

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКАЯ БИОЛОГИЯ

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

**ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДИКИ ПОЛУЧЕНИЯ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО БЕЛКА KU
В *ESCHERICHIA COLI***

Шадрина Ольга Алексеевна

аспирант факультета биоинженерии и биоинформатики
Московского Государственного Университета имени М.В. Ломоносова,
119234, РФ, г. Москва, ул. Ленинские горы, 1, стр. 73
E-mail: oashadrina92@gmail.com

Княжанская Екатерина Сергеевна

канд. биол. наук, с.н.с. химического факультета
Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова,
119991, РФ, г. Москва, ул. Ленинские горы, 1, стр. 3
E-mail: knyajka@mail.ru

Королев Сергей Павлович

канд. хим. наук, с.н.с. химического факультета
Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова,
119991, РФ, г. Москва, ул. Ленинские горы, 1, стр. 3
E-mail: spkorolev@mail.ru

**THE OPTIMIZATION OF THE PRODUCTION
OF HUMAN PROTEIN KU IN *ESCHERICHIA COLI***

Olga Shadrina

postgraduate student, Faculty of Bioengineering and Bioinformatics,
Lomonosov Moscow State University,
119234, Russia, Moscow, Leninskie gory St., 1,73

Ekaterina Knyazhanskaya

candidate of Biological Sciences, Senior Research Scientist,
Chemistry Department, Lomonosov Moscow State University,
119991, Russia, Moscow, Leninskie gory St., 1,3

Sergei Korolev

candidate of Chemical Sciences, Senior Research Scientist,
Chemistry Department, Lomonosov Moscow State University,
119991, Russia, Moscow, Leninskie gory St., 1,3

АННОТАЦИЯ

Человеческий белок Ku - один из главных компонентов системы репарации двуцепочечных разрывов ДНК путем негомологичного объединения концов (NHEJ). Он является ДНК-связывающим белком, который неспецифично взаимодействует с концами двуцепочечной ДНК. Функции Ku не ограничиваются участием в NHEJ, показана его роль и в других клеточных процессах: транскрипции, поддержании теломера, V(D)J-рекомбинации. Для изучения многочисленных функций Ku в системах *in vitro* обычно используется препарат белка, очищенного из эукариотических клеток. Такое получение достаточно дорого и обеспечивает низкий выход целевого белка. Нами был налажен процесс получения Ku в прокариотической системе, методика которого представлена в данной работе.

ABSTRACT

Human protein Ku is a one of the main components of the DNA double-strand break repair by non-homologous end-joining mechanism (NHEJ). It is a DNA-binding protein that non-specifically interacts with double-strand DNA ends. Ku functions are not limited to participation in the NHEJ as its role was shown in other cellular processes i.e. transcription, telomere maintenance, V (D) J-recombination. For *in vitro* studies of numerous Ku functions a protein purified from eukaryotic cells is typically used. This technique is expensive and provides a low yield of target protein. In this paper we present a simple method for Ku expression in prokaryotic system and purification.

Ключевые слова: гетеродимер Ku, рекомбинантный белок, прокариотическая экспрессия, бидистронная система экспрессии.

Keywords: heterodimer Ku, recombinant protein, prokaryotic expression, bicistronic expression system.

Введение

Белок Ku является ДНК-связывающим белком. Ku преимущественно связывается сиквенс-неспецифично со свободными концами двуцепочечной ДНК, что определяет его основные биологические функции в эукариотических клетках. В комплексе с каталитической субъединицей DNA-РКс он формирует ДНК-зависимую протеинкиназу DNA-РК. В ее составе Ku отвечает за связывание с ДНК, которое активирует фосфорилирование белковых субстратов DNA-РК [4, р. 3460; 2, р. 17]. DNA-РК играет ключевую роль в клеточном ответе на появление двуцепочечных разрывов ДНК, которые способствуют генным транслокациям, но мешают нормальной репликации ДНК и вызывают апоптоз. Их репарация в основном происходит двумя способами: через гомологичную рекомбинацию или путем негомологичного объединения концов (NHEJ). Участие Ku в NHEJ является наиболее известной и изученной его биологической функцией. Ku связывает концы двуцепочечных разрывов в ДНК, что необходимо как для защиты концов от действия экзонуклеаз, так и для привлечения остальных компонентов комплекса репарации NHEJ [1, с. 568]. Также Ku участвует в различных других клеточных процессах, таких как V(D)J-рекомбинация, перестановка мобильных элементов генома, поддержание теломер, апоптоз, транскрипция [2, р. 20-23].

Белок Ku является гетеродимером и состоит из двух субъединиц массой примерно 70 кДа и 80 кДа, известных как Ku70 и Ku80. В клетках белковые субъединицы Ku70 и Ku80 находятся в виде очень прочного комплекса, который необходим для нормального функционирования белка. Гетеродимеризация Ku сильно стабилизирует обе субъединицы, препятствуя их деградации [5, р. 6881].

В связи с участием Ku во многих процессах для изучения его свойств и функций *in vitro* требуется препарат очищенного белка. Обычно его получают из ядерных экстрактов клеток млекопитающих. Это требует несколько стадий хроматографических очисток, после которых выход белка оказывается низким, кроме того такое получение дорогостоящее. Очистка рекомбинантного His-6-меченного белка, продуцированного в клетках насекомых в бакуловирусной системе, позволяет получать белок с большим выходом, но требует конструирования бакмид, что заметно удлиняет процесс. В этой связи мы наладили

процесс получения рекомбинантного белка Ku в прокариотической системе, позволяющий получать 0,2-0,4 мг белка из 1 л первоначальной культуры *E. coli*.

Результаты

Как отмечено выше, гетеродимер Ku состоит из субъединиц Ku70 и Ku80. Первоначально для получения гетеродимерного белка мы использовали подход, при котором выделяются отдельные субъединицы белка, а затем формируется гетеродимер. Однако такой путь не привел к успеху. Используя штамм *E. coli* BL21-CodonPlus, содержащий в геноме дополнительные копии генов tPHK к редким в *E. coli* кодонам, нам удалось наработать субъединицу Ku70, содержащую GST-метку на N-конце. Получить белок Ku80 не удалось по ряду причин: низкий уровень экспрессии, нерастворимость белка, значительный протеолиз.

С целью повышения растворимости белка Ku80 и уменьшения деградации Ku80 и Ku70, мы решили получать оба белка с одной плазмиды, с тем, чтобы они формировали гетеродимер непосредственно в клетке. Для этого сначала использовали вектор pETDuet-1, позволяющий ко-экспрессировать два гена с двух T7 промоторов. При этом первый белок (в нашем случае это Ku70) должен содержать 6xHis-метку на N-конце для очистки гетеродимера методом аффинной хроматографии на Ni-активированной агарозе. Тем не менее, ко-экспрессия генов двух белков не помогла избежать их протеолитической деградации и повысить растворимость, что особенно заметно в случае Ku80. Кроме того, нам не удалось добиться стабильной посадки на Ni-активированную смолу белка Ku70, а значит и всего гетеродимера (Рисунок 1).

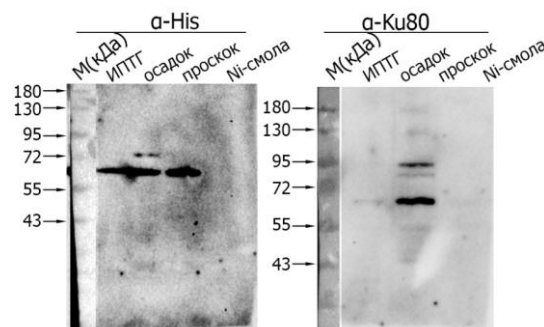


Рисунок 1. Связывание гетеродимера Ku, экспрессированного с pET-Duet-1, с Ni-NTA-смолой

Вестерн-блот анализ с антителами на 6xHis-Ku70 (α -His) и Ku80 (α -Ku80). М – дорожка с маркерами масс (кДа). Дорожки, обозначенные *ИПТГ* - содержат клеточный лизат после индукции транскрипции гена продуцируемого белка; *осадок* – осадок после центрифугирования клеток, разрушенных ультразвуком; *проскок* – белки, не связавшиеся со смолой; *Ni-NTA-смола* – смола со связавшимися после инкубации белками.

Есть только одна работа, в которой авторы получали рекомбинантный гетеродимер в бактериях и столкнулись с теми же проблемами, что и мы [3, р. 142]. Тем не менее, им удалось выделить гетеродимер Ku70/Ku80, используя бицистронную систему экспрессии, где кодирующие последовательности обеих субъединиц располагаются в одной мРНК в виде двух цистронов с внутренним сайтом посадки рибосом.

Мы сконструировали вектор для ко-экспрессии белков Ku70 и Ku80 с одной мРНК, аналогичный примененному в работе [3, р. 142]. В полученный ранее в нашей лаборатории вектор прокариотической экспрессии белка Ku70 с 6xHis-меткой на N-конце (на базе вектора прокариотической экспрессии pET-15b) было проведено клонирование гена Ku80 так,

чтобы в результате транскрипции получалась бицистронная мРНК с внутренним сайтом посадки рибосом. При этом между двумя цистронами, кодирующими Ku70 и Ku80, находился линкер, содержащий последовательности Шайна-Дальгарно и A/U-богатую последовательность. Однако с такой конструкции нам не удалось получить экспрессию гена белка Ku80, стоящим вторым.

Была проведена оптимизация полученного вектора так, чтобы экспрессия белка, ген которого стоит вторым в бицистронной конструкции, была сравнима с экспрессией белка с первого цистрона (Рисунок 2). В отличие от описанной в работе [3, р. 142] конструкции, наш новый вектор содержал последовательность Шайна-Дальгарно и A/U-богатую последовательность, расположенные внутри 3'-конца первого цистрона (гена Ku70). При этом рамки считывания первого и второго цистрона перекрывались на 1 нуклеотид: старт-кодон Ku80 начинался внутри стоп-кодона Ku70 (последовательность ТААТG). Такое взаимное расположение цистронов, последовательности Шайна-Дальгарно и A/U-богатой последовательности, согласно работе [6, р. 484], способствует повышению эффективности трансляции второго цистрона, и мы рассчитывали, что это позволит увеличить выход плохо экспрессирующегося белка Ku80.



Рисунок 2. Схема строения части вектора pET15b-bicis-Ku, кодирующей белки Ku70 и Ku80.

С одного T7 промотора (стрелка) транскрибируется бицистронная мРНК, содержащая две перекрывающиеся рамки считывания: указаны начало и конец каждой рамки (start, stop).

После оптимизаций условий экспрессии и выделения белка, описанных в [3, р. 141] нам удалось получить гетеродимер Ku70/Ku80. Факт получения именно этого белка был подтвержден методами масс-спектрометрии и Вестерн-блот анализа с использованием антител к каждой из субъединиц (Рисунок 3).

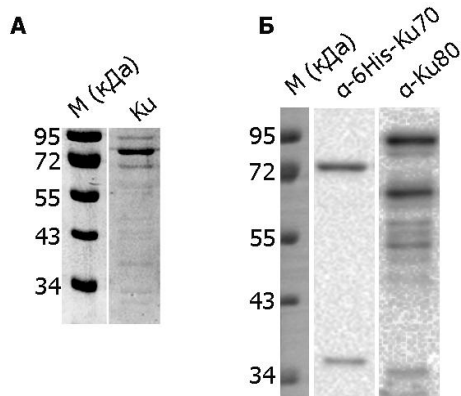


Рисунок 3. Анализ полученного препарата белка Ку. А.

ДСН-полиакриламидный гель, окрашенный Ку-масси. Препарат белка Ку с продуктами его протеолиза. Б. Вестерн-блот анализ препарата Ку с антителами на 6xHis-меченный Ku70 (α -His-Ku70) и на Ku80 (α -Ku80). М – дорожка с маркерами подвижности белков с массой в кДа.

Низкий выход белка (0,2-0,4 мг/л культуры *E. coli*), возможно, связан с большим размером субъединиц и наличием в их составе протяженных неструктурированных участков. Все это затрудняет формирование правильной укладки в прокариотической системе, из-за чего значительная часть белка оказывается в нерастворимом виде. Кроме того, Ku80 подвергается значительной протеолитической деградации. От большей части продуктов протеолиза нам удалось освободиться во время очистки, однако полученный препарат белка содержит не только полноразмерный полипептид, но и некоторое количество продуктов деградации, особенно заметное для субъединицы Ku80. Тем не менее, выделенный нами гетеродимер обладает ДНК- и РНК-связывающей активностью сравнимой с литературными данными.

Методика получения белка Ку

Клетки-продуценты BL21(DE3)Codon Plus трансформировали описанным выше вектором прокариотической экспрессии гетеродимера Ку, сконструированного на базе коммерчески-доступного вектора pET15b. Растили ночную культуру в среде

LB до OD₆₀₀ ~0.9 ое при 37°C. Объем «ночной» культуры составлял 10% от общего объема при выделении. После получения ночника основной объем культуры (4л) растили в среде 2YT с Amp (100 мкг/мл) и 1% глицерином при хорошем покачивании при 37°C до OD₆₀₀ ~0.8-0.9 ое. После этого культуру охлаждали до 18°C во льду и индуцировали экспрессию целевого белка добавлением 0.1 mM IPTG (или 20 г/л лактозы). Нарботка белка происходила в течение 20-24 ч при 18°C, через 12-15 ч после индукции клетки подкармливали лактозой (5 г/л). Биомассу осаждали центрифугированием (15мин 5000g), ресуспендировали клеточную массу в лизисном буфере L (50 mM TrisHCl pH 8.0, 2 mM β-меркаптоэтанол, 1 M NaCl, 5% глицерин, 1 mM PMSF, 0.4 M NH₄OAc, 5 mM имидазол, 1 г/л лизоцим) из расчета 1 г культуры на 20 мл буфера. Клетки лизировались 3 циклами заморозки в жидком азоте и оттаивании в ледяной воде с последующей обработкой ультразвуком. Клеточный дебрис осаждали центрифугированием при 4°C, 30 мин, 14000g. Метал-аффинную хроматографию лизата на Ni-активированной сефарозе производили бач-методом. К лизату добавляли 1 mM PMSF и Ni-активированную сефарозу, уравновешенную в буфере для промывания W1 (50 mM TrisHCl pH 8.0, 2 mM β-меркаптоэтанол, 1 M NaCl, 5% глицерин,

1 mM PMSF, 5 mM имидазол), качали ночь при 4°C. После связывания смолу осаждали центрифугированием и наносили в колонку. Сорбент промывали дважды 10-кратным объемом колонки буферами W1 и W2(50 mM TrisHCl pH 8.0, 2 mM β-меркаптоэтанол, 50 mM M NaCl, 5% глицерин, 1 mM PMSF, 5 mM имидазол). Элюцию проводили в буфере W2 с добавлением 0.5 M имидазола в течение 0.5-1 ч. Элюированный белок сразу подвергали хроматографической очистке на гепарин-сефарозе. Для этого белок наносили на уравновешенную в буфере A (50 mM TrisHCl pH 8.0, 2 mM β-меркаптоэтанол, 50 mM NaCl, 5% глицерин, 1 mM PMSF, 0.5 mM ЭДТА) 1 мл колонку Hi-Trap heparin (GE). Отмывали от неспецифически связанных белков буфером A с градиентом NaCl до 250 mM. Элюцию проводили буфером B (50 mM TrisHCl pH 8.0, 2 mM β-меркаптоэтанол, 1 M NaCl, 5% глицерин, 1 mM PMSF, 0.5 mM ЭДТА). Фракцию элюированного белка обессоливали до 250 mM NaCl и концентрировали на колонке AmiconUltra 30K (Millipore) на холоду. К полученному образцу добавляли глицерин до 20%.

Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-24-00061).

Список литературы:

1. Княжанская Е.С., Шадрин О.А., Анисенко А.Н., Готтих М.Б.. Роль ДНК-зависимой протеинкиназы в репликации ВИЧ-1 // Молекулярная биология. — 2016. — Т. 50. — № 4. — С. 639–654.
2. Fell V.L., Schild-Poulter C. The Ku heterodimer: function in DNA repair and beyond // Mutation research. Reviews in mutation research. — 2015. — V. 763. — P. 15-29.
3. Hanakahi L.A. 2-step purification of the Ku DNA repair protein expressed in Escherichia coli // Protein expression and purification. — 2007. — V. 52. — P. 139-145.
4. Hill R., Lee P.W. The DNA-dependent protein kinase (DNA-PK): more than just a case of making ends meet? // Cell Cycle. — 2010. — V. 9. — I. 17. — P. 3460-3469.
5. Jin S., Weaver D.T. Double-strand break repair by Ku70 requires heterodimerization with Ku80 and DNA binding functions // EMBO J. — 1997. — V. 16. — P. 6874–6885.
6. Osterman I.A., Evratov S.A., Sergiev P.V., Dontsova O.A. Comparison of mrna features affecting translation initiation and reinitiation // Nucleic Acids Research. — 2013. — V. 41. — P. 478-486.