

## БИОСИНТЕЗ $\beta$ 2-АДРЕНЕРГИЧЕСКОГО РЕЦЕПТОРА ЧЕЛОВЕКА В КЛЕТКАХ МЕТИЛОТРОФНЫХ ДРОЖЖЕЙ *Pichia pastoris* И ЕГО ОЧИСТКА

© 2012 г. А. С. Герасимов\*, О. А. Зейналов, М. А. Эльдаров, А. А. Шульга

Научный центр "Биоинженерия" Российской академии наук, Москва, 117312

Поступила в редакцию 31.08.2011 г.

Принята к печати 26.09.2011 г.

$\beta$ 2-адренергический рецептор человека относится к наиболее изученным представителям семейства рецепторов, сопряженных с G-белками. Этот рецептор играет важную роль в работе вегетативной нервной системы и служит мишенью для препаратов, используемых при заболеваниях сердца и легких. Определена кристаллическая структура  $\beta$ 2-адренорецептора, однако до сих пор не полностью понятны его физиологическая роль и молекулярные механизмы действия. В представленной работе получен вектор pVR2ADRH, содержащий ген, кодирующий  $\beta$ 2-адренорецептор человека с полигистидиновой меткой на C-конце. Этим вектором трансформировали клетки штамма GS115 метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris*. Выход  $\beta$ 2-адренорецептора человека в результате гетерологической экспрессии в клетках *P. pastoris* составил 20 мг/л культуры.  $\beta$ 2-адренорецептор выделили из мембранной фракции дрожжей и очистили при помощи металлохелатной аффинной и ионообменной хроматографии. Активный  $\beta$ 2-адренорецептор выделен с использованием хроматографии на альпренолол-сефарозе CL-4B. Конечный выход очищенного  $\beta$ 2-адренорецептора составил примерно 1 мг/л культуры. Гомогенность препарата  $\beta$ 2-адренорецептора подтверждена методом динамического светорассеяния мицеллярного раствора белка.

**Ключевые слова:**  $\beta$ 2-адренергический рецептор, рецепторы, сопряженные с G-белками, *Pichia pastoris*, иммунодотблоттинг.

**BIOSYNTHESIS AND PURIFICATION OF HUMAN  $\beta$ 2-ADRENERGIC RECEPTOR EXPRESSED IN METHYLOTROPHIC YEAST *Pichia pastoris*, by A. S. Gerasimov, O. A. Zeinalov, M. A. Eldarov, A. A. Shulga (Centre of Bioengineering, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312 Russia; \*e-mail: office@biengi.ac.ru). Human  $\beta$ 2-adrenergic receptor is one of the most studied G-protein-coupled receptors. It plays a key role in autonomic nervous system and is a drug target in cardiovascular and pulmonary diseases. Despite the fact that its crystal structure was revealed, a physiological role and molecular mechanisms of its action remain largely unknown. We designed the construct pVR2ADRH, which contained the gene for human  $\beta$ 2-adrenergic receptor with a polyhistidine tag C-terminal extension. The recombinant DNA was used for transformation of the GS115 strain of *Pichia pastoris*. The heterologous expression level obtained was about 20 mg/l. The receptor was extracted from membrane fraction and was purified by metal-affinity and ion-exchange chromatography. The active receptors were isolated by alprenolol-sepharose CL-4B. The resulting level of purified human  $\beta$ 2-adrenergic receptor was approximately 1 mg per liter of culture. The homogeneity of the protein sample was confirmed by a dynamical light scattering analysis of the receptor's micellar solution.**

**Keywords:**  $\beta$ 2-adrenergic receptor, GPCR, *Pichia pastoris*, immunodotblot.

$\beta$ 2-адренорецептор ( $\beta$ 2-АР) входит в обширное семейство рецепторов, сопряженных с G-белками (GPCR). Он характеризуется тканеспецифичным профилем экспрессии *in vivo* и представлен в основном на гладкомышечных клетках дыхательных путей, эпителиальных и эндотели-

альных клетках легочной ткани, лимфоидных (за исключением Th2-клеток) и тучных клетках [1].  $\beta$ 2-АР является важным регулятором сокращения и анаболизма мышечной ткани, метаболизма глюкозы и липидов, артериального давления и термогенеза, вследствие чего считается важным

Принятые сокращения: GPCR (G-protein coupled receptor) – рецептор, сопряженный с G-белками;  $\beta$ 2-АР –  $\beta$ 2-адренорецептор; DMSO – диметилсульфоксид; DDM – *n*-додецил- $\beta$ -D-мальтопиранозид; CHAPS – 3-[(3-холамидопропил)-диметиламмоний]-1-пропансульфонат; CHS – холестерилгемисукцинат; MC2R – рецептор 2 меланокортина; MXAX – металлохелатная аффинная хроматография.

\* Эл. почта: asgerasimoff@mail.ru

элементом симпатического отдела вегетативной нервной системы. За последнее время получены данные об участии  $\beta$ 2-АР в патогенезе эндокринных, нервно-мышечных и нейродегенеративных заболеваний [2, 3], что позволяет рассматривать  $\beta$ 2-АР в качестве перспективной фармакологической мишени.

$\beta$ 2-АР – наиболее известный представитель семейства GPCR. Хорошо изучено его взаимодействие как с природными лигандами (эпинефрин, норэпинефрин), так и с искусственными агонистами и антагонистами [4]. Методом сайт-направленного мутагенеза определены участки связывания лигандов, биофизическими методами выявлены конформационные изменения, возникающие при активации  $\beta$ 2-АР [5, 6]. Изучено взаимодействие  $\beta$ 2-АР с липидами цитоплазматической мембраны [7]. Недавно с разрешением 3.4 Å удалось определить кристаллическую структуру мутантного рекомбинантного  $\beta$ 2-АР [8] и его комплекса с G-белком [9]. Детально описана топология  $\alpha$ -спиральных трансмембранных сегментов, расположение активного центра, а также сайты взаимодействия с обратным агонистом рецептора – каразололом.

Однако физиологическая роль и молекулярные механизмы действия  $\beta$ 2-АР остаются не до конца понятными. По-видимому, это можно объяснить низким уровнем экспрессии гена  $\beta$ 2-АР в хозяйских клетках, а также гетерогенностью и нестабильностью его молекул вне липидного бислоя. Достаточные количества  $\beta$ 2-АР удается получить при использовании клеточной системы *Escherichia coli*, однако бактериальные клетки практически не способны синтезировать рецепторы с правильной структурой и осуществлять их процессинг, вследствие чего функциональная активность белка значительно уменьшается или отсутствует. Получение же  $\beta$ 2-АР путем гетерологичной экспрессии в линиях клеток млекопитающих и насекомых связано с большой трудоемкостью, длительностью и высокой стоимостью. Перспективной представляется система на основе клеток метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris*, в которых синтезируемые белки подвергаются разнообразным посттрансляционным модификациям, а строение цитоплазматической мембраны сходно со строением мембраны клеток млекопитающих. К тому же возможность масштабирования культивирования позволяет получать большие количества нужного белка.

В представленной работе создана эффективная система экспрессии гена  $\beta$ 2-АР человека в клетках *P. pastoris*. Получен штамм-продуцент этого мембранного белка, подобраны оптимальные условия культивирования клеток, разработан протокол очистки рекомбинантного  $\beta$ 2-АР человека.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали реактивы фирм “Bio-Rad”, “Sigma”, “Merck” (все США), “Panreac” (Испания), “Applichem” (Германия), компоненты сред для культивирования “Bacto Dickinson” и “Difco” (США). Растворы и среды готовили на деионизованной воде MilliQ.

Рекомбинантную плазмиду для экспрессии гена  $\beta$ 2-АР человека в клетках *E. coli* XL-1 Blue (“Stratagene”) конструировали стандартными методами [10]. Использовали ферменты производства “New England Biolabs” (США) и “Fermentas” (Литва). Олигонуклеотиды синтезированы фирмой “Евроген” (Россия). Плазмиды и фрагменты для клонирования очищали при помощи наборов “Qiagen” (США). Секвенирование проводили в ЦКП центра “Биоинженерия” РАН. Гомогенность препарата белка определяли методом динамического светорассеяния на аппарате DynaPro™ Titan TC (“Wyatt Technology Corp.”, США, рабочие характеристики: длина волны 828.4 нм, угол рассеивания 90°) с использованием 12 мкл кюветы при температуре 25°C. Данные обрабатывали при помощи программы DYNAMICS 6.7.7.9 (“Wyatt Technology Corp.”).

Конструирование экспрессионного вектора pVR2ADRH<sub>is</sub>. кДНК  $\beta$ 2-АР человека получали методом ПЦР-амплификации с использованием ген-специфичных праймеров и PfuI-полимеразы. Фрагмент, фланкированный сайтами рестрикции NdeI (5'-конец) и XhoI (3'-конец), содержал нуклеотидную последовательность полигистидиновой метки на 3'-конце. Условия ПЦР-амплификации: денатурация матрицы – 5 мин при 95°C; 25 циклов (денатурация – 95°C, 1 мин; отжиг праймеров – 55°C, 30 с; элонгация – 72°C, 3 мин); достройка – 72°C, 10 мин. Полученный фрагмент гидролизовали одновременно эндонуклеазами NdeI и XhoI, очищали с использованием электрофореза в 1%-м агарозном геле. Затем фрагмент клонировали в вектор pVR2 [11], предварительно гидролизованный соответствующими ферментами. Правильность нуклеотидной последовательности вставки в плаزمиде подтверждали секвенированием с использованием праймеров AOX1\_f (5'-GACTGGTTCCAATTGAC-3') и YCl\_r (5'-GCAGCGAGTCAGTGAG-3').

Трансформация клеток дрожжей и отбор трансформантов. Плазмидную ДНК (20 мкг) гидролизовали рестриктазой PmeI 1 (100 ед. акт., 3 ч) и очищали экстракцией смесью фенол-хлороформ (1 : 1). Линеаризованную ДНК осаждали этиловым спиртом и ацетатом натрия по стандартной процедуре и растворяли в воде до рабочей концентрации 2 мкг/мкл. Клетки дрожжей *P. pastoris* GS115 (“Invitrogen”) готовили для электропорации согласно [12]. К 40 мкл клеточной суспензии добавляли 5 мкл препарата ДНК. Трансформа-

цию проводили на электропораторе 2510 (“Eppendorf”, ФРГ) в кюветках с зазором 2 мм при рабочем напряжении 1500 В. Затем быстро добавляли 1 мл холодного раствора 1 М сорбита и ставили в термостат на 1 ч при температуре 30°C. После электропорации клетки высевали на чашки с плотной питательной средой YPDSagar (10 г/л дрожжевого экстракта, по 20 г/л глюкозы, пептона, агара, 162.2 г/л сорбита), содержащей зеонин (“Invitrogen”) в концентрации 100, 500, 1000, 1500 мкг/мл.

**Культивирование трансформантов.** Каждую из выбранных колоний трансформантов инокулировали в 30 мл среды VMGY (13.4 г/л азотной дрожжевой основы без аминокислот, 100 мл/л 1 М калий-фосфатного буфера, 20 г/л пептона, 10 г/л дрожжевого экстракта, 10 г/л глицерина, 400 мкг/л биотина). Клетки растили в течение 48 ч при температуре 30°C. Клеточную массу отделяли от культуральной жидкости низкоскоростным центрифугированием (1500 g, 5 мин, 20°C) и ресуспендировали в 10 мл индукционной среды BMMY (вместо глицерина добавляли 10 мл/л метанола). Клетки культивировали в течение 48 ч при температуре 30°C, добавляя каждые 12 ч по 0.1 мл метанола. Клеточную биомассу отбирали при помощи центрифугирования (5000 g, 5 мин, 4°C) и использовали для оценки уровня экспрессии гетерологического гена.

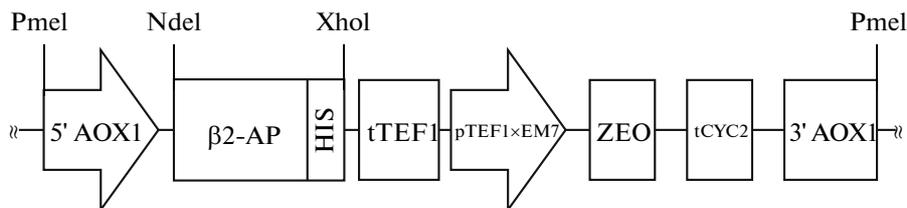
**Уровень экспрессии гена  $\beta$ 2-АР определяли при помощи иммунодотблоттинга** согласно [13]. Все процедуры проводили на льду. Биомассу, полученную из 4 мл культуры, суспендировали в буфере (50 мМ NaPi, pH 7.4, 100 мМ NaCl, 5% глицерин, 2 мМ EDTA, 1 мМ PMSF) в соотношении 1 : 2. Для разрушения клеток использовали стеклянные шарики (“Sigma”), объем которых был приблизительно равен объему биомассы. С этой целью клетки встряхивали со стеклянными шариками (10 циклов по 30 с, в промежутках выдерживали на льду в течение 1 мин). Клеточный дебрис отделяли путем центрифугирования (2000 g, 5 мин, 4°C), а мембранную фракцию осаждали при помощи высокоскоростного центрифугирования (100000 g, 45 мин, 4°C). Для длительного хранения фракцию замораживали при -70°C. В дальнейшем мембранную фракцию ресуспендировали в 500 мкл буфера “SB” (20 мМ Трис-HCl, pH 8.0, 1 мМ EDTA, 1% SDS, 0.2% CHAPS, 100 мМ NaCl, 1 мМ PMSF). Инкубацию продолжали в течение 10 мин при 37°C. Далее нерастворимый компонент отделяли центрифугированием (18000 g, 15 мин, 4°C), а 20 мкл супернатанта наносили на нитроцеллюлозную мембрану (“Bio-Rad”). Визуализацию проводили с помощью моноклональных антител к гистициновой метке (His-tag, “Novagen”) в разведении 1 : 1000 и вторичных антител, конъюгированных со щелочной фосфатазой (“Sigma”), в разведении 1 : 5000. Хромогенные субстраты BCIP-T и NBT (“Fermentas”) применяли согласно инструкции

фирмы-изготовителя. Результаты анализировали при помощи программы ImageJ. Отрицательным контролем служил экстракт мембранной фракции нетрансформированного штамма дрожжей. Для калибровки использовали содержащий гистициновую метку белок, разведенный в экстракте отрицательного контроля. Полученный  $\beta$ 2-АР идентифицировали при помощи вестерн-блоттинга. Образец белка после металлохелатной аффинной хроматографии (MXAX) разделяли электрофоретически в денатурирующих условиях по Лэммли [14] и переносили на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-C (“GE Healthcare”) по методу [15]. Мембраны окрашивали как описано выше для иммунодотблоттинга.

**Оптимизация условий культивирования.** Колониями штамма-продуцента  $\beta$ 2-АР инокулировали среду YPD (10 мл) и выращивали при 30°C до  $OD_{600} = 4-6$ . Затем клетки переносили в среду VMGY (150 мл) с разведением 1 : 100 и инкубировали в течение 48 ч при 30°C в колбах объемом 500 мл. Биомассу собирали центрифугированием при 1500 g в течение 5 мин и ресуспендировали в среде BMMY (100 мл), содержащей 10 мл/л метанола, 2.5% DMSO, 0.004% гистицина, 0.1 мМ неселективного  $\beta$ -блокатора – альпренолола. Клетки выращивали при 20°C в колбах объемом 500 мл в течение 30 ч, добавляя каждые 12 ч по 1 мл метанола.

**Солюбилизация мембранной фракции.** Препарат мембран, полученный из 1 л культуры, суспендировали в 50 мл буфера “S” (50 мМ Hepes-NaOH, pH 8.0, 500 мМ NaCl, 1% *n*-додецил- $\beta$ -D-мальтопиранозид (DDM), 0.6% 3-[(3-холамидопропил)диметиламмоний]-1-пропансульфонат (CHAPS), 0.12% холестерилгемисукцинат (CHS), 10% глицерина, 2 мМ  $\beta$ -меркаптоэтанол, 20 мМ имидазол, 0.1 мМ альпренолол, 1 мМ PMSF) и инкубировали при температуре 4°C и постоянном перемешивании в течение 2 ч. Растворимую фракцию отделяли от нерастворимой центрифугированием (100000 g, 25 мин, 4°C).

**Очистка  $\beta$ 2-адренорецептора.** На колонку “HisTrap HP” (“GE Healthcare”) объемом 10 мл, предварительно уравновешенную буфером “S”, со скоростью 1 мл/мин наносили экстракт мембран. Затем промывали 30 мл буфера “A” (50 мМ Hepes-NaOH, pH 8.0, 500 мМ NaCl, 0.5% DDM, 0.3% CHAPS, 0.06% CHS, 20 мМ имидазола) и 50 мл буфера “B” (50 мМ Hepes-NaOH, pH 8.0, 500 мМ NaCl, 0.1% DDM, 0.06% CHAPS, 0.012% CHS, 50 мМ имидазола). Элюцию проводили буфером “C” (100 мМ Hepes-NaOH, pH 7.2, 20 мМ NaCl, 0.1% DDM, 500 мМ имидазола) и 50 мМ EDTA. Препарат  $\beta$ 2-АР далее наносили на 5 мл керамического гидроксипатита типа II (“Bio-Rad”), предварительно уравновешенного буфером “D” (5 мМ NaPi, pH 7.2, 20 мМ NaCl, 0.1% DDM). Отмывали линейным градиентом NaCl



**Рис. 1.** Схематическое изображение вектора pVR2ADRHIS, линейаризованного по сайту PmeI. Рекombинантный ген  $\beta$ 2-AP с 3'-концевой нуклеотидной последовательностью, кодирующей полигистидиновую метку, находится под контролем индуцибельного промотора AOX1 и терминатора tTEF1. Конструкция содержит также экспрессионную кассету ZEO, которая включает в себя ген, определяющий устойчивость трансформантов к зеоцину под контролем гибридного промотора pTEF1xEM7 и терминатора tCYC2. Изображены сайты рестрикции NdeI и XhoI, по которым проводили клонирование гена рецептора.

(до 1 М) в том же буфере. Элюировали буфером “Е” (500 мМ NaPi, pH 7.2, 20 мМ NaCl, 0.1% DDM).

**Приготовление аффинного сорбента “альпренолол-сефароза CL-4В”.** Альпренолол присоединяли к частицам сефарозы через 1,4-бутандиолдиглицидилэфирный “мостик” согласно [16].

**Аффинная хроматография.** С помощью колонок “PD10” (“GE Healthcare”) белковый препарат переводили в буфер “F” (10 мМ Трис-HCl, pH 7.2, 100 мМ NaCl, 0.1% DDM) и инкубировали в течение ночи с 10 мл альпренолол-сефарозы CL-4В (предварительно уравновешенной тем же раствором) при температуре 4°C и постоянном перемешивании. Неспецифически связанные белковые компоненты удаляли, промывая сорбент 10 мл буфера “F”, затем 20 мл “F” с 500 мМ NaCl и снова 30 мл буфера “F” при температуре 4°C. Элюировали 3 раза буфером “F” с добавлением 1 мМ альпренолола в течение 3 ч при комнатной температуре.

**Твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА).** На 96-луночные планшеты сорбировали мембранную фракцию, содержащую рекombинантный  $\beta$ 2-AP, в концентрации 4 мкл/лунку или фракцию МХАХ (10 мкг рецептора на лунку) и инкубировали в течение 12 ч при 4°C. В качестве отрицательного контроля использовали мембранную фракцию с гетерологичным рецептором 2 меланокортина человека (МС2R). Неспецифическое связывание блокировали 2%-м раствором BSA (“Sigma”) в PBS/Твин-20 (по 200 мкл/лунку) и инкубировали в течение 60 мин при 37°C. Затем вносили сыворотки, содержащие антитела против  $\beta$ 2-AP (получены от В.Б. Ланцовой, НИЦ Неврологии РАМН), в разведении 1 : 100. В некоторые лунки одновременно добавляли селективные  $\beta$ 2-адреномиметики — кленбутерол (“Sigma”) и сальбутамол (“Sigma”);  $\beta$ -адреноблокатор — альпренолол; ампициллина натриевую соль (“Gerbu Biotechnic”) — в качестве отрицательного контроля. Интенсивность взаимодействия определяли хромогенной реакцией при помощи планшетного

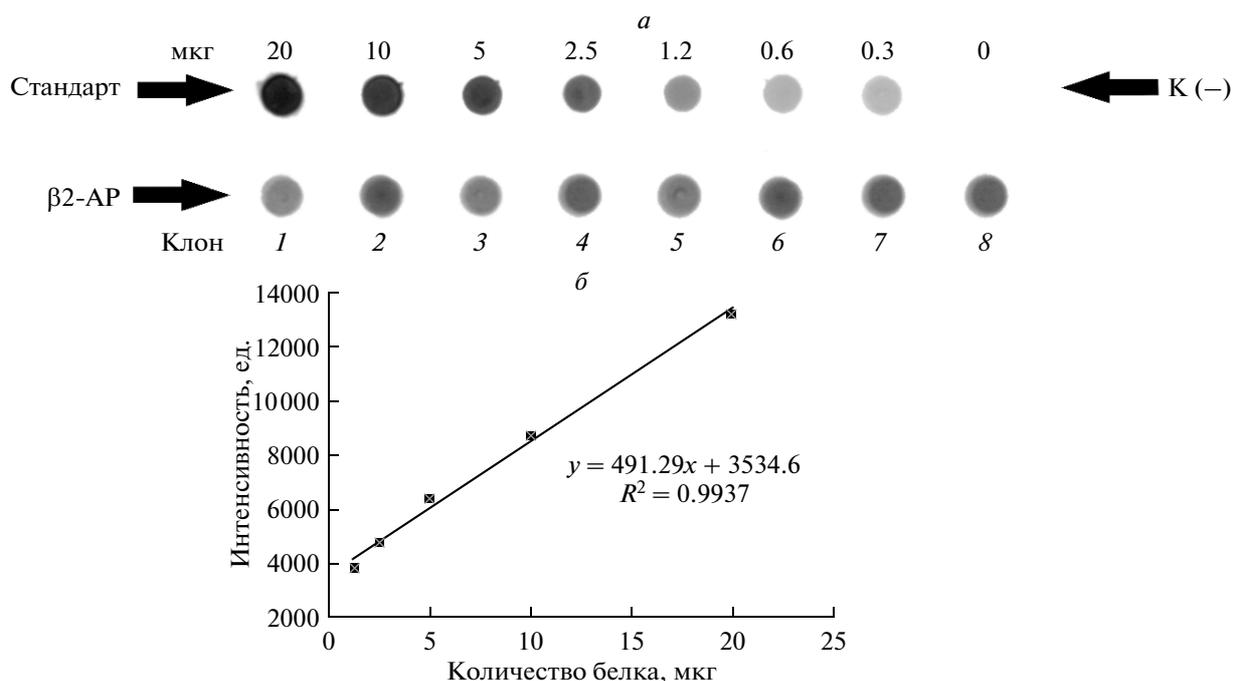
ридера и длине волны 450 нм с использованием конъюгата пероксидазы хрена с антителами против Fc-фрагмента IgG человека (“Sigma”), которые вносили по 100 мкл в лунку при разведении 1 : 10000 и инкубировали в течение 60 мин при 37°C.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для получения рекombинантного рецептора сконструировали вектор pVR2ADRHIS (рис. 1), содержащий ген  $\beta$ 2-AP под контролем сильного индуцибельного промотора AOX1 и терминатора TEF1. На 3'-конце ген содержал последовательность, кодирующую His-tag. В вектор вводили также экспрессионную кассету Zeo, которая обеспечивает устойчивость клеток к зеоцину, что позволяло проводить отбор и селекцию трансформантов. С использованием электропорации и рекомбинации по гомологичному 5'-участку промотора AOX1 получили колонии трансформантов. Присутствие нужных вставок в клонах определяли с помощью ПЦР-скрининга с использованием праймеров на промотор и ген  $\beta$ 2-AP. Клоны с такими вставками отбирали для дальнейшей работы.

Методом иммунодотблотинга показано, что  $\beta$ 2-AP эффективно синтезируется в клетках метилотрофных дрожжей. Максимальную продукцию обеспечивали трансформанты, выросшие на плотной питательной среде с высокой концентрацией селективного агента, что, по-видимому, свидетельствует об увеличении числа копий экспрессионной кассеты в геноме дрожжей. С целью получения штамма-продуцента провели иммунодотблотинг восьми клонов, выросших на плотной питательной среде с максимальным количеством селективного агента (рис. 2а, б). Наибольшую продукцию рецептора обеспечивал клон № 2 (в дальнейшем штамм-продуцент).

Подбор условий культивирования штамма-продуцента необходим для повышения общего уровня экспрессии рецептора и доли функционально активных молекул  $\beta$ 2-AP. Снижение тем-



**Рис. 2.** *a* – Результаты иммуноблоттинга мембранных экстрактов. Стандарт – образец белка известной концентрации с С-концевой полигистидиновой меткой. Сверху указано количество белка для построения калибровочной прямой. К (–) – образец мембранного экстракта *P. pastoris* штамма GS115. Ниже приведены номера трансформантов. *б* – Калибровочная прямая для определения уровня экспрессии гена  $\beta 2$ -АР. Данные получены путем оценки интенсивности окраски пятен на нитроцеллюлозной мембране при помощи программы ImageJ.

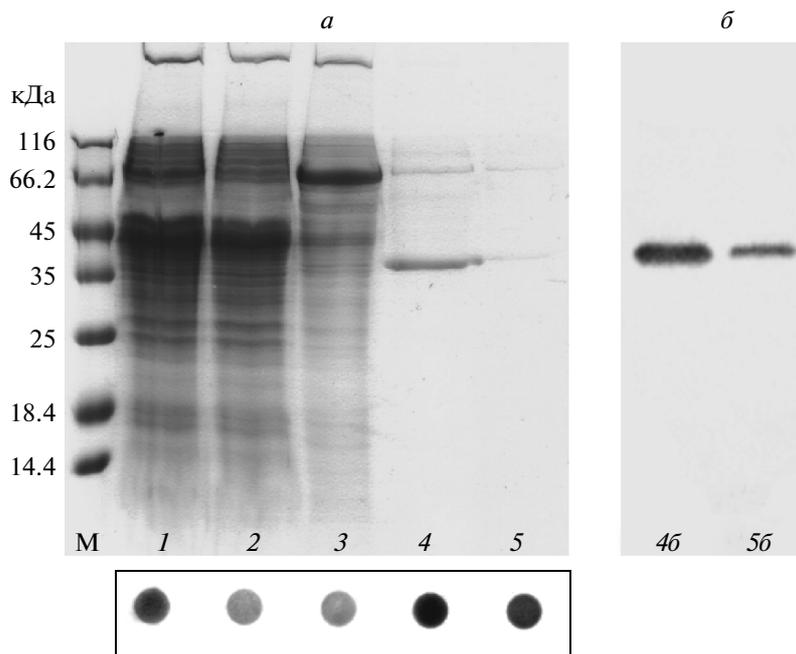
пературы выращивания до 20°C, а также введение в состав среды гистидина, DMSO и альпренолола позволило увеличить выход гетерологичного  $\beta 2$ -АР до 20 мг/л культуры и более.

Из мембраны дрожжей рецептор выделяли при помощи солюбилизации мембранной фракции буфером, содержащим 1% DDM, 0.6% CHAPS, 0.12% CHS. По данным иммуноблоттинга солюбилизованной и несолубилизованной фракций эффективность экстракции гетерологичного  $\beta 2$ -АР составила 90% (данные не представлены). Использование МХАХ на первом этапе очистки позволяет получить препарат  $\beta 2$ -АР человека с чистотой примерно 80% (рис. 3). Результаты вестерн-блоттинга подтверждают аномальную подвижность  $\beta 2$ -АР, наблюдаемую при электрофоретическом разделении.

В результате аффинной хроматографии на альпренолол-сефарозе CL-4В получен препарат чистого, функционально активного  $\beta 2$ -АР человека с конечным выходом примерно 1 мг/л клеточной культуры (рис. 4). Методом динамического светорассеяния (ИБХ РАН) показано, что в мицеллярных структурах  $\beta 2$ -АР представлен преимущественно мономерными формами (средний радиус  $20.3 \pm 4$  нм).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Клеточные механизмы рецепции и передачи сигнала, а также структурные особенности рецепторов входят в число ключевых проблем молекулярной биологии и молекулярной медицины. К рецепторам, вызывающим значительный интерес, относится и  $\beta 2$ -АР – трансмембранный интегральный полипептид, принадлежащий к родосинопоподобным рецепторам семейства GPCR. Однако для изучения этого белка необходимы методы, позволяющие получать его в достаточно больших количествах. Выделение из природных источников (клетки крови, животные ткани) оказалось нецелесообразным, поскольку из нескольких граммов мембранной фракции эритроцитов можно получить лишь несколько микрограммов  $\beta 2$ -АР [17]. Использование стабильных клеточных линий млекопитающих, продуцирующих рекомбинантный рецептор, также считается неэффективным вследствие низкого уровня синтеза  $\beta 2$ -АР и сложности культивирования клеток [18]. Показано, что из 1 л культуры клеток *E. coli* можно получить около 20 мг очищенного  $\beta 2$ -АР [19]. Однако функциональную активность молекул гетерологичного рецептора в этой работе не определяли. Для рентгеноструктурного анализа  $\beta 2$ -АР использован белок, продуцируемый в клетках *Spodoptera frugiperda* (*Sf9*), трансформированных бакуловирусом. Выход очищенного  $\beta 2$ -АР соста-



**Рис. 3.** Результаты МХАХ, анализируемые при помощи денатурирующего электрофореза в 10%-м ПААГ (а), иммунодотблотинга (внизу) и вестерн-блотинга (б). М – маркер молекулярных масс (значения приведены слева); 1 – солибилизированная фракция; 2 – фракция после нанесения на Ni-сефарозу НР; 3 – отмывка сорбента 50 мМ имидазолом; 4 – элюция 500 мМ имидазолом; 5 – элюция 50 мМ EDTA; 4б и 5б – те же фракции, что и на дорожках 4 и 5.



**Рис. 4.** Результаты иммунодотблотинга фракций, полученных после аффинной хроматографии. 1 – препарат  $\beta$ 2-АР после очистки на гидроксипатите и обессоливания на PD10 (20 мкл); 2 – фракция после нанесения на альпренолол-сефарозу CL-4В (20 мкл); 3 – отмывка буфером “F” и буфером с 0.5 М NaCl (по 100 мкл); 4 – трехкратная элюция  $\beta$ 2-АР 1 мМ альпренолола (образцы по 100 мкл).

вил 0.25 мг/л [20].  $\beta$ 2-АР экспрессировали и в клетках дрожжей, в том числе метилотрофных дрожжей *P. pastoris*, где уровень синтеза  $\beta$ 2-АР человека превышал 4 мг/л [21, 22]. Следует отметить, что в этих работах использовали конструкции, в которых рекомбинантный ген содержал последовательность, кодирующую сигнальный пептид  $\alpha$ -фактора *S. cerevisiae*. Синтезируемые в этой системе молекулы рецептора подвергались гликозилированию, что увеличило их гетерогенность и количество стадий очистки. Мы не использовали последовательность сигнального фактора, и поэтому смогли избежать подобных проблем и снизить потери  $\beta$ 2-АР.

При получении рекомбинантного белка в клетках метилотрофных дрожжей основную сложность представляет скрининг большого количества колоний трансформантов, необходимый для обнаружения клона, обеспечивающего максимальный уровень синтеза требуемого белка

(штамма-производителя) [23]. Оценка уровня экспрессии гена  $\beta$ 2-АР, как и генов других белков семейства GPCR, методом иммуноблотинга – общепринятый и наиболее эффективный подход, поскольку мембранные белки обычно обладают аномальной электрофоретической подвижностью, и соответствующие им полосы на геле сильно размыты и недостаточно информативны. В ходе работы было установлено, что максимальная продукция целевого белка, локализованного в цитоплазматической мембране, достигалась через 25–30 ч после индукции и составляла 7 мг/л [24]. При более длительном культивировании количество гетерологичного  $\beta$ 2-АР в экстракте мембран существенно снижалось. Эти результаты подтверждают высокую токсичность мембранных белков, которая приводит к изменению биофизических свойств и деструкции клеточной мембраны. Негативные эффекты объясняются не только высоким уровнем экспрессии и природой

гетерологичных рецепторов, но также их агрегацией и неправильным сворачиванием (фолдингом) [25]. Возможность оптимизации параметров культивирования позволяет снизить отрицательное влияние на клетку. Известно, что понижение температуры культивирования до 20°C во время индукции положительно влияет на фолдинг вследствие вовлечения в этот процесс белков теплового шока [26]. Использование гистидина в составе индукционной питательной среды также оказывает положительный эффект. Хотя этот механизм недостаточно понятен, считается, что гистидин обладает антиоксидантными свойствами [27]. При культивировании клеток *P. pastoris* в питательную среду часто добавляют DMSO [28, 29]. Этот универсальный растворитель способствует повышению проницаемости и вязкости цитоплазматической мембраны, что приводит к увеличению доли функционально активного  $\beta 2$ -АР [30]. Активность  $\beta 2$ -АР возрастает также при добавлении в питательную среду альпренолола. Использование оптимизации позволило увеличить выход гетерологичного мембранного  $\beta 2$ -АР более чем в 3 раза.

Возможность получения чистого, активного, рекомбинантного трансмембранного белка в количествах, необходимых для структурных исследований, во многом зависит от его растворимости. Известно, что гидрофобные  $\alpha$ -спиральные сегменты GPCR способны к белок-липидным взаимодействиям, необходимым для стабилизации в мембране и успешного функционирования [31]. Поэтому желательно использовать мягкие детергенты, а в ряде случаев и несколько детергентов, в сочетании с фосфолипидами. Широко применяется экстракция гетерологичного  $\beta 2$ -АР 1%-м дигитонином [32], либо смесью, содержащей 1% DDM, 0.6% CHAPS, 0.12% CHS [33]. Как следует из результатов дот-блотинга солюбилизированной и нерастворимой частей мембранной фракции, оба способа позволяют экстрагировать более 90% молекул рецептора в течение 2 ч. Однако вследствие плохой растворимости дигитонина и его неприменимости в структурных исследованиях солюбилизацию проводили смесью DDM, CHAPS и CHS. Следует отметить, что использование производных холестерина (CHS, дигитонин) повышает термостабильность и устойчивость рецептора в мицеллах детергента, что обусловлено присутствием холестерин-связывающего мотива [6, 34]. С другой стороны, эффективность экстракции зависит от количества мембранной фракции и объема солюбилизирующего буфера ("S"). В данном случае оптимально использовать 5–10 мг/мл.

На первом этапе очистки наибольший эффект обеспечивает метод МХАХ. Зачастую, в ходе одной стадии МХАХ удается получить препарат ре-

цептора с чистотой более 95% [35]. Используемая нами конструкция предполагает присутствие полигистидиновой метки на С-конце. К тому же структура самого  $\beta 2$ -АР указывает на наличие сайта связывания с катионами двухвалентных металлов [36]. Таким образом, на первом этапе очистки мы получили препарат  $\beta 2$ -АР с чистотой 80%. Как следует из результатов дот-блотинга фракций, целевой белок не полностью связывается с сорбентом и частично удаляется в процессе отмывки. При дальнейшей очистке на керамическом гидроксипатите "СНТ II" получен препарат  $\beta 2$ -АР с чистотой более 95%, гомогенность которого подтверждена результатами динамического светорассеяния. К тому же этот метод позволяет оценить однородность состава мицелл и качество солюбилизации. Средний радиус молекулы рецептора в мицелле равен  $20.3 \pm 4.0$  нм, тогда как средний радиус мицеллы детергента –  $5.9 \pm 0.7$  нм, что коррелирует с данными о размерах мицелл поверхностно-активных веществ. Эти результаты говорят о возможности использования полученного нами препарата в дальнейших структурных исследованиях, таких как рентгеноструктурный анализ и ЯМР-спектроскопия. Эффективность метода динамического светорассеяния для оценки агрегации и денатурации белковых молекул подтверждена в работах по синтезу и очистке других мембранных полипептидов [37].

Активную и неактивную формы молекул рецептора разделяли при помощи аффинной хроматографии на альпренолол-сефарозе CL-4В [13, 38]. Путем подбора соотношения объема аффинной сефарозы и количества  $\beta 2$ -АР было установлено значение рабочей емкости, равное 0.3 мг/мл. Активный рецептор элюировали 3 раза в течение 3 ч. Более продолжительная инкубация нежелательна вследствие термолабильности  $\beta 2$ -АР. Потери рецептора в ходе аффинной хроматографии составляют примерно 20%.

Методом твердофазного ИФА изучено взаимодействие  $\beta 2$ -АР с аутоантителами. Полученные результаты приведены в таблице.

Активность  $\beta 2$ -АР в хозяйском липидном окружении и в мицеллах детергента охарактеризована по степени его взаимодействия с антителами в присутствии и в отсутствие неселективного  $\beta$ -блокатора – альпренолола, селективных  $\beta 2$ -адреномиметиков сальбутамола и кленбутерола. Отрицательным контролем служила мембранная фракция с гетерологичным MC2R человека (контроль взаимодействия) и ампициллин – лекарственное средство, не обладающее адренергической активностью. Очевидно, что в цитоплазматической мембране клеток дрожжей и во фракции после очистки методом МХАХ  $\beta 2$ -АР находится в функционально активном состоянии, поскольку аутоантитела к рецепторам реаги-

Взаимодействие рекомбинантного  $\beta$ 2-АР с аутоантителами сывороток крови

Реакция	Мембранная фракция с $\beta$ 2-АР, опт. ед.	Препарат $\beta$ 2-АР после МХАХ, опт. ед.	Мембранная фракция с рецептором-2 меланокортина, 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

руют с пространственными эпитопами, включающими участки N-концевой последовательности, внеклеточных петель и наружных остатков  $\alpha$ -спиральных сегментов. В пользу этого говорит и изменение характера взаимодействия при добавлении альпренолола, сальбутамола и кленбутерола. Интересно, что адrenomиметики и адреноблокатор противоположным образом влияют на связывание с аутоантителами, что особенно заметно при использовании  $\beta$ 2-АР, входящего в состав мицелл детергента, и согласуется с представлениями о природе и механизмах взаимодействия  $\beta$ 2-АР с лигандами. В ходе работы обнаружено незначительное отличие в действии агонистов, что также можно объяснить их терапевтическими эффектами.

Таким образом, нами разработан эффективный метод получения  $\beta$ 2-АР и определены оптимальные условия культивирования штамма-продуцента. Разработан простой метод определения активности  $\beta$ 2-АР и протокол его очистки. Мы полагаем, что использованный подход позволит получать очищенный  $\beta$ 2-АР человека в количествах, необходимых для структурных и биологических исследований.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

- Lefkowitz R.J. 2000. The superfamily of heptahelical receptors. *Nat. Cell. Biol.* **2**, 133–136.
- Xu B.Y., Huang D. 2000. Beta2-adrenergic receptor gene polymorphisms in myasthenia gravis. *Clin. Exp. Immunol.* **119**, 156–160.
- Tathiah A., de Strooper B. 2011. The role of G protein coupled receptors in the pathology of Alzheimer’s disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **12**, 73–87.
- Reiner S., Ambrosio M. 2010. Differential signaling of the endogenous agonists at the beta2-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* **285**, 36188–36198.
- Strader C.D., Candelore M.R. 1989. Identification of two serine residues involved in agonist activation of the

$\beta$ 2-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* **264**, 13572–13578.

- Ghanouni P. 2001. Functionally different agonists induce distinct conformations in the G protein coupling domain of the b2-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* **276**, 24433–24436.
- Hanson M.A., Cherezov V. 2008. A specific cholesterol binding site is established by the 2.8 Å structure of the human beta2-adrenergic receptor. *Structure.* **16**, 897–905.
- Rasmussen S.G., Choi H.G. 2007. Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature.* **450**, 383–387.
- Rasmussen S.G., Devree B.T. 2011. Crystal structure of the  $\beta$ (2) adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature.* (Epub ahead of print)
- Sambrook J., Russell D.W. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press.
- Редо В.А., Новикова Е.К. 2011. Экспрессия модифицированной оксидазы D-аминокислот *Trigonopsis variabilis* в метилотрофных дрожжах *Pichia pastoris*. *Прикл. биохим. микробиол.* **47**, 39–45.
- Cregg J.M., Higgins D.R. 1995. Production of foreign proteins in the yeast *Pichia pastoris*. *Canadian J. Botany Suppl.* **73**, 5981–5987.
- Zeder-Lutz G., Cherouati N. 2006. Dot-blot immunodetection as a versatile and high-throughput assay to evaluate recombinant GPCRs produced in the yeast *Pichia pastoris*. *Protein Exp. Purif.* **50**, 118–127.
- Laemmli U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**, 680–685.
- Towbin H., Strahelin T., Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**, 4350–4354.
- Tedesco J.L., Pearsall K.M. 1988. Affinity purification of the mammalian b2-adrenergic receptor. *J. Biochem. Biophys. Meth.* **17**, 215–228.
- Caron M.G., Lefkowitz R.J. 1976. Solubilization and characterization of the b2-adrenergic receptor binding

- sites of frog erythrocytes. *J. Biol. Chem.* **251**, 2374–2384.
18. Chelikani P., Reeves R.J. 2006. The synthesis and high-level expression of a beta2-adrenergic receptor gene in a tetracycline-inducible stable mammalian cell line. *Protein Sci.* **15**, 1433–1440.
  19. Петровская Л.Е., Шульга А.А. 2010. Экспрессия G-белок сопряженных рецепторов в *Escherichia coli* для структурных исследований. *Биохимия.* **75**, 881–891.
  20. Kobilka B.K. 1995. Amino and carboxyl terminal modifications to facilitate the production and purification of a G protein coupled receptor. *Anal. Biochem.* **231**, 269–271.
  21. Noguchi S., Satow Y. 2006. Purification of human beta2-adrenergic receptor expressed in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J. Biochem.* **140**, 799–804.
  22. Talmont F. 2009. Monitoring the human beta1, beta2, beta3 adrenergic receptors expression and purification in *Pichia pastoris* using the fluorescence properties of the enhanced green fluorescent protein. *Biotechnol. Lett.* **31**, 49–55.
  23. Asada H., Uemura T. 2011. Evaluation of the *Pichia pastoris* expression system for the production of GPCRs for structural analysis. *Microb. Cell. Fact.* **10**, 124–134.
  24. Герасимов А.С., Шульга А.А. 2011. Синтез гетерологичных рецепторов, связанных с G-белком, в клетках метилотрофных дрожжей *P. pastoris*. *Докл. Акад. Наук.* **441**, 1–4.
  25. Mattanovich D., Gasser B. 2004. Stress in recombinant protein producing yeasts. *Biotechnol.* **113**, 121–135.
  26. Dragosits M., Stadlmann J. 2009. The effect of temperature on the proteome of recombinant *Pichia pastoris*. *J. Proteome Res.* **8**, 1380–1392.
  27. Murakami K., Onoda Y. 1997. Protection by histidine against oxidative inactivation of AMP deaminase in yeast. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **42**, 1063–1069.
  28. Murata Y., Watanabe T. 2003. Dimethyl sulfoxide exposure facilitates phospholipids biosynthesis and cellular membrane proliferation in yeast cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 33185–33193.
  29. Salunkhe S., Soorapaneni S. 2010. Strategies to maximize expression of rightly processed human interferon alpha2b in *Pichia pastoris*. *Protein Exp. Purif.* **71**, 139–146.
  30. Andre N., Cherouati N. 2006. Enhancing functional production of G protein-coupled receptors in *Pichia pastoris* to levels required for structural studies via a single expression screen. *Protein Sci.* **15**, 1115–1126.
  31. Jastrzebska B., Debinski A. 2011. Role of membrane integrity on G protein-coupled receptors: Rhodopsin stability and function. *Progr. Lipid Res.* **50**, 267–277.
  32. Reilander H., Boege F. 1991. Purification and functional characterization of the human beta 2-adrenergic receptor produced in baculovirus-infected insect cells. *FEBS Lett.* **282**, 441–444.
  33. Yao Z., Kobilka B.K. 2005. Using synthetic lipids to stabilize purified beta2 adrenoceptor in detergent micelles. *Anal. Biochem.* **343**, 344–346.
  34. Jafurulla M., Tiwari S. 2011. Identification of cholesterol recognition amino acid consensus (CRAC) motif in G-protein coupled receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **404**, 569–573.
  35. Blount P., Sukharev S.I. 1996. Membrane topology and multimeric structure of a mechanosensitive channel protein of *Escherichia coli*. *EMBO J.* **15**, 4798–4805.
  36. Swaminath G., Lee T.W. 2003. Identification of an allosteric binding site for Zn<sup>2+</sup> on the beta2-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* **278**, 35222–35226.
  37. Гончарук С.А., Шульга А.А. 2009. Бактериальный синтез, очистка и солюбилизация мембранного белка KCNE3 – регулятора потенциалзависимых калиевых каналов. *Биохимия.* **74**, 1650–1656.
  38. Caron M.G., Srinivasan Y., Pitha J., Kociolek K., Lefkowitz R.J. 1979. Affinity chromatography of the beta-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* **254**, 29233–29237.