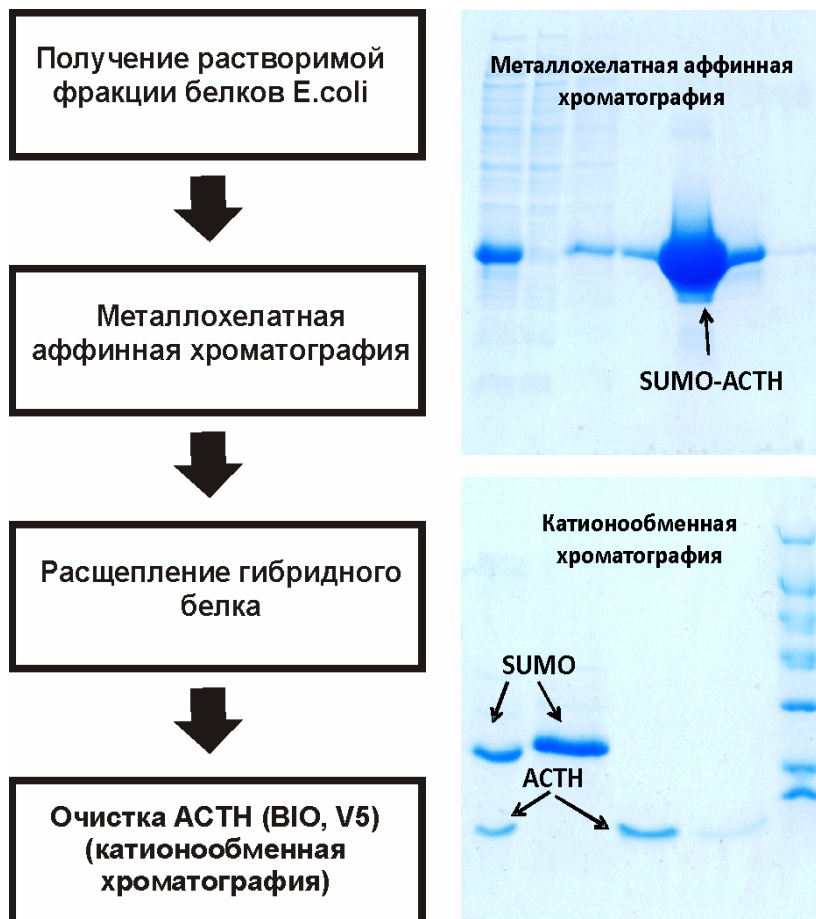


Рисунок 4. Схема очистки производных АСТН и результаты ПААГ в денатурирующих условиях.

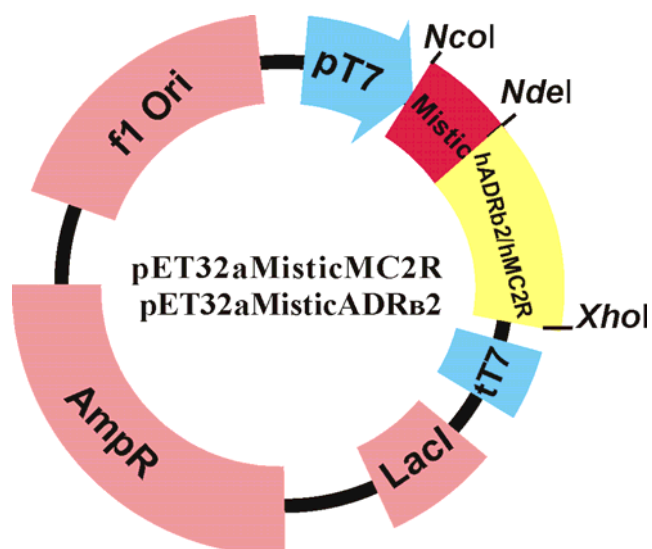
Создание бактериальной системы экспрессии для генов hADRB2 и hMC2R

Важной задачей, поставленной в диссертационной работе, является сравнение бактериальной и дрожжевой экспрессионной систем на предмет продукции активных рецепторов. В ходе исследования было обнаружено, что прямая бактериальная экспрессия генов рецепторов невозможна, поскольку белковый продукт не обнаруживался ни в бактериальной цитоплазме, ни в мембране (неопубликованные данные). Очевидно, что в таком состоянии рецептор неактивен. Поэтому была применена технология гибридной экспрессии hMC2R, слитого с белком Mistic. Существуют работы, в которых описано ус-

пешное применение данного подхода с целью получения множества функционально активных белков, локализованных в мембране (Roosild et al, 2005, Dvir et al, 2009). Он основан на особенностях природы белка-партнера Mistic, который способен автономно встраиваться в мембрану, минуя механизмы, задействованные для транспорта и интеграции других клеточных белков. Формируя особую структуру, он интегрируется в липидный бислой и «втягивает» за собой слитый с ним целевой полипептид.

С этой целью в плазмиду pET32a (Novagen, США) по сайтам *NcoI* и *NdeI* был проклонирован ген, кодирующий Mistic. Затем в полученную конструкцию pET32aMistic по сайтам *NdeI* и *XhoI* клонировали гены исследуемых рецепторов. В результате были получены экспрессионные векторы pET32aMisticMC2R, pET32aMisticADRB2 для гибридной продукции рецепторов hMC2R и hADRB2 (рис. 5).

Рисунок 5. Физические карты плазмид pET32aMisticMC2R, pET32aMisticADRB2 для продукции рецепторов в *E.coli*



Для экспрессии hMC2R и hADRB2 нами был выбран штамм *E.coli* Rosetta2(DE3)pLysS, широко используемый для биосинтеза токсичных белков. Клетки данного штамма содержат хромосомную копию гена РНК-полимеразы фага Т7, а также плазмиду pLysS с геном лизоцима фага Т7. Лизоцим ингибирует Т7 РНК-полимеразу, в результате чего фоновый уровень индукции в клетках существенно снижен. Культивирование рекомбинантного штамма проводили при различных температурах и концентрациях индуктора. Максимальные выходы гибридного белка, локализованного в мембране, достигались в результате выращивания при 25⁰ С на автоиндукционной среде и составили порядка 50 мг/л среды (определено при помощи дот-блота).

Определение функциональной активности меланокортинового рецептора, продуцируемого в дрожжевой системе экспрессии

Подтверждение активности рецептора, локализованного в клеточной мембране, является важным этапом исследования, определяющим перспективность применяемой экспрессионной системы.

Способность гетерологичного рецептора hMC2R связываться с адренокортикотропным гормоном определяли с помощью твердофазного ИФА. Препарат дрожжевых мембран, содержащих изучаемый рецептор, сорбировали на планшете в течение 12 часов. Образцы инкубировали с АСТН-V5, затем с моноклональными антителами против эпитопа V5 и антителами против Fc-фрагментов, конъюгированных с пероксидазой хрена. Результаты фиксировали хромогенным субстратом ТМВ и анализировали планшетным ридером при длине волны 450 нм. В качестве отрицательного контроля использовался препарат мембран дрожжей, содержащий бета2-адренергический рецептор.

В конечном счете, установлено, что рекомбинантный hMC2R, находящийся в мембране дрожжей, способен связывать АСТН (рис. 6). Полученная s-образная зависимость сигнала от концентрацией гормона, похожая по характеру на взаимодействие «фермент-субстрат» кинетики Михаэлиса-Ментен, позволяет вычислить константу диссоциации рецептора, интегрированного в дрожжевую мембрану с кортикотропином.

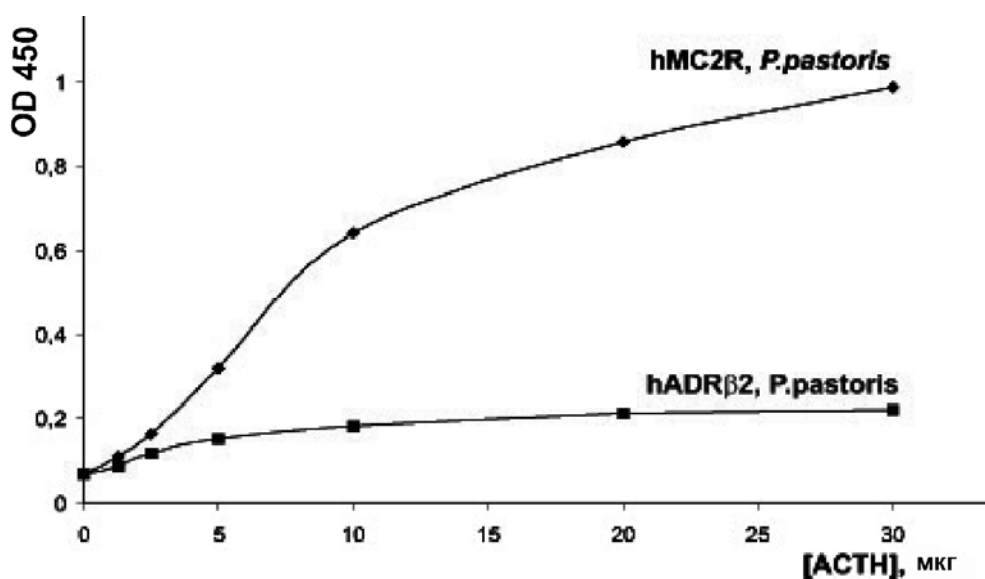


Рисунок 6. Кривые связывания образцов мембранных фракций дрожжей, содержащих рекомбинантный hMC2R (hMC2R, *P. pastoris*) и hADRb2 (hADRb2, *P. pastoris*) – отрицательный контроль.

Используя один из стандартных методов расчета (Loomans et al, 1995), определили, что значение константы в исследуемой системе составило 0,23 нМ. Rached с соавторами исследовали активность hMC2R, продуцируемого в различных клеточных линиях млекопитающих. В частности, величина константы связывания рецептора, продуцируемого клетками HEK293, с АСТН составила 0,44 нМ. Следовательно, оценка полученных значений от двух независимых экспериментов позволяет судить о специфичности взаимодействия и о функциональной активности рецептора в дрожжевой мембране.

Меланокортиновый рецептор, продуцируемый в бактериальной системе экспрессии не способен связываться с АСТН

Аналогичные исследования, проведенные на рецепторе hMC2R, локализованном в мембране *E. coli*, выявили его неспособность связывать лиганд. Таким образом, на примере mistic-hMC2R было показано, что при сравнимых выходах целевого белка, дрожжевая система экспрессии GPCR является более предпочтительной, нежели бактериальная система, поскольку позволяет получать активный рецептор. Рецептор, получаемый в бактериальной системе, нуждается в ренатурации *in vitro*, что крайне трудно осуществить для таких сложных трансмембранных белков, как GPCR. Следует отметить, что на данный момент биосинтезу функционально активного hMC2R в метилотрофных дрожжах нет альтернативы, вследствие крайне низкого уровня продукции этого белка в клетках млекопитающих (Rached et al, 2005, Герасимов и др., 2011).

Солюбилизация hMC2R и hADRB2, продуцируемых в клетках *P. pastoris*

Под термином «солюбилизация» понимается растворение неполярных, гидрофобных веществ в мицеллярных коллоидных водных растворах детергентов. Отметим, что экстракция рецепторов из мембраны – это сложная и тонкая процедура, поскольку неполноценная имитация мембранного окружения детергентами с неизбежностью приводит к агрегации и/или денатурации молекул GPCR. Поэтому использование мягких детергентов, а в ряде случаев в сочетании с фосфолипидами или липидоподобными веществами является

необходимым условием. К тому же, известно влияние молекул ПАВ на хромографические свойства белков.

Для выбора оптимальных условий солюбилизации hMC2R и hADRB2, исходя из имеющихся знаний (Sarramegna et al, 2006), проводили скрининг 8 детергентов и их смесей: **1** – лаурил саркозин (1%); **2** – *n*-Додецил-в-D-мальтозид (1%); **3** – дигитонин (1%), **4** – дигитонин (1%) и холат натрия (0.5%); **5** – CHAPS (1%) и холат натрия (0.2%); **6** – *n*-додецил-в-D-мальтозид (1%), CHAPS (0.6%), холестерина гемисукцинат (0.12%); **7** – смесь подобная **6**, но с добавлением лигандов; **8** – CHAPS (1%), 1,2-Дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (0.2%).

Технически это осуществлялось путем получения препарата дрожжевых мембран, его солюбилизации в исследуемых детергентах, удаления нерастворимой части при помощи центрифугирования и выделения рецептора из экстракта методом МХАХ. Целесообразность использования детергента определяли путем анализа содержания целевого белка в нерастворимой фракции и во фракции, полученной после МХАХ (элюция белка 500 мМ имидазола). Для анализа содержания рецепторов применяли метод дот-блота, который был подробно описан ранее. На рис. 7 показаны результаты такого эксперимента на примере hMC2R.

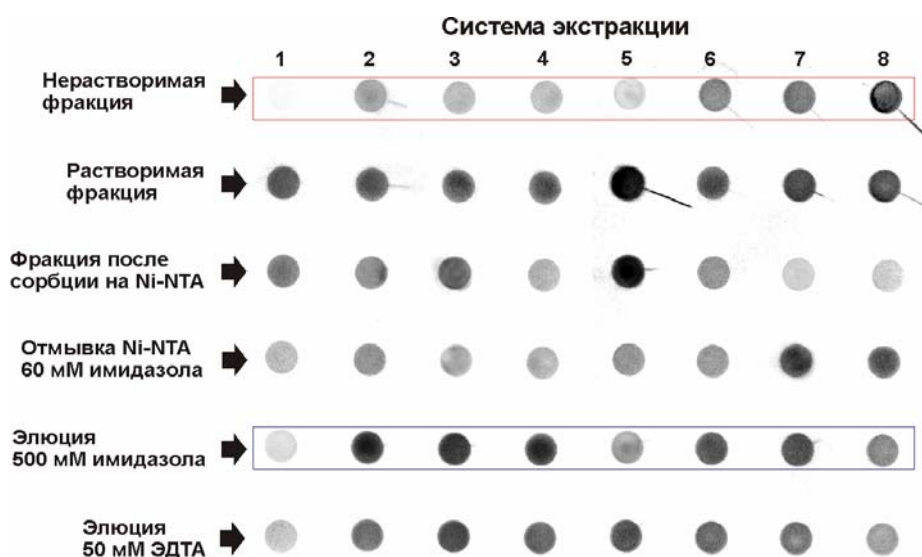


Рисунок 7. Подбор условий экстракции hMC2R.

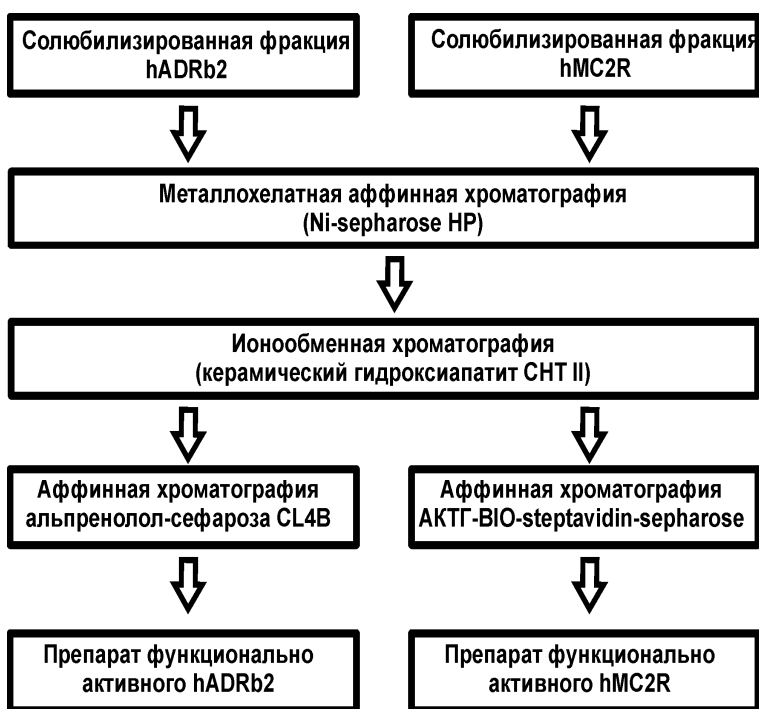
Из представленных результатов следует, что для экстракции hMC2R из дрожжевой мембраны лучше всего подходят 1%-ный раствор *n*-додецил-в-D-

мальтозида (№2), 1%-й раствор дигитонина (№3) и смесь дигитонина с холатом натрия (№4), однако, вследствие трудностей, связанных с плохой растворимостью, токсичностью, низкой чистотой дигитонина, использовали схему - №2. Эффективность солюбилизации мембраны, которую определяли по разнице содержания рецептора в растворимой и нерастворимой фракциях, составила 86%.

Аналогичным образом было определено, что для работы с рецептором hADRB2 оптимальной является смесь, состоящая из 1% *n*-додецил-в-*D*-мальтозида, 0.6% CHAPS, 0.12 % холестерина гемисукцината, с добавлением антагониста рецептора – альпренолола. Эффективность экстракции рецептора из мембраны составила 90%. Отметим, что использование производных холестерина повышает термостабильность и устойчивость бета2-адренорецептора в мицеллах детергента, вследствие имеющегося холестерин-связывающего мотива (Hanson et al, 2008).

Очистка hMC2R и hADRB2.

В силу присутствия в солюбилизированной фракции детергентов и экстрагированных детергентами липидных компонентов мембран процесс очистки мембранных белков крайне затруднен. Разработанные протоколы для рецепторов hMC2R и hADRB2 практически совпадают и состоят из трех стадий. На

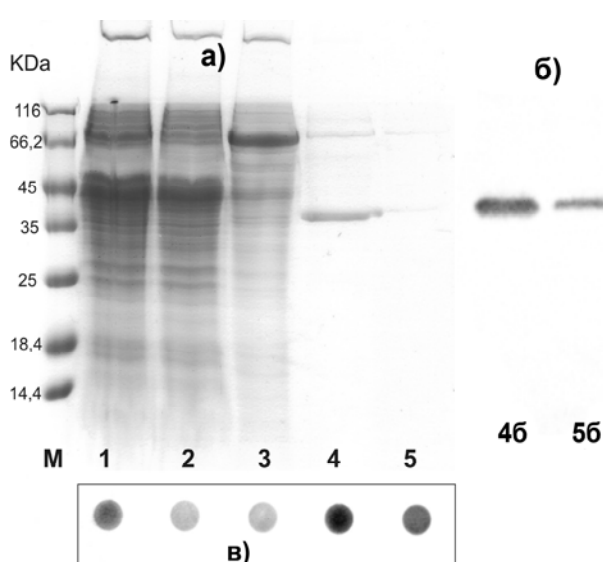


первых двух стадиях удаляются примесные белки (МХАХ и ионообменная хроматография). На последней стадии для выделения активной формы рецептора используется аффинная хроматография (рис. 8.).

Рисунок 8. Схема очистки hMC2R и hADRB2.

Метод металлохелатной аффинной хроматографии (МХАХ) характеризуется высокой эффективностью и, кроме того, позволяет избавляться от агрегированных форм рецептора, которые обычно не связываются с сорбентом. Уже после этого этапа выделения были получены препараты рецепторов hADRB2 и hMC2R с чистотой более 80% (рис. 10).

Рисунок 9. Результаты МХАХ, проанализированные при помощи ПААГ в денатурирующих условиях (а), вестерн-блота (б) дот-блота (в). **1** - солюбилизированная фракция, **2** – после нанесения на Ni-sepharose HP, **3** – отмывка буфером, содержащим 50 мМ имидазола, **4** – элюция буфером, содержащим 500 мМ имидазола, **5** - элюция буфером, содержащим 50 мМ ЭДТА. **4б** и **5б** – вестерн-блот элюционных фракций



Дальнейшая очистка производилась на гидроксиапатите, который сочетает в себе свойства ионообменного и металлохелат аффинного сорбентов. В результате были получены препараты рецепторов с чистотой более 95 % (данные не представлены). К тому же на данной стадии окончательно удаляются примеси лигандов рецепторов, которые применялись при солюбилизации.

Гомогенность белков, находящихся в растворах детергентов была подтверждена методом динамического светорассеяния. Измерение интенсивности рассеянного света при различных длинах волн позволяет оценить однородность мицелл (Гончарук и др., 2010). В результате оказалось, что в препаратах hADRB2 и hMC2R присутствуют частицы со средним радиусом $20,3 \pm 4$ нм и $18,4 \pm 3,4$ нм, соответственно.

Таким образом, применение двух стадий хроматографической очистки является достаточным для получения чистых препаратов рецепторов hADRB2 и hMC2R. Однако, не все молекулы рецепторов в препаратах, полученных таким образом, являются функционально активными. Некоторая часть молекул

при экстракции детергентами или же при проведении хроматографических процедур утрачивает правильную конформацию. Поэтому для выделения активной формы рецепторов требуется проведение аффинной хроматографии.

Аффинная хроматография рецепторов

Разделение активной и неактивной форм молекул рецепторов осуществляли на сорбентах, к которым были присоединены лиганды, специфичные для выделяемого рецептора.

Аффинный сорбент «альprenолол-сефароза CL-4B» для выделения активной формы рецептора hADRB2 был получен путем ковалентного присоединения антагониста рецептора – альprenолола к частицам сефарозы (Tedesco et al, 1988). Элюция функционально активного белка осуществлялась буфером, содержащим 1 мМ антагониста альprenолола. Потери рецептора в ходе аффинной хроматографии составили порядка 30%. Заметим, что данный метод является не только методом очистки, но также и доказательством функциональной активности молекул hADRB2. Выход очищенного белка составил свыше 1 мг/л культуры, что более чем в пять раз превышает аналогичные показатели для этого рецептора, которые можно встретить в литературе (Noguchi et al, 2006).

Для разделения активной и неактивной форм молекул рецептора hMC2R был получен сорбент «АСТН-БИО-streptavidin-sepharose HP». Биотинилированный АСТН инкубировали в течение ночи с «streptavidin-sepharose HP» (GE Healthcare). Затем колонку отмывали от остатков несвязавшегося лиганда и инкубировали с препаратом hMC2R. Элюция рецептора в комплексе с адренокортикотропным гормоном осуществлялась 5 мМ биотина. Для очистки рецептора от примесей белкового лиганда и биотина использовали концентрирование на мембранах с MCWO – 100 КДа. В результате, с 1 литра культуры удалось получить 1,5 мг очищенного hMC2R.

В результате, были получены чистые препараты функционально активных рецепторов hADRB2 и hMC2R, причем выход белка составил не менее 1 мг/л в каждом из случаев. Такие высокие выходы являются дополнительным аргументом в пользу использования метилотрофных дрожжей для получения функционально активных GPCR. Наряду с эффективными дрожжевыми

штаммами-продуцентами, разработанные в данной работе универсальные методы выделения и очистки активных форм рецептора закладывают надежную основу для проведения широких структурных и биологических исследований GPCR.

Использование hADRB2 в качестве антигена для определения титра аутоантител

В работе использовались сыворотки пациентов НЦ «Неврологии» РАМН и 2-го неврологического отделения РДКБ Росздрава с миастенией и рассеянным склерозом. Исследование проводилось совместно с сотрудниками НЦ «Неврологии» РАМН к.б.н В.Б. Ланцовой и к.м.н Е.К. Сепп.

Миастения и рассеянный склероз – хронические инвалидирующие аутоиммунные заболевания, антигенные мишени которых охарактеризованы и используются для диагностики. Однако существуют работы, в которых обозначена определенная роль hADRB2 в развитии данных патологий. К примеру, показано участие молекул бета2-адренергических рецепторов в патогенезе рассеянного склероза. (Zoukos et al., 2003) и миастении (Ху, 2000). Поэтому в практической медицине существует острая потребность в создании дополнительных тест-систем для более детального описания и, как следствие, эффективного лечения тяжелых полисимптомных заболеваний. В частности, в настоящей работе, был предложен метод определения титра антител к бета2-адренорецептору.

На 96-ти луночные планшеты сорбировали мембранную фракцию, содержащую рекомбинантный hADRB2, в концентрации 4 мкл/лунку или очищенный белок (10 мкг рецептора на лунку) и инкубировали в течение 12 часов. В качестве отрицательного контроля использовали мембранную фракцию с гетерологичным hMC2R. Неспецифическое связывание блокировали 2% раствором БСА в PBS/Твин-20. Затем вносили анализируемые сыворотки в разведении 1:100. Интенсивность взаимодействия определяли хромогенной реакцией с использованием конъюгата пероксидазы с антителами против Fc-фрагмента IgG человека при помощи планшетного ридера при длине волны 450 нм.

При испытании новой тест-системы (ИФА) на основе гетерологичного hADRB2 были обнаружены аутоантитела у 12 из 40 больных миастенией и у 1 из 12 больных рассеянным склерозом, что согласуется с данными других авторов (Yi et al, 1995). В контрольной группе, включающей 10 здоровых человек, антитела к hADRB2 не выявлялись. Таким образом, показана возможность использования гетерологического hADRB2 в качестве антигена при разработке новых тест систем на основе ИФА, которые могут применяться в практической медицине.

Молекулы рецептора, находящиеся в мембранной фракции *P. pastoris* и в мицеллах детергента, были охарактеризованы по степени взаимодействия с аутоантителами в присутствии лекарственных субстанций: неселективного бета-адреноблокатора – альпренолола и селективных бета2-адреномиметиков сальбутамола и кленбутерола. Анализ проводился аналогичным образом. В качестве отрицательных контролей использовали мембранную фракцию дрожжей, содержащую гетерологичный hMC2R (контроль взаимодействия) и лекарственный препарат, не обладающий адренергической активностью – ампициллин. Аутоантитела содержались в сыворотках больных, анализируемых ранее.

Структурные исследования показывают, что при взаимодействии ADRb2 с его агонистом или антагонистом рецептор переходит в различные активированные состояния, которые заметно различаются по топологии трансмембранных сегментов. (Katritch et al, 2011). Предполагается, что данное обстоятельство будет оказывать влияние на связывание ADRb2 с его аутоантителом.

Результаты опыта показали, что адреномиметики повысили аффинность аутоантител в среднем на 14 – 15%, а адреноблокатор оказал противоположный эффект (– 15,4 %) на связывание. Данный интересный факт, по-видимому, связан также с их терапевтическими эффектами, а предложенный подход можно использовать для более детального изучения лекарственных субстанций.

Таблица 1. Взаимодействие рекомбинантного hADRB2 с аутоантителами

Реакция	Мембранная фракция с hADRB2, опт. ед	Фракция МХАХ hADRB2, опт. ед	Мембранная фракция с MC2R, опт. ед
Сыворотка	0.32±0.021	0.55±0.011	0.095±0.011
Сыворотка + альпренолол	0.27±0.011 (- 15.4%)	0.455±0.011 (- 17.2%)	0.093±0.011
Сыворотка + сальбутамол	0.368±0.016 (+ 15.0%)	0.656±0.026 (+ 19.3%)	0.098±0.022
Сыворотка + кленбутерол	0.364 ± 0.011 (+ 13.8%)	0.635±0.016 (+15.4%)	0.096±0.026
Сыворотка + ампициллин	0.33±0.016	0.54±0.022	0.095±0.011

ВЫВОДЫ

1. На основе клеток метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris* получены эффективные системы гетерологичной экспрессии генов бета2-адренергического рецептора, рецептора-3 дофамина, рецептор-1 галанина, рецептора 174, рецептора-2 меланокортинов., обеспечивающие биосинтез целевых белков в количестве свыше 20 мг/л при оптимизированных условиях культивирования.
2. На основе клеток бактерий *E. coli* разработаны оригинальные методы получения АСТН и его производных АСТН-ВЮ и АСТН-V5. Выход очищенных гормонов составил не менее 100 мг/л для АСТН и АСТН-V5 и не менее 15 мг/л для биотинилированной формы АСТН-ВЮ.
3. Разработан метод для тестирования функциональной активности меланокортинового рецептора. Впервые показано, что hMC2R, локализованный в мембранной фракции дрожжей, функционально активен. Измеренная величина константы диссоциации комплекса hMC2R и АСТН составила 0,23 нМ.
4. Разработаны методы аффинной хроматографии для выделения hMC2R и hADRB2 в функционально активном состоянии. Выход активного белка составил более 1 мг/л
5. Показано использование рекомбинантного hADRB2 в качестве антигена для определения титра аутоантител против бета2-АР в сыворотке больных миастенией и рассеянным склерозом, а также изучено влияние лекарственных субстанций – альпренолола, кленбутерола и сальбутамола на аффинность аутоантител к бета2-АР.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Герасимов А.С., Шульга А.А., Зейналов О.А., Скрыбин К.Г. Синтез гетерологичных GPCR в клетках метилотрофных дрожжей *P.pastoris* // Доклады академии наук. 2011. Т.441. №5. С. 703 – 706.

2. Герасимов А.С., Зейналов О.А., Эльдаров М.А., Шульга А.А. Биосинтез β 2-адренергического рецептора человека в клетках метилотрофных дрожжей *P.pastoris* и его очистка // Молекулярная биология. 2012. Т.46. №2. С. 311 – 319.

3. Герасимов А.С. GPCR как основа для создания нанодетекторов // Материалы всероссийской научной школы для молодёжи «Горизонты нанобиотехнологии», 12 – 16 октября 2009. Москва. С. 25-26.

4. Герасимов А.С., Шульга А.А., Зейналов О.А., Скрыбин К.Г. Новый подход для качественного и количественного определения адренкортикотропного гормона человека // VII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярная диагностика 2010». 24 – 26 ноября 2010. Москва. Сборник трудов под редакцией академика РАМН В.И. Покровского. Том IV. С. 297 – 299.

5. Герасимов А.С., Шульга А.А., Зейналов О.А., Скрыбин К.Г. Рекомбинантные рецепторы, сопряженные с G-белком, как основа для создания нанодетекторов // VII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярная диагностика 2010». 24 – 26 ноября 2010. Москва. Сборник трудов под редакцией академика РАМН В.И. Покровского. Том V. С. 137 – 138.

6. Герасимов А.С., Ланцова В.Б., Сепп Е.К., Шульга А.А., Зейналов О.А., Скрыбин К.Г. Разработка тест-системы на основе иммуноферментного анализа для определения уровня аутоантител β 2-адренергического рецептора в сыворотках пациентов с аутоиммунными заболеваниями // VII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярная диагностика 2010». 24 – 26 ноября 2010. Москва. Сборник трудов под редакцией академика РАМН В.И. Покровского. Том IV. С. 295 – 297.

7. Герасимов А.С., Ланцова В.Б. ИФА для определения антител к ADRB2 при миастении и рассеянном склерозе // XVIII российская конференция «Нейроиммунология». 27 – 30 сентября 2011. Санкт-Петербург. Сборник тезисов. С. 50.