

МОЛЕКУЛЯРНОЕ КЛОНИРОВАНИЕ И ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ЭКСПРЕССИЯ В КЛЕТКАХ *E. COLI* ЦИТОХРОМА *b₅* ВНЕШНЕЙ МЕМБРАНЫ МИТОХОНДРИЙ ЧЕЛОВЕКА

Г.В. Сергеев, А.В. Василевская, А.А. Гилеп, С.А. Усанов

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

Введение

Цитохром *b₅* внешней мембраны митохондрий человека (**ombH**) представляет собой небольшой отрицательно заряженный белок, содержащий в качестве простетической группы протопорфирин IX [1]. В структуре ombH выделяют два участка: N-концевой гидрофильный (служит для связывания с гемом) и C-концевой гидрофобный (выполняет две функции: заякоривает белок в мембране и несет положительный заряд, благодаря которому белок транспортируется в митохондрию) [2]. У человека данный белок главным образом локализован в клетках печени, надпочечников и семенников, где он закреплен во внешней мембране митохондрий. ombH является одной из двух изоформ цитохрома *b₅*, которые присутствуют в клетках человека. Вторая изоформа – микросомальный цитохром *b₅* – имеет схожую структурную организацию, но характеризуется более коротким гидрофобным участком и отсутствием положительного заряда на C-конце. Мембрансвязанные изоформы цитохрома *b₅* человека гомологичны на 48%. Различия в аминокислотном составе наиболее критичны в гидрофильном участке, в области, окружающей гем, что является причиной различий в стабильности белков и их каталитических свойствах [3]. Микросомальный цитохром *b₅* участвует в десатурации и удлинении жирных кислот, синтезе ряда липидов, включая плазмогены и холестерин, восстановлении гемоглобина в эритроцитах, а также модифицирует активность цитохромов P450, которые участвуют в окислении ксенобиотиков и эндогенных липофильных веществ (например, витамины А и D, ацетон, стероиды, такие как холестерол, эстрадиол, тестостерон и прогестерон, жирные кислоты, простагландины и лейкотриены) [4, 5, 6]. Функции ombH до настоящего времени не определены. Существуют литературные данные о стимуляции ombH 17,20-лиазной активности цитохрома P450 CYP17A1 человека при образовании дегидроэпиандростерона [7]. Помимо этого, было показано, что NADPH-цитохром P450 редуктаза и NADH-цитохром *b₅* редуктаза способны восстанавливать ombH [8, 9]. Таким образом, представляет научный интерес изучение влияния ombH на ферменты систем биосинтеза стероидных гормонов, как с точки зрения обнаружения новых каталитических свойств ombH, так и объяснения механизмов активности микросомального цитохрома *b₅* при сопоставлении аминокислотных последовательностей и каталитических свойств обеих изоформ цитохрома *b₅* в одних и тех же реакциях.

Целью настоящей работы было молекулярное клонирование последовательности гена *ombH* человека в экспрессионный вектор, разработка системы гетерологической экспрессии данного белка, выделение и очистка до гомогенного состояния функционально активного митохондриального цитохрома *b₅* человека.

Методы исследования

Сравнение нуклеотидных последовательностей и дизайн праймеров осуществляли с помощью программы Vector NTI 10.0 (Invitrogen, США). Выделение мРНК из образцов ткани молочной железы проводили набором РНК-ВТК (производство ИБОХ НАН Беларуси) с последующей обратной транскрипцией, используя набор Ready-To-Go Rt-PCR Beads (Amersham Pharmacia Biotech Inc). Амплификацию кДНК ombH проводили, используя праймеры: ombHnew5 5'-T CAT ATG GCG ACT GCG GAA GC-3' (жирным выделен сайт рестриктазы NdeI) и omb_hum_3 5'-GGT CGA CGA GGA TTT GCT TTC-3' (жирным выделен сайт рестриктазы SalI). Смесь для амплификации включала: 1,5 мМ MgCl₂, 1 ед. RTaq ДНК полимеразы (производство ИБОХ НАН Беларуси), 1x буфер для RTaq ДНК полимеразы (производство ИБОХ НАН Беларуси), 200 мкМ смеси dNTP's, 0,6 мкМ каждого

из праймеров, ~1 мкг ДНК матрицы. Программа для амплификации состояла из: 95°C 1 мин (1 цикл); 95°C 30 сек, 58°C 30 сек, 72°C 30 сек (30 циклов); 72°C 5 мин (1 цикл).

Лигирование ПЦР-фрагментов в экспрессионные векторы, трансформацию бактериальных клеток плазмидами проводили согласно [10].

Для проведения рестрикционного анализа, использовали эндонуклеазы фирмы NEB (Великобритания).

Титрование цитохрома *b₅* гемин хлоридом проводили в 10 mM калий-фосфатном буфере (рН 7,4), содержащем 0,2% холат натрия и 20% глицерин. В кювету (l=1см), содержащую 2 мкМ цитохрома *b₅* добавляли в эквимольном соотношении гемин хлорид (растворен в диметилсульфоксиде), то же количество гемин хлорида добавляли в кювету сравнения. Белок инкубировали при 25°C в течение 5 минут, после чего записывали абсолютный спектр в диапазоне 260–600 нм (Specord M-40, Германия). Титрование прекращали при снижении интенсивности роста оптической плотности на 413 нм. На основе эксперимента рассчитывали количество апобелка в растворе, исходя из молярного соотношения белок:гем=1:1.

Секвенирование ДНК проводили на приборе Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (США), используя набор реагентов ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit.

Концентрацию митохондриального цитохрома *b₅* определяли из абсолютного спектра поглощения окисленной формы гемопротейда, используя коэффициент молярной экстинкции 117 мМ⁻¹см⁻¹ при 413 нм.

Результаты и обсуждение

Последовательность, кодирующая митохондриальный цитохром *b₅* человека (название гена *CYB5B* или *type 2 cyt-b5*) расположена на 16 хромосоме (16q22.1).

	1		83
OmbH (1)	-----CATATGGCCACTGCGGAAAGCTAGCCGCAGCGATGGGAAAGGGCAGGAAAGTGGAGACCTCAGTCACCT		
BC014431.1 (1)	-----ATGGCCACTGCGGAAAGCTAGCCGCAGCGATGGGAAAGGGCAGGAAAGTGGAGACCTCAGTCACCT		
NM_030579.2 (1)	-----ATGTCGGGTTCATATGGCCACTGCGGAAAGCTAGCCGCAGCGATGGGAAAGGGCAGGAAAGTGGAGACCTCAGTCACCT		
NT_010194 (1)	AGGCAGTATTTCCAGTCCCAATGGCAACTGTGCAGCTAGCAGCAGTATGAAAAGGGCAGGGGGTAGGGACTCCACCACCT		
	84		166
OmbH (68)	ATTACCGGTTGGAGGAGGTGGCAAAGCGCAACTCCTTGAAGGAACCTGTGGCTTGTGATCCATGGGCGAGTCTACGATGTCACC		
BC014431.1 (65)	ATTACCGGTTGGAGGAGGTGGCAAAGCGCAACTCCTTGAAGGAACCTGTGGCTTGTGATCCATGGGCGAGTCTACGATGTCACC		
NM_030579.2 (77)	ATTACCGGTTGGAGGAGGTGGCAAAGCGCAACTCCTTGAAGGAACCTGTGGCTTGTGATCCATGGGCGAGTCTACGATGTCACC		
NT_010194 (84)	ATTAGCAGTTGGAGGAGGTGGTGAAGCAAACTCTTGAAGGAACCTGTGCTAGTAAATCCATGGGCGACTCTACGATGTTCCC		
	167		249
OmbH (151)	CGCTTCCCAACGAGCAACCCCTGGAGGAGAAAGAGTTCTGCTGGAAACAAGCTGGTGAGATGCAAAGTGAAAGCTTTGAGATGT		
BC014431.1 (148)	CGCTTCCCAACGAGCAACCCCTGGAGGAGAAAGAGTTCTGCTGGAAACAAGCTGGTGAGATGCAAAGTGAAAGCTTTGAGATGT		
NM_030579.2 (160)	CGCTTCCCAACGAGCAACCCCTGGAGGAGAAAGAGTTCTGCTGGAAACAAGCTGGTGAGATGCAAAGTGAAAGCTTTGAGATGT		
NT_010194 (167)	CACTTTG---AGGATCCCCCTGGCAGAGAAAAGTTCTGCTGGAAACAAGCTGGTGAGATGCAAAGTGAAAGCTTTGAGATGT		
	250		332
OmbH (234)	AGGCACCTCTTCTGATGCCAGAGAAATGCTAAAGCAGTACTACATTTGGTGATATCCATCCGAGTGACCTTAAACCTGAAAATG		
BC014431.1 (231)	AGGCACCTCTTCTGATGCCAGAGAAATGCTAAAGCAGTACTACATTTGGTGATATCCATCCGAGTGACCTTAAACCTGAAAATG		
NM_030579.2 (243)	AGGCACCTCTTCTGATGCCAGAGAAATGCTAAAGCAGTACTACATTTGGTGATATCCATCCGAGTGACCTTAAACCTGAAAATG		
NT_010194 (247)	AGGCACCTCTTCTGATGCCAGAGAAATGCTAAAGCAGTACTACATTTGGTGATATCCATTTGAGTGACCTTAAACCTGAAAAT		
	333		415
OmbH (317)	GTAGCAAGGACCTTCAAAAAATGATACATGCAAAAAGTTCTGGGCATATTTGGATTTTACCATCATAGGCGCTGTCTCTTTA		
BC014431.1 (314)	GTAGCAAGGACCTTCAAAAAATGATACATGCAAAAAGTTCTGGGCATATTTGGATTTTACCATCATAGGCGCTGTCTCTTTA		
NM_030579.2 (326)	GTAGCAAGGACCTTCAAAAAATGATACATGCAAAAAGTTCTGGGCATATTTGGATTTTACCATCATAGGCGCTGTCTCTTTA		
NT_010194 (330)	GT-GCAAGGATTTTCAAAAAATGACACATGCAAAAAGTTCTGGGCATATTTGGATTTTCCATCATAGGCGCTATCTCTTTA		
	416		484
OmbH (400)	GGTTCCGTACCCCTACTACACATCGGAAAGCAAAATCCTCGTCCAGCCCCTCATCATCATCATCATTGA		
BC014431.1 (397)	GGTTCCGTACCCCTACTACACATCGGAAAGCAAAATCCTCGT-GA-----		
NM_030579.2 (409)	GGTTCCGTACCCCTACTACACATCGGAAAGCAAAATCCTCGT-GA-----		
NT_010194 (412)	GGTTACCTGTCTCACTCTACATATTTGGAAAGCAAAATCCTCGT-GATGGC-----		

Рисунок 1 – Сопоставление последовательностей мРНК (NM_030579.2, BC014431.1), кодирующих цитохром *b₅* внешней мембраны митохондрий человека с клонированной последовательностью кДНК OmbH и участком 15 хромосомы человека (NT_010194) С помощью праймеров в последовательность кДНК OmbH в 5' область вводится *NdeI* сайт, в 3' область – *Sall* сайт и дополнительный остаток серина. Конструкция рТ7 вектора позволяет синтезировать белок с дополнительными шестью гистидинами на С-конце. Это обусловлено наличием перед стоп-кодоном последовательности, содержащей *Sall* сайт и гистидиновый кластер. Введение шести гистидинов позволяет проводить выделение фермента на Ni-NTA агарозе

В базе данных NCBI в качестве участка генома, содержащего ген *ombH*, выступает последовательность NC_000016.9, там же приводится структура матричной РНК (NM_030579.2). Анализ нуклеотидной последовательности NM_030579.2 показал, что ген *CYB5B* состоит из 5 экзонов и 4 интронов. В составе экзонов обнаружено несколько SNPs: в четвертом экзоне позиция 69 493 004 (A/C)-молчащая мутация, позиция 69 493 016 (A/G)-также молчащая мутация и в первом экзоне позиция 69 458 703 (-/G), которая приводит к смещению рамки считывания и появлению стоп кодона через пять аминокислот после данной мутации. Последующий поиск мРНК позволил обнаружить еще шесть последовательностей, кодирующих OmbH: BC014431.1, BC004373.1, AK291576.1, CR601351.1, CR610358.1, AB009282.1. Сопоставление найденных матричных РНК (в качестве референсной использовали NM_030579.2) выявило 100% гомологию между ними, за исключением последовательности AB009282.1, которая содержит две нуклеотидные замены A342C и A343C (вторая замена приводит к мутации Lys115Gln). Изучение последовательностей мРНК выявило, что в одних случаях OmbH состоит из 146 аминокислот (последовательности BC014431.1, BC004373.1, AK291576.1, AB009282.1), а в других – из 150 аминокислот (последовательность NM_030579.2) (рисунок 1). Разница обусловлена точкой начала трансляции белка: Met1 (150 аминокислот) или Met5 (146 аминокислот), причем в [7, 11] упоминаются обе формы белка. При подборе праймеров первым кодоном был выбран Met5 по аналогии с цитохромом *b5* внешней мембраны митохондрий крысы, длина которого составляет 146 аминокислот.

Для клонирования последовательности OmbH в вектор, проводили выделение РНК из ткани молочной железы человека с последующей ОТ-ПЦР, как это описано в разделе «Методы исследования». Полученный пул кДНК использовали для постановки ПЦР с праймерами *ombHnew5* и *omb_hum*. Продукты ПЦР реакции разделяли методом электрофореза в 1% агарозном геле. ПЦР продукт, по массе соответствующий 441 п.н., вырезали из агарозного геля и очищали, используя набор QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, США). Очищенный ПЦР продукт лигировали в вектор рXcmKn12, после чего полученной конструкцией трансформировали клетки *E.coli* DH5 α . Наличие правильной вставки подтверждали секвенированием. В нескольких полученных конструкциях вставка демонстрировала лишь 84% гомологии с последовательностью OmbH (рисунок 1).

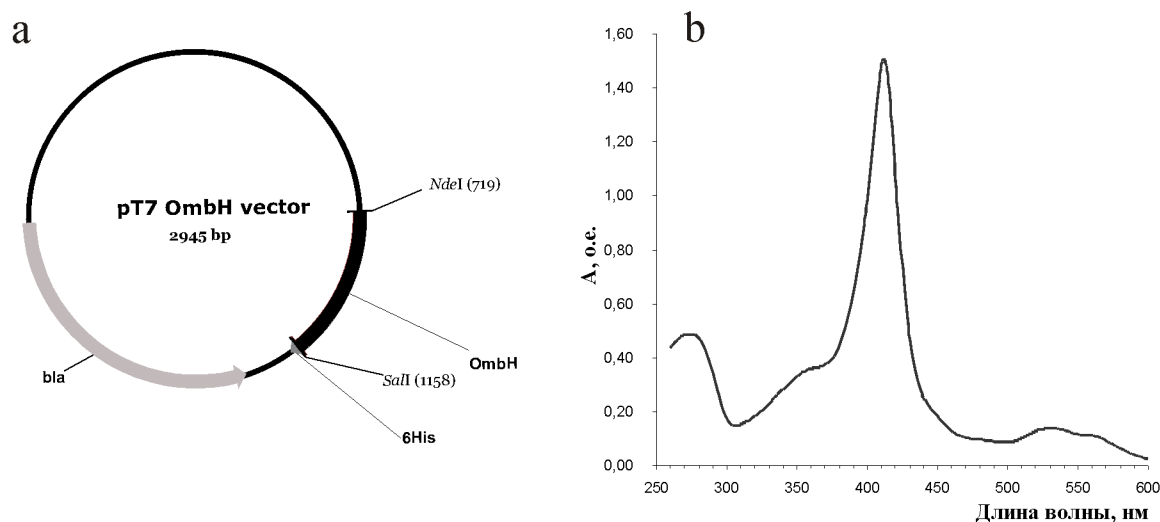


Рисунок 2 – Конструкция вектора рТ7 OmbH (а) и абсолютный спектр препарата OmbH (б)

Анализ базы данных Nucleotide (NCBI) показал, что данная вставка на 100% гомологична участку 15 хромосомы человека (NT_010194, Region: 17910260..17910720). При трансляции данного участка уже на 23 аминокислоте появляется стоп-кодон. Амплификация участка 15 хромосомы обусловлена, по-видимому, загрязнением пула кДНК геномной ДНК

человека, высокой гомологией 5' и 3' областей последовательности OmbH и участка 15 хромосомы, в связи с чем праймеры ombHnew5 и omb_hum также связались с 15 хромосомой и что ПЦР продукт при амплификации участка 15 хромосомы по длине аналогичен последовательности кДНК OmbH. Объяснение наличия участка на 15 хромосоме с высокой гомологией с последовательностью OmbH в литературных источниках отсутствует.

Векторную конструкцию pXcmKn12, содержащую последовательность кДНК OmbH, обрабатывали рестриктазами NdeI и Sall. Полученный фрагмент (441 п.н.) лигировали в экспрессионный вектор pT7 (рисунок 2). Созданной конструкцией трансформировали клетки *E.coli* BL21. Полученную плазмиду использовали для проведения аналитической экспрессии. Для этого, ночную культуру клеток *E.coli* BL21, содержащих вектор pT7OmbH, разводили 1:200 ТВ-средой ($V=5$ мл), содержащей 100 мкг/мл ампициллина. Клетки инкубировали при 37°C и аэрации 180 rpm до достижения оптической плотности $A_{600}=0,6-0,8$, после чего в среду добавляли ИПТГ до конечной концентрации 0,5мМ. Экспрессию белка осуществляли при 23°C и интенсивности перемешивания – 130 rpm в течение 48 часов. Затем клетки осаждали при 3000 об/мин в течение 10 минут. В тех клонах, где OmbH экспрессировался, осадок был окрашен в красный цвет. С данными клонами проводили последующую препаративную экспрессию белка.

Для постановки препаративной экспрессии использовали 2 л ТВ-среды. Условия роста клеток и синтеза белка были идентичны условиям аналитической экспрессии. Выделение и очистку OmbH проводили по методике, описанной ранее [8]. Как и в случае с митохондриальным цитохромом b_5 крысы экспрессия белковой части OmbH опережает синтез простетической группы OmbH в бактериальных клетках. Это служит причиной того, что до 50% OmbH экспрессируется в апоформе. Для получения холобелка, после стадии очистки на Ni-NTA агарозе, к препарату OmbH добавляли гемин хлорид. Для очистки препарата белка от несвязавшегося гемин хлорида, белок наносили на колонку с гидроксипатитом (Bio-Gel HTP, Bio-Rad). После нанесения препарата белка колонка промывалась 10 объемами 10 мМ К-фосфатного буфера (pH 7,4), содержащего 0,2% холат натрия. Элюция белка с колонки осуществлялась 400 мМ К-фосфатным буфером (pH 7,4), содержащим 0,2% холат натрия и 20% глицерин.

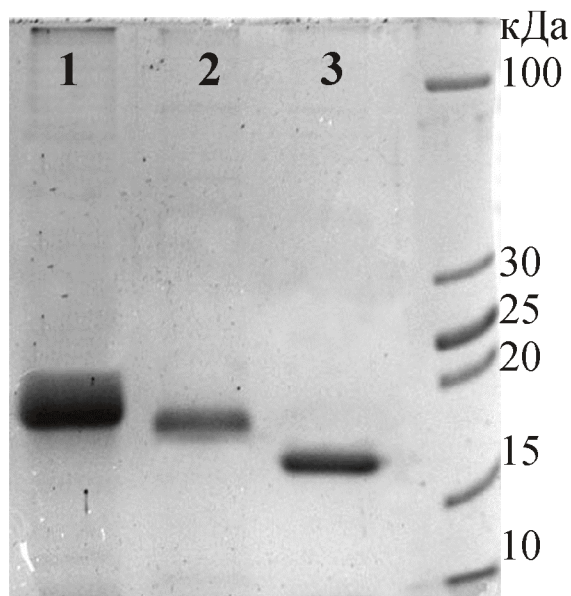
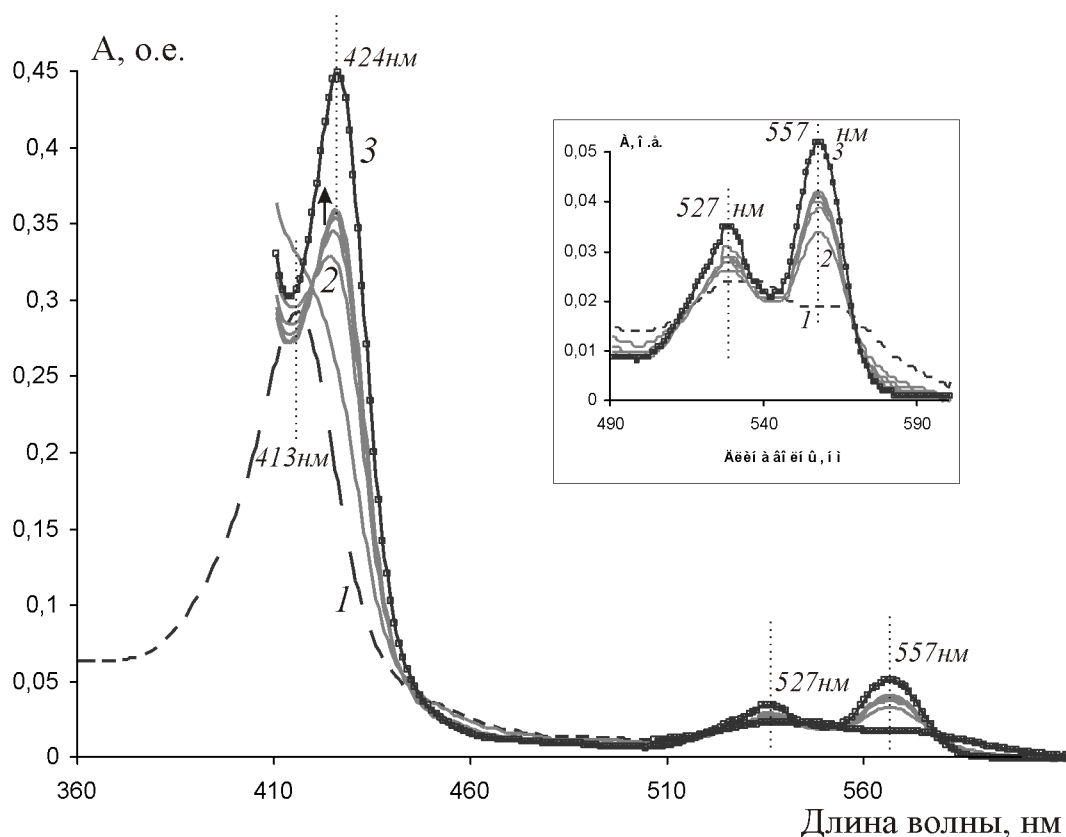


Рисунок 3 – Электрофорез в 15% ПААГ в денатурирующих условиях препарата цитохрома b_5 внешней мембраны митохондрий человека (1). В качестве образцов сравнения приведены митохондриальный цитохром b_5 крысы (2) и микросомальный цитохром b_5 крысы (3)

Для изучения свойств полученного OmbH, был записан абсолютный спектр препарата белка и проведен ПААГ электрофорез в денатурирующих условиях. Как видно из рисунка 2, OmbH обладает спектральными свойствами характерными для цитохромов b_5 : максимум поглощения белковой части – 280 нм, максимум поглощения простетической группы белка – 413 нм, соотношение $A_{413}/A_{280}=2,5$ говорит об фактически полном отсутствии апоформы в препарате фермента. Результат электрофореза подтверждает высокую степень чистоты

препарата OmbH и соответствие молекулярной массы белковой полосы массе OmbH (17300 Да) (рисунок 3).



1 – спектр окисленного OmbH;
 2 – восстановление OmbH P450 редуктазой во времени;
 3 – спектр восстановленного OmbH после добавления дитионита натрия
 Стрелка указывает на направление нарастания поглощения при восстановлении OmbH P450 редуктазой

Рисунок 4 – Восстановление цитохрома b_5 внешней мембраны митохондрий человека NADPH цитохром P450 редуктазой

Для изучения восстановления OmbH NADPH-цитохром P450 редуктазой, в кювету, содержащую 10 мМ Трис-НСI (рН 8,0), 0,3 М NaCl, 100 мкМ NADPH и 2,5 мкМ OmbH, добавляли 0,6 нмоль/мл NADPH-цитохром P450 редуктазы и фиксировали восстановление цитохрома b_5 по возрастанию оптической плотности на 424, 527 и 557 нм. После прекращения роста пика на 424 нм, в кювету добавляли гранулу дитионита натрия, чтобы оценить полноту восстановления цитохрома b_5 P450 редуктазой. Как видно из рисунка 4, NADPH-цитохром P450 редуктаза восстанавливает до 80% OmbH, содержащегося в пробе.

Выводы

В результате проделанной работы была получена последовательность кДНК цитохрома b_5 внешней мембраны митохондрий человека; создана экспрессионная система (*E.coli* BL21+pT7ombH vector), с помощью которой уровень экспрессии белка достигает 3000 нмоль на 1 литр культуральной среды; выделено 6 мкмоль препарата митохондриального цитохрома b_5 человека высокой степени чистоты; выделенный белок по своим свойствам (спектральные, подвижность в SDS-электрофорезе, способность восстанавливаться редуктазами) соответствует OmbH.

Список литературы

1. Mammalian mitochondrial and microsomal cytochromes b(5) exhibit divergent structural and biophysical characteristics / L. Altuve [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2004. – Vol.314. – P. 602–609.
2. Ito, A. Cytochrome b5-like hemoprotein of outer mitochondrial membrane; OM cytochrome b. I. Purification of OM cytochrome b from rat liver mitochondria and comparison of its molecular properties with those of cytochrome b5 / A. Ito // *J. Biochem.* – 1980. – Vol. 87. – P. 63–71.
3. Probing the differences between rat liver outer mitochondrial membrane cytochrome b5 and microsomal cytochromes b5 / A. Altuve [et al.] // *Biochemistry.* – 2001. – Vol. 40. – P. 9469–9483.
4. Interaction between cytochrome b5 and hemoglobin: involvement of beta 66 (E10) and beta 95 (FG2) lysyl residues of hemoglobin / G. Gacon [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1980. – Vol. 77. – P. 1917–1921.
5. Hydroxylation of prostaglandins by inducible isozymes of rabbit liver microsomal cytochrome P-450. Participation of cytochrome b5 / K.P. Vatsis [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1982. – Vol. 257. – P. 11221–11229.
6. Omega-1 and omega-2 hydroxylation of prostaglandins by rabbit hepatic microsomal cytochrome P-450 isozyme 6 / K.A. Holm [et al.] // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1985. – Vol. 243. – P. 135–143.
7. Soucy, P. Assessment of the ability of type 2 cytochrome b5 to modulate 17,20-lyase activity of human P450c17 / P. Soucy, V. Luu-The // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* – 2002. – Vol. 80. – P. 71–75.
8. Expression of outer mitochondrial membrane cytochrome *b5* in *Escherichia coli*. purification of the recombinant protein and studies of its interaction with electron-transfer partners / G.V. Sergeev [et al.] // *Biochemistry (Mosc).* – 2006. – Vol. 71. – P. 790–799.
9. Сергеев, Г.В. Различная природа взаимодействия митохондриального и микросомального цитохромов b5 с NADPH-цитохром P450 редуктазой / Г.В. Сергеев // Сборник материалов международной научной конференции «Молодёжь в науке 2004», Минск, 8–13 ноября 2004 г. / Академия Наук Беларуси; редкол.: Н.П. Круцько [и др.]. – Минск, 2004. – С. 63–67.
10. Maniatis, T. *Molecular cloning: A laboratory manual* / T. Maniatis. – Brooklyn: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. – 545 p.
11. The sequence and analysis of duplication-rich human chromosome 16 / J. Martin [et al.] // *Nature.* – 2004. – Vol. 432. – P. 988–994.

MOLECULAR CLONING AND HETEROLOGOUS EXPRESSION IN *E.coli* OF THE HUMAN OUTER MITOCHONDRIAL CYTOCHROME *b5***G.V. Sergeev, A.V. Vasilevskaya, A.A. Gilep, S.A. Usanov***The Institute of bioorganic chemistry NASB, Minsk, Belarus*

We have cloned cDNA sequence of human outer mitochondrial membrane cytochrome *b5* and created expression system (*E.coli* BL21 pT7ombHuman vector), which allowed to achieve the level of protein expression over 3000 nmol per liter of culture medium. We purified 6 μ mol of human mitochondrial cytochrome *b5*. It was shown by spectral methods, SDS-electrophoresis, and the ability of being reduced by reductases that purified protein possesses properties of native outer mitochondrial membrane cytochrome *b5*.