УДК 577.112.083

Суперпродукция, выделение и очистка функционально активного бактериоферритина Dps *E.coli*

Покусаева В.О., Антипов С.С.

Воронежский государственный университет», Воронеж

Швырева У.С., Тутукина М.Н.

ФГБУН «Институт биофизики клетки Российской академии наук», Пущино

Озолинь О.Н.

ФГБОУ ВПО «Пущинский государственный естественно-научный институт», Пущино

Поступила в редакцию 21.05.2012 г.

Аннотация

Разработан метод выделения и очистки рекомбинантного белка Dps Escherichia coli. Метод включает клонирование гена dps в вектор pGEM, последующую суперпродукцию белка в штамме BL21*(DE3) E. coli, ионообменную хроматографию на ДЕАЕ-Сефадексе-А25, фракционирование белков сульфатом аммония и гель-фильтрацию на Сефадексе-G200. Разработанный метод позволяет получить электрофоретически гомогенный и функционально активный белок Dps.

Ключевые слова: Escherichia coli, бактериоферритин Dps, ДНК, хроматография

A method for isolation and purification of the recombinant Dps protein from Escherichia coli was suggested. The procedure involves cloning of the dps gene into the pGEM vector, followed by the induction of the recombinant gene expression within BL21*(DE3) E. coli cells, ion-exchange chromatography on DEAE-Sephadex-A25 (medium), protein fractionation with ammonium sulfate and gel filtration on Sephadex-G200. The developed method allows to obtain electrophoretically homogeneous and functionally active Dps protein.

Keywords: Escherichia coli, bakterioferritin Dps, DNA, chromatography

Введение

Ферритины представляют собой олигомерные белки, состоящие, как правило, из 24 идентичных или сходных субъединиц молекулярной массой ~19кДа, формирующих полость внутри белковой глобулы. В этой полости происходит накопление ионов железа в виде нетоксичных для клетки ферригидритов (5 Fe_2O_3 • 9 H_2O), формирующих минеральное ядро. Внешний диаметр молекулы белка составляет 12-13нм, в то время как диаметр внутренней полости, содержащей до

4500 ионов железа, не превышает 8нм. Ферритины играют исключительно важную роль в поддержании внутриклеточного гомеостаза ионов железа и широко распространены среди живых организмов [1].

Для *E.coli* известно три белка, относящихся к семейству ферритинов: FtnA, Bfr и Dps. Белки FtnA и Bfr структурно сходны с гомологичными белками высших организмов, в то время как бактериоферритин Dps имеет ряд существенных отличий. Белок Dps состоит из 12 идентичных субъединиц [2, 3] с молекулярной массой 18,712 kDa [4]. Каталитические центры каждой из субъединиц окисляют 2 иона Fe^{2+} до Fe^{3+} с использованием одной молекулы H_2O_2, снижая тем самым продукцию токсичных активных форм кислорода в клетке. После окисления железо проникает во внутреннюю полость белка, формируя его ферригидритное ядро, содержащее до 500 атомов железа [2].

Бактериоферритин Dps *E.coli* обладает рядом уникальных характеристик, а именно имеет меньший размер по сравнению с другими ферритинами, большее сродство к железу и способность образовывать прочные комплексы с ДНК. Так как минеральное ядро ферритинов обладает собственным магнитным моментом, их можно рассматривать как естественные биосенсоры электромагнитного излучения, но только Dps способен трансформировать полученный сигнал на ДНК [5, 6]. Известно, что содержание Dps изменяется в зависимости от фазы роста бактерии. Во время экспоненциального роста в клетках находится около 6000 молекул Dps, а к концу стационарной фазы примерно 180 000 [7]. Принято считать, что практически все они ассоциированы с геномом. Это высокое сродство к ДНК в перспективе позволяет иммобилизовать Dps на формообразующих ДНК-матрицах, т.е. в режиме самосборки создавать в пространстве любое заранее заданное распределение ферромагнитных частиц фиксированного состава и размера. Для получения таких нуклеопротеидных комплексов большую роль играет степень очистки используемого для этих целей белка.

В связи с этим, возникла задача разработки методики получения функционально активного белкового препарата Dps *E.coli* в количествах, достаточных для детального изучения его уникальных особенностей.

Эксперимент

Для получения экспрессионного вектора была использована плазмида pGEM®-T Easy (Promega, USA), в которую был вставлен индуцируемый изопропил-*β-D*-1-тиогалактопиранозидом (IPTG) промотор РНК-полимеразы фага T7. Нативный ген Dps *E.coli* MG1655 был поставлен под контроль этого промотора, после чего полноразмерная копия гена, начиная с позиции – 26 от инициирующего кодона ATG до позиции + 1 за стоп-кодоном TAA (т.е. с сохранением собственного сайта связывания рибосомы), была амплифицирована с помощью праймеров: 5’-TAATTTCTAGAACATAACATCAAGAGG-3’ и 5’- AGCTCTAGATTTATTCGATGTTAG-3’. После рестрикции ампликона и вектора эндонуклеазой XbaI по сайтам TCTAGA ген был лигирован в плазмиду (использована лигаза фага T4 фирмы Fermentas). Нуклеотидная последовательность полученной конструкции была проверена прямым секвенированием и не содержала мутаций.

Для получения рекомбинантного белка Dps использовали клетки BL21* (DE3), трансформированные полученной плазмидой pGEM-dps. Клетки выращивали на средах LB Plates и LB Medium (pH 7,4) при температуре 37ºC в присутствии

ампициллина (100мкг/мл). Индукцию белка проводили при OD_{600} 0,4-0,6 добавлением в клеточную культуру 0,02mM IPTG, после чего клетки продолжали расти 12 часов при 37ºС. Клетки осаждали центрифугированием при 10 000g, отмывали два раза от среды холодным 0,01М трис-HCl буфером, pH 8,0 и хранили при -4ºС. Уровень индукции рекомбинантного белка Dps оценивали с помощью электрофореза в 12,5% денатурирующем ПААГ по модифицированному методу Дэвиса [8].

Для выделения и очистки белка биомассу размораживали на ледяной бане, добавляя 3 мл охлажденного буфера для лизиса, содержащего 50мМ Tris-HCl (pH 8,0); 1мМ ЭДТА; 0,1М NaCl. Клеточную массу разрушали, добавляя лизоцим ($4x10^{-3}$мг/мл), PMSF (4мкМ) и диоксохлорэтанол натрия (0,0016%) с дальнейшей инкубацией на ледяной бане в течение 20мин. Далее суспензию клеток подвергали воздействию ультразвука на ультразвуковом дезинтеграторе УРСК-7Н-18 в течение 1 минуты. Клеточный дебрис удаляли центрифугированием при 13000g в течение 10мин.

Полученный лизат наносили на ионообменную колонку ДЕАЕ-Сефадекс-А25 (medium) (Sigma-Aldrich, USA), предварительно уравновешенную элюирующим буфером, содержащим 50 mM NaCl; 10mM Tris-HCl (pH 8,0); 10^{-4}М ЭДТА; 10^{-4}ДТТ и разделяли на хроматографической системе LKB. Для очистки белка использовали градиент концентраций NaCl (от 50 до 700 mM). Скорость элюции составляла 20мл/ч. Собирали фракции объемом 2,0 мл, присутствие белка в них определяли с помощью электрофореза в 12,5% денатурирующем ПААГ [8]. Такое фракционирование позволяет удалить абсолютное большинство примесных белков (Рис. 1А, дорожка «б»), но в полученном препарате присутствует много ассоциированной с Dps ДНК. Поэтому перед гель-фильтрацией фракции, содержащие целевой белок и минимальное количество примесей, объединяли и подвергали высаливанию сульфатом аммония (конечная концентрация 90%) в течение 30мин при 0ºС. Преципитат осаждали центрифугированием в течение 10мин при 13000g и растворяли в буфере, содержащем 500 mM NaCl, 50mM Tris-HCl (pH 8,0); 10^{-4}М ЭДТА. Полученный раствор белка подвергали гель - фильтрации на Сефадексе-G200 (Pharmacia, Sweden). Элюцию белковой фракции осуществляли буфером, содержащим 500 mM NaCl, 50mM Tris-HCl (pH 8,0); 10^{-4}М ЭДТА, со скоростью 20мл/ч. Полученный на этой стадии белок был свободен от ДНК и практически гомогенен (Рис. 1А, дорожка «в»).

Для хранения белок концентрировали на колонках Vivaspin 20 (Sartorius, Германия) с порами, пропускающими белки массой менее 10кДа. Для этого колонки центрифугировали при 13000g в течение 4мин. Затем полученный препарат диализовали против буфера, содержащего 50 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8,0); 10^{-4}М ЭДТА. На этой стадии чистота препарата составляла более 95% (Рис. 1А, дорожка «г»). Концентрацию очищенного белка определяли с помощью спектрофотометра Nanodrop ND-1000 (ND Technologies, USA).

Сохранение функциональной активности белка оценивали по способности Dps связываться с ДНК. Так как большинство регуляторных белков имеют эффективные сайты связывания вблизи собственных промоторов, для тестирования было использовано 2 фрагмента регуляторной области гена dps. Фрагмент длиной 259 п.н. соответствует прилегающей к гену области и содержит основные промоторы этого гена [6]. Он был амплифицирован с использованием праймеров 5'-ATGCAGATCTTCTCGCTACTTTTC-3' и 5'-TCCTCTAGATGTTATGTCCCAGT-3'. Амплификацию второго фрагмента (214 п.н.), который удален от инициирующего кодона более чем на 200 пар оснований, вели с праймерами 5'-

GGAAGATCTTCCTCGGAGAAACACT-3' и 5'-ATATCTAGATATATAAAGACGGTGTA-3'. Этот фрагмент содержит промотор, предсказанный компьютерным алгоритмом PlatProm [9], активность которого зарегистрировать пока не удалось. Однако было установлено, что его присутствие необходимо для полной активности основных промоторов [6], что предполагает наличие в соответствующем генетическом локусе каких-то важных функциональных модулей. Комплексы обоих фрагментов с Dps формировали в течение 30 минут при 37°C в стандартном буфере, содержащем 50мМ Tris-HCl (pH 8.0), 0.1мМ EDTA, 50мМ NaCl, после чего в пробы добавляли краситель и наносили на 5 % ПААГ. Электрофорез проводили при напряжении 60В до достижения фронтом нижнего буфера. Для визуализации полос гель окрашивали бромистым этидием и нитратом серебра [10]. О взаимодействии между фрагментом ДНК и очищенным белком судили по убыли свободной ДНК (см. обсуждение). Результаты, представленные на Рис 1В, свидетельствуют о том, что очищенный рекомбинантный белок Dps взаимодействует с ДНК, хотя для этого требуется довольно большой молярный избыток белка.

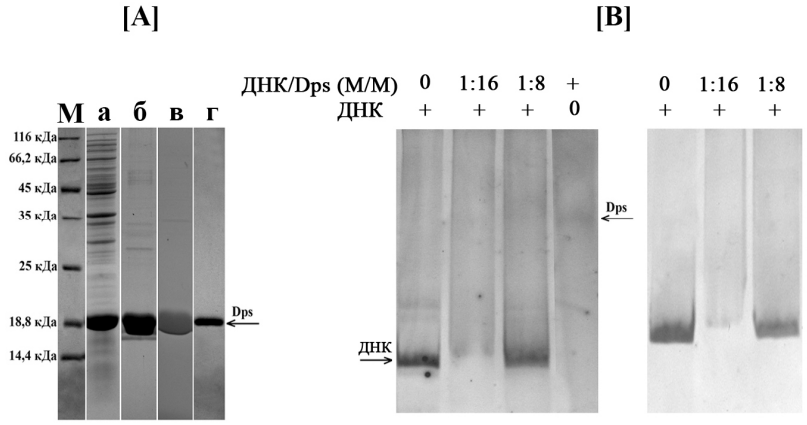

Рис. 1 [A]: Результаты хроматографического фракционирования белков. Приведены фотографии гелей, полученные после разделения белков в денатурирующих условиях. M – маркеры молекулярной массы; а – электрофореграмма суммарного лизата клеток; б – электрофореграмма полученной фракции белков после ионообменной хроматографии; в – электрофореграмма препарата после гель - фильтрации; г – электрофореграмма конечного препарата белка. [B]: Тестирование способности изолированного белка Dps взаимодействовать с ДНК. Приведены результаты электрофоретического разделения, выполненного в нативных условиях. Концентрация ДНК в пробах была ~ 0,5 мкМ. Молярный избыток белка в пересчете на додекамер указан над гелями. Слева приведен результат эксперимента, выполненного с фрагментом ДНК длиной 214 п.н., справа – 259 п.н. Стрелками указано место миграции Dps и свободных фрагментов ДНК. Все гели перед фотографированием были прокрашены нитритом серебра

Обсуждение результатов

Первоначально большой интерес к Dps *E.coli* был вызван его способностью поддерживать конформацию геномной ДНК, соответствующую скорости роста [11]. Кроме Dps, в этом процессе участвует еще несколько белков нуклеоида, но на

стационарной фазе роста именно Dps является главным архитектурным фактором ДНК [7]. Т.к. согласно литературным данным, практически все молекулы Dps ассоциированы с геномом, процедура его очистки требует дополнительных усилий, направленных на разрушение ДНК-белковых комплексов. Для того, что бы избавиться от остатков нуклеиновых кислот применяли многоступенчатую очистку рекомбинатного белка, основными этапами которой была ионообменная хроматография и гель-фильтрация. Предлагаемый метод позволяет получить 3-5 мг практически гомогенного белка с 300 мл клеточной культуры.

При работе с Dps необходимо учитывать его способность депонировать железо внутри белковой полости. Формирующие минеральное ядро оксиды трёхвалентного железа не являются активными гидролизующими агентами. Но способность ферритинов запасать ионы железа для внутриклеточных нужд предполагает возможность их освобождения и восстановления до активного двухвалентного состояния. Хорошо известно, что присутствие Fe^{2+} сопряжено с образованием активных форм кислорода, например в реакции Фентона и это может стать причиной постепенной деградации очищенного белка. Однако в рамках этой работы мы не наблюдали существенного изменения электрофоретического профиля очищенного препарата белка или снижения его ДНК-связывающей активности в течение, по крайней мере, нескольких месяцев.

Особенностью электрофореграмм, отражающих результат комплексообразования Dps с ДНК, является отсутствие на них формирующегося комплекса. Аналогичный результат электрофоретического фракционирования комплексов, образуемых этим белком, был опубликован ранее [12]. Причиной этого, скорее всего, является образование крупных олигомерных комплексов, которые не входят в гель. Известно, что в контакт с ДНК вступает неструктурированный N-концевой фрагмент Dps, содержащий 3 аминокислотных остатка лизина, которые сообщают ему сродство к отрицательно заряженной молекуле ДНК [13]. Все N-концы додекамера находятся на поверхности белковой глобулы и поэтому могут взаимодействовать одновременно с разными молекулами ДНК. Т.е. формирующиеся комплексы гетерогенны и содержат избыточное количество ДНК. Возможна и обратная ситуация. Согласно одной из моделей, комплексы формируются таким образом, что одна молекула ДНК располагается в промежутке, образуемом тремя додекамерами [4]. Поэтому об эффективности взаимодействия можно судить только по убыли свободной ДНК, но этого достаточно для того, чтобы исследовать зависимость процесса взаимодействия от различных физико-химических факторов и использовать эту способность бактериоферритина для создания самособирающихся конструкций.

Исследования были поддержаны грантами РФФИ (10-04-01218-а, 12-04-01830-а) и Фондом содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере в рамках программы «У.М.Н.И.К.». Работа, также, выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (№ Соглашения 8868), ФЦП "Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009-2013 годы", мероприятие 1.4. Исследования промоторов выполнены в рамках государственного задания Министерства образования и науки Российской Федерации по программе «Множественные промоторы, как индикаторы перекрывающейся транскрипции и альтернативного кодирования».

Заключение

Разработанный метод выделения и очистки рекомбинантного белка Dps *Escherichia coli* с использованием ионообменной хроматографии на ДЕАЕ-Сефадексе-А25 и гель-фильтрации на Сефадекс-G200 имеет высокую эффективность и позволяет получить 3-5 мг электрофоретически гомогенного белка с 300 мл бактериальной культуры. Белок сохраняет свою способность связываться с ДНК и может быть использован для детального исследования этого процесса в зависимости от физико-химических свойств полинуклеотида, ионного состава внутрибелкового кора и внешних факторов.

Список литературы

1. Stillman T. J., Connolly P. P., Latimer C. L. et al. Andrews S. C., Treffry A., Guest J. R., Artymiuk P. J., Harrison P. M. Insights into the effects on metal binding of the systematic substitution of five key glutamate ligands in the ferritin of *Escherichia coli* // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. P. 26275-26286.
2. Zhao G., Ceci P., Ilari A. et al. Iron and hydrogen peroxide detoxification properties of DNA-binding protein from starved cells // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 27689–27696.
3. Haikarainen T., Papageorgiou A.C. Dps-like proteins: structural and functional insights into a versatile protein family // Cell Mol. Life Sci. 2010. V. 67. P. 341–351.
4. Grant R.A., Filman D.J., Finkel S.E. et al. The crystal structure of Dps, a ferritin homolog that binds and protects DNA // Nat. Struct. Biol. 1998. V. 5(4). P. 294–303.
5. Антипов С. С., Курганов К. В., Чемерис К. С. и др. Бактериоферритин как биосенсор и наноструктура // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю. А.Овчинникова. 2007. Т. 3. С. 40-44.
6. Швырева У.С., Тутукина М. Н., Озолинь О.Н. Бактериоферритин: свойства и структурно-функциональная организация регуляторной области гена Dps // Биофизика. 2011. Т. 56(2). С. 821-830
7. Ali Azam T., Iwata A., Nishimura A. et al. Growth phase-dependent variation in protein composition of the *Escherichia coli* nucleoid // J. Bacteriol. 1999. V. 181. P. 6361–6370.
8. Davis B.J. Disc electroforesis II. Method and application to human serum protein // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1994. Vol. 121. P. 404-427.
9. Shavkunov K. S., Masulis I. S., Tutukina M. N. et al. Gains and unexpected lessons from genome-scale promoter mapping // Nucleic Acids Res. 2009. V. 37. P. 4919-4931.
10. Shevchenko A., Wilm M., Vorm O. Mass spectrometric sequencing of protein from silver-stained polyarylamide gels // Anal. Chem., 1996. V.68. P 850 – 858.
11. Almiron M., Link A.J., Furlong D. et al. A novel DNA-binding protein with regulatory andprotective roles in starved *Escherichia coli* // Genes Dev. 1992. V. 6. P. 2646–2654.
12. Azam T. A., Ishihama A. Twelve Species of the Nucleoid-associated Protein from *Escherichia coli*. Sequence recognition specificity and DNA binding affinity // J. Biol. Chem., 1999. V. 274. P. 33105-33113.
13. Ceci P., Cellai S., Falvo E. et al. DNA condensation and self-aggregation of *Escherichia coli* Dps are coupled phenomena related to the properties of the N-terminus // Nucleic Acids Res. 2004. V. 32. P. 5935–5944

Покусаева Виктория Олеговна – магистрант, кафедра Биофизики и биотехнологии, ФБГОУ ВПО «Воронежский государственный университет», Воронеж

Антипов Сергей Сергеевич – к.б.н., ассистент, кафедра Биофизики и биотехнологии ФБГОУ ВПО «Воронежский государственный университет», Воронеж

Швырева Ульяна Сергеевна – аспирант ФГБОУ ВПО «Пущинский государственный естественнонаучный институт», Пущино, Московская область, Лаборатория функциональной геномики и клеточного стресса ФГБУН «Институт биофизики клетки Российской академии наук», Пущино

Тутукина Мария Николаевна – к.б.н., лаборатория функциональной геномики и клеточного стресса ФГБУН «Институт биофизики клетки Российской академии наук», Пущино

Pokusaeva Viktoria O. - Master's student, Department of biophysics and biotechnology, Voronezh State University, Voronezh, e-mail: pokusaevavika@mail.ru

Antipov Sergei S. – PhD in biology, Department of biophysics and biotechnology, Voronezh State University, Voronezh

Shvyreva Uliana S. – PhD student, Pushchino State natural-scientific Institute, Pushchino, Moscow Region, Department of Functional genomics and cellular stress, Institute of cell biophysics of Russian academy of sciences, Pushchino, Moscow Region

Tutukina Maria N. – PhD in biology, Department of Functional genomics and cellular stress, Institute of cell biophysics of Russian academy of sciences, Pushchino, Moscow Region, Pushchino State Institute of natural sciences, Pushchino