

УДК 616-092

Получение рекомбинантного белка S100B в аналитических и препаративных количествах с использованием векторной системы pBT7-N-His и первые этапы его структурно-функциональных исследований

Терёхина О.Л.¹, Нурбеков М.К.¹, Дмитренко О.П.², Давыдов Д.М.¹¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение

«Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии».

125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

² Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы».

107014, Москва, ул. Стромынка, д.10

С целью исследований структуры и функций белка S100B в клетке и в тканях был проведен цикл работ по оптимизации экспрессии рекомбинантного белка (рекS100B) в *E. coli*. Проведены процедуры аналитической экспрессии рекS100B в составе рекомбинантной плазмиды pBT7-N-His-S100B03. При SDS-ПААГЭ лизатов клонов бактерий выявлена четко экспрессирующаяся полоса в 10 кДа, которая была идентифицирована как мономерная форма белка. Перспективы исследований рекS100B связаны с потенциальным его использованием для изучения тонких молекулярных механизмов PPI взаимодействий в системе S100B/RAGE рецептор как ключевого звена передачи сигналов в клетке и организме и в качестве перспективного объекта создания диагностических систем мониторинга состояний организма в норме и при патологии связанной с нарушениями регуляции гена и/или функций S100B белка.

Ключевые слова: гетерологичная экспрессия кДНК; рекомбинантный белок S100B; векторная система pBT7-N-His; рекомбинантная плазида; оптимизация гетерологичной экспрессии; аналитическая и препаративная экспрессия белков; фолдинг белка; металл-аффинная хроматография белков.

Для цитирования: Терёхина О.Л., Нурбеков М.К., Дмитренко О.П., Давыдов Д.М. Получение рекомбинантного белка S100B в аналитических и препаративных количествах с использованием векторной системы pBT7-N-His и первые этапы его структурно-функциональных исследований. *Патогенез*. 2018; 16(4): 161-164

DOI: 10.25557/2310-0435.2018.04.161-164**Для корреспонденции:** Нурбеков Малик Кубанычбекович, e-mail: mlkn47@mail.ru**Финансирование.** Исследование не имеет спонсорской поддержки.**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.**Поступила:** 16.10.2018

Analytical and preparative biosynthesis of S100B recombinant protein using the pBT7-N-His vector system and preliminary studies of structure and function of this protein

Terekhina O.L.¹, Nurbekov M.K.¹, Dmitrenko O.P.², Davidov D.M.¹¹ Institute of General Pathology and Pathophysiology,

Baltiyskaya Str. 8, Moscow 125315, Russian Federation

² Moscow City Tuberculosis Research and Practical Center,

Stromynka Str. 10, Moscow 107014, Russian Federation

To study structure and functions of the S100B protein in cells and tissues, a series of studies was conducted to optimize the recombinant protein (рекS100B) expression in *E. coli*. Procedures for analytical expression of рекS100B in the pBT7-N-His-S100B03 recombinant plasmid were performed. In SDS-PAGE of bacterial clone lysate, a clear 10 kDa band expression was detected, which was identified as a monomeric form of the protein. Prospects for the S100B study are related with its potential use for investigating molecular mechanisms of PPI interactions in the S100B/RAGE system as a key signal transducer in the cell and body and as a promising object for developing diagnostic systems for monitoring the body state in normal and pathological conditions associated with impaired regulation of the gene and/or functions of the S100B protein.

Keywords: heterologous cDNA expression; recombinant protein S100B; pBT7-N-His vector system; cloning and expression strategy; Genome compiler; protein folding; analytical and preparative protein expression; metal affinity protein chromatography.

For citation: Terekhina O.L., Nurbekov M.K., Dmitrenko O.P., Davydov D.M. [Analytical and preparative biosynthesis of S100B recombinant protein using the pBT7-N-His vector system and preliminary studies of structure and function of this protein]. *Patogenesis [Pathogenesis]*. 2018; 16(4): 161-164 (in Russian).

DOI: 10.25557/2310-0435.2018.04.161-164**Corresponding author:** Nurbekov Malik Kubanychbekovich, e-mail: mlkn47@mail.ru**Funding.** The study had no sponsorship.**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.**Received:** 16.10.2018

Введение

Важность S100B белка, как объекта структурно-функциональных исследований, проистекает от большого комплекса биологических функций, выполняемых этим белковым фактором в клетке и во внеклеточной среде (цитокинные функции). S100B вовлечен в трансдукцию сигналов, контролирующих активность ферментов энергетического обмена в клетках мозга [1], кальциевый гомеостаз [2], клеточный цикл, функции цитоскелета, играет важную роль в процессах нормального развития ЦНС и в процессах восстановления после повреждений. Достоверно установлена ценность белка в качестве информативного маркера таких распространенных патологий, как инсульт, нейродегенеративные заболевания, психопатологии (шизофрения), болезней ассоциированных с процессом старения [3–5]. В силу сказанного белковый фактор S100B может быть использован в качестве важного маркера при оценке эффективности лечения и прогнозе развития патологий. Базовой предпосылкой начала цикла структурно-функциональных исследований белка из труднодоступных источников является получение рекомбинантного белка с помощью гетерологической экспрессии.

Несмотря на наличие довольно большого числа разработанных систем гетерологической экспрессии, применение бактериальных систем с использованием *E. coli* является основной и наиболее востребованной системой в силу ее относительной простоты, дешевизны, воспроизводимости и изученности. В соответствии с вышесказанными задачами в работе были: а) проведение комплекса процедур экспрессии белка S100B, б) валидизация продукта по основным структурно-функциональным характеристикам.

Материалы и методы исследования

Получение рекомбинантной плазмиды и ее характеристика.

Для целей гетерологической экспрессии кДНК S100B была получена рекомбинантная плаزمида pBT7-N-His-S100B03, содержащая кДНК под контролем промотора гена T7 РНК-полимеразы. Дизайн процедуры клонирования осуществляли с помощью онлайн пакета программ Genome compiler. Процедура клонирования осуществлена по уникальному сайту рестрикции EcoRY в участке клонирования и экспрессии плазмиды как описано в [6].

Для трансформации плазмидной ДНК pBT7-N-His-S100B03 в штамм BL-21 (DE3) приблизительно 1 мкг ДНК смешивали с 100 мкл компетентных клеток («Евроген», Москва), инкубировали 20 мин. во льду. Затем проводили процедуру хит-шока 30-45 с при 42°C, помещали клетки обратно в лед на 2 мин., добавляли 400-500 мкл SOC среды и инкубировали при 37°C 30 мин при перемешивании. Рассеивали клетки по 50-100 мкл на чашки с ампициллином (50 мкг/мл) (http://molbiol.ru/protocol/03_04.html).

Аналитическая экспрессия S100B кДНК в составе рекомбинантной плазмиды pBT7-N-His-S100B03 в клетках E. coli штамма BL-21(DE3).

Ночную культуру клеток BL-21(DE3), трансформированных плазмидой pBT7-N-His-S100B03, высевали в 25 мл LB-среды с 50 мкг/мл ампициллина, добавив 1 мл культуры, и инкубировали при 37°C до достижения

плотности 0,6-0,8 ое/мл. В среду добавляли препарат индуктора IPTG (Сибэнзим, Москва) до 1 мМ и инкубировали еще 3-4,5 часа при 37°C при перемешивании при 250 об./мин. Аликвоту 1-2 мл клеток осаждали центрифугированием при 10 тыс. об./мин 5 мин., супернатант отбрасывали, осадок суспендировали в 1-кратной смеси для нанесения на ПААГ гель, прогревали в кипящей водяной бане 10 мин. и центрифугировали 5 мин. при 10 тыс. об./мин. Затем 10-15 мкл надосадочной жидкости наносили на градиентный ПААГ гель 10%-15%. Электрофорез проводили при напряжении 75 В в течение 2-3 часов (http://molbiol.ru/protocol/17_01.html).

Иммуноблоттинг лизатов и экстрактов клеток *E. coli* с проиндуцированным синтезом рекомбинантного белка S100B при действии IPTG.

После проведения процедуры SDS-ПААГЭ картину разделения геля переносили на PVDF мембраны (Bio-Rad, США). Перенос осуществляли, как рекомендовано в (http://molbiol.ru/protocol/17_08.html), с использованием прибора «Semi-dry» («Хеликон», Москва), по прописи фирмы в течение 25 мин. при максимальной силе тока 2 мА/см². Далее осуществляли процедуру гибридизации, как описано в (http://molbiol.ru/protocol/17_08.html), с первичными антителами (П-АТ) в гибридизационном буфере (ГБ) при NT. Мембраны отмывали с Tween20 и сухим молоком 3 раза по 5 мин. при NT, гибридизовали со вторичными АТ (В-АТ) в запаянных полиэтиленовых пакетах при 26°C, и проявляли с использованием проявляющей смеси ECL (http://molbiol.ru/protocol/17_08.html).

Экспрессия в препаративных количествах и очистка рекомбинантного S100B белка на колонках Ni-сефарозы.

Для экспрессии в препаративных количествах получали ночную культуру как указано выше. 1 мл ночной культуры клеток BL-21 с рекомбинантной плазмидой pBT7-N-His-S100B03 добавляли к 200 мл ТВ-среды (http://molbiol.ru/solution/03_05.html#a7) с 50 мкг/мл ампициллина и инкубировали 2-3 часа при 37°C до достижения оптической плотности 3,0-5,0 ое/мл при 250 об./мин. Затем к суспензии клеток добавляли IPTG до 0,5 мМ и инкубировали при интенсивном перемешивании 250-300 об./мин. в колбе на 1 л в течение ночи при 30°C. Суспензию осаждали при 5-7 тыс. об./мин. при +4°C, супернатант отбрасывали, осадок клеток суспендировали в ПБС буфере (http://molbiol.ru/solution/03_06.html#a27) pH 7,5, с 1 мМ PMSF в объеме 15-20 мл. Клетки обрабатывали ультразвуком (20 кГц) во льду [8], короткими импульсами по 10 с, с охлаждением 30 с, 7-10 раз. Затем экстракт центрифугировали при 10-14 тыс. об./мин. при +4°C. Аликвоты супернатанта и осадка обрабатывали 1-кратным буфером для нанесения на 12%-ный ПААГ гель и проводили электрофорез. Супернатант и осадок либо замораживали при -80°C, либо чистили на колонках с Ni-сефарозой («Sigma», США) по прописи фирмы.

Результаты исследования

С целью идентификации и подтверждения наличия нативной конформации и биологической активности рекS100B проведены исследования по оптимизации гетерологической экспрессии S100B в клетках штамма BL-21

(DE3). Для этого получали ночную культуру отдельного клона с рекомбинантной плазмидой pBT7-N-His-S100B03. Отбирали в разные интервалы времени алиquotы суспензии бактерий, обрабатывали их в стандартной смеси для нанесения на гель, и проводили процедуру SDS-ПААГЭ.

После прокрашивания геля кумасси видна четкая экспрессия полосы, соответствующей мономерной форме белка S100B в 10 кДа, немного выше видна слабая полоса димерной формы белка с молекулярной массой в 21 кДа (рис. 1, А). Из чего можно сделать важный вывод о наличии пострансляционной модификации и образования дисульфидных S-S связей в рекS100B. Выявлена также слабая динамика накопления рекS100B в ходе индукции (рис. 1, Б) – быстрый синтез белка сразу после индукции, достигающий практически максимума, и практически не меняющийся в ходе инкубации.

На рис. 1 также виден сигнал взаимодействия моноспецифических антител к S100B («Биалекса», Москва) с антигеном – рекS100B, соответствующий по форме и интенсивности полосе в 10 кДа, видной на геле, прокрашенном кумасси. Полученный результат подтверждает соответствие полученного рекомбинантного белка именно белку S100B. Косвенно картина выявления экспрессируемого белка комплексом моноспецифических антител к S100B свидетельствует в пользу наличия биологической активности у полученного рекомбинантного белка. Окончательный вывод требует отдельных *in vitro* или *in vivo* экспериментов по изучению комплекса биологических активностей полученного белка.

Следующей важной задачей была оптимизация процедуры экспрессии рекS100B с целью получения максимального выхода белка. Наиболее простым методом оптимизации экспрессии белков является вариации в условиях культивирования, составе среды инкубирования, температуры и времени инкубации [7]. Нами использована более богатая среда Terrific Broth, pH 7,0 (http://molbiol.ru/solution/03_05.html#a7). При использовании данной среды можно подращивать до более высокой оптической плотности. Мы растили среду до плотности 3-5 ое/мл, для индукции использовали 0,5 мМ IPTG. Оптимальная экспрессия наблюдалась при более низкой температуре (30°C) инкубации после индукции. После проведения процедуры экстракции обработкой биомассы ультразвуком рекомбинантный белок чистили на Ni-сефарозной колонке как указано в прописи фирмы.

На рис. 2 показан профиль элюции белка на колонке, а также данные денситограммы иммуноблот анализа фракций элюента в области пиковых значений. Правильные колоколообразные пики выхода рекS100B и совпадения пика интенсивности иммуноблот сигнала с пиком оптической плотности свидетельствует о чистоте и гомогенности препарата рекS100B. Выход соответствует приблизительно 5% от суммарного белка клетки хозяина, что является достаточно высоким уровнем.

Обсуждение

Несмотря на хорошую изученность систем экспрессии на базе *E. coli* и, в частности, использованной в работе векторной системы системы pBT7-N-His, требует-

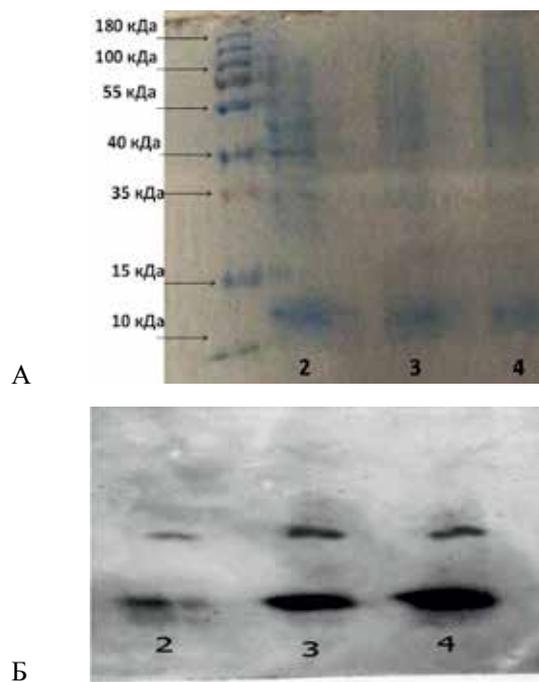


Рис. 1. А: Картина SDS-ПААГЭ аналитической экспрессии клона с рекомбинантной плазмидой pBT7-N-His-S100B03. Слева направо: 1 стандартные белковые маркеры (стрелками указаны молекулярные массы в кДа); 2 – лизат клона сразу после добавления IPTG; 3 – инкубация 2,5 часа с IPTG; 4 – инкубация 4,5 часа с IPTG. Б: Картина иммуноблот анализа SDS-ПААГЭ геля при аналитической экспрессии отобранных клонов с рекомбинантным вектором pBT7-N-His-S100B03. Номера дорожек слева направо: 2 – клон сразу после добавления IPTG; 3 – инкубация 2,5 часа с IPTG; 4 – инкубация 4,5 часа с IPTG.

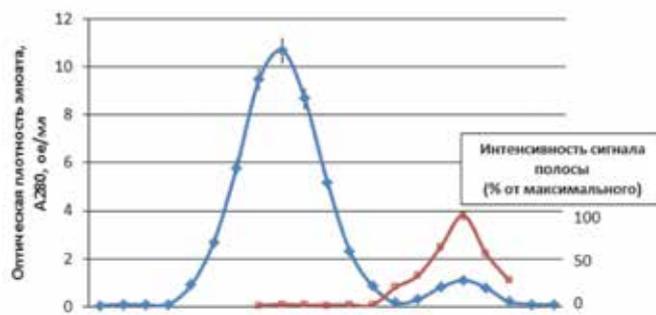


Рис. 2. Профиль элюции с колонки Ni-сефарозы (◆) и данные денситометрического сканирования (■) иммуноблота с геля после SDS-ПААГЭ и процедур гибридизации с моноспецифическими (П-АТ) к S100B, визуализации с вторичными антителами (В-АТ) и процедуры проявления.

ся учитывать специфику конкретного экспрессируемого белка. Среди важных проблем процесса можно указать неизученные специфические особенности экспрессируемой последовательности, которые влияют на стабильность и транслируемость мРНК, фолдинг белка в клетке хозяина, степень деградации белка внутриклеточными протеазами и необходимость индивидуального подбора ингибиторов протеаз, потенциальная токсичность белка для клетки хозяина [7]. Среди общих для большинства экспрессируемых белков проблем непосредственного

культивирования бактерий в ходе процедуры экспрессии можно указать потерю плазмид из клеток хозяина при культивировании, существенное закисление среды, недостаточный доступ к кислороду в ходе культивирования. Этот спектр вопросов и решался нами в ходе оптимизации экспрессии кДНК S100B.

Полученный результат открывает хорошие перспективы дальнейших исследований структуры и функций белка и его роли в функционировании и организма в норме и при патологии. Большое количество данных по важной роли белка в развитии болезней ассоциированных со старением [3-6], раскрывает хорошие перспективы его применения в качестве мишени для таргетной терапии как основы современной персонализированной высокоточной медицины. Кроме того, стремительное развитие технологий создания и применения биологических препаратов и терапий [8] делает актуальным поиск новых перспективных объектов направленной терапии, в том числе и терапий, направленных на замедление старения и болезней, ассоциированных со старением.

Заключение

Нами получены: 1) экспрессия рекS100B, что подтверждено процедурами иммуноблот анализа; 2) оптимизированы условия для препаративной экспрессии белка; 3) проведена процедура его очистки на колонке Ni-сефарозы. Полученный результат позволяет продолжить цикл структурно-функциональных исследований рекS100B, как с точки зрения фундаментальных аспектов его участия в важных биологических процессах и роли в развитии патологий, ассоциированных со старением, так и прикладных исследований по областям применений белка в качестве маркера указанных патологий и состояний организма в норме при различных физических и психических стрессах.

Список литературы

1. Sorci G., Riuzzi F., Arcuri C., Tubaro C., Bianchi R., Giambanco I., Donato R. S100B protein in tissue development, repair and regeneration. *World J Biol Chem.* 2013; 4(1): 1-12. DOI: 10.4331/wjbc.v4.i1.1
2. Sen J., Belli A.J. S100B in neuropathologic states: the CRP of the brain? *J. Neurosci. Res.* 2007; 85(7): 1373-1380. DOI: 10.1002/jnr.21211

Сведения об авторах:

Терёхина Ольга Леонидовна – научный сотрудник лаборатории регуляции репаративных процессов Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Нурбеков Малик Кубанычбекович – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории регуляции репаративных процессов Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Дмитренко Ольга Павловна – заведующая диспансерным фтизиатрическим отделением Филиала по Зеленоградскому административному округу Государственного бюджетного учреждения здравоохранения «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы»

Давыдов Дмитрий Михайлович – кандидат медицинский наук, ведущий научный сотрудник лаборатории общей и перинатальной нейроиммунопатологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

3. *Актуальные проблемы нейроиммунопатологии* / Под ред.: Г.Н. Крыжановского, С.В. Магаевой, С.Г. Морозова. М.: Гениус Медиа; 2012. 424 с.
4. Крыжановский Г.Н., Акмаев И.Г., Магаева С.В., Морозов С.Г. *Нейроиммуноэндокринные взаимодействия в норме и патологии*. М.: Медицинская книга; 2011. 287 с.
5. Акмаев Э.Г., Александров А.С., Алчинова И.Б., Бочаров Е.В., Карганов М.Ю., Крыжановский Г.Н., Кучеряну В.Г., Магаева С.В., Морозов С.Г., Носкин Л.А., Панфилов Д.Н., Пшеничкова М.Г., Сарманаев С.Х., Сепиашвили Р.И., Сюч Н.И., Фисун А.Я., Чувин Б.Т. *Санология* / Под ред.: А.А. Кубатиева, В.Б. Симоненко. М.: Наука, 2014. 285 с.
6. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 479 с.
7. Rosano G.L., Ceccarelli E.A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front. Microbiol.* 2014; 5: 172. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00172
8. Bahreini E., Aghaiypour K., Abbasalipourkabir R., Goodarzi M.T., Saidijam M., Safavieh S.S. An optimized protocol for overproduction of recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 2014; 44(5): 510-528. DOI: 10.1080/10826068.2013.833116

References

1. Sorci G., Riuzzi F., Arcuri C., Tubaro C., Bianchi R., Giambanco I., Donato R. S100B protein in tissue development, repair and regeneration. *World J Biol Chem.* 2013; 4(1): 1-12. DOI: 10.4331/wjbc.v4.i1.1
2. Sen J., Belli A.J. S100B in neuropathologic states: the CRP of the brain? *J. Neurosci. Res.* 2007; 85(7): 1373-1380. DOI: 10.1002/jnr.21211
3. *[Actual problems of neuroimmunopathology]* / Edited by G.N. Kryzhanovsky, S.V. Magaeva, S.G. Morozov. M.: Genius Media; 2012. 424 p. (in Russian)
4. G Kryzhanovsky G.N., Akmaev I.G., Magaeva S.V., Morozov S.G. *[Neuroimmune-endocrine interactions in health and disease]*. - M.: Medicinskaya kniga; 2011. 287 p. (in Russian)
5. Akmaev E.G., Aleksandrov A.S., Alchinova I.B., Bocharov E.V., Karganov M.Yu., Kryzhanovskij G.N., Kucheryanu V.G., Magaeva S.V., Morozov S.G., Noskin L.A., Panfilov D.N., Pshennikova M.G., Sarmanaev S.H., Sepiashvili R.I., Syuch N.I., Fisun A.YA., CHuvin B.T. *[Sanologiya]* / Ed. A.A. Kubatiev, V.D. Simonenko. M.: Nauka, 2014, 285 p. (in Russian)
6. Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J. *[Methods of genetic engineering. Molecular cloning]*. M.: Mir, 1984. 479 p. (in Russian)
7. Rosano G.L., Ceccarelli E.A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Front. Microbiol.* 2014; 5: 172. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00172
8. Bahreini E., Aghaiypour K., Abbasalipourkabir R., Goodarzi M.T., Saidijam M., Safavieh S.S. An optimized protocol for overproduction of recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 2014; 44(5): 510-528. DOI: 10.1080/10826068.2013.833116