

УДК 577.112.856:579.252.5

**ПОЛУЧЕНИЕ МОДИФИЦИРОВАННОГО РЕКОМБИНАНТНОГО АПОЛИПОПРОТЕИНА А-I ДЛЯ ПЕРЕНОСА НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ****Котова М.В., Рябченко А.В., Трифонова Н.В., Князев Р.А., Поляков Л.М.***ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биохимии», Новосибирск, e-mail: borrelia@mail.ru*

В работе представлен материал по получению модифицированного варианта аполипопротеина А-I (апоА-I) человека, и изучению его способности связываться с фрагментами ДНК различной длины в сравнении с рекомбинантным белком нативной формы. Модификация заключалась во введении в структуру апоА-I с С-конца белка фрагмента в виде 10 аминокислотных остатков лизина (апоАрК10). Предполагалось, что введенный полилизинный фрагмент будет способен конденсировать ДНК. Рекомбинантные белки были получены клонированием соответствующих кодирующих ДНК в клетках *E. coli* в составе экспрессирующего вектора, с последующим разрушением и очисткой белков с помощью аффинной хроматографии. Методом ретардации фрагментов ДНК в агарозном геле показано дозозависимое связывание апоАрК10 с двухцепочечной ДНК размером ~1000 и 4700 п.н., в случае белка нативной формы специфического взаимодействия выявлено не было. Инкубация плазмидной ДНК с избытком белка в присутствии эндонуклеазы рестрикции защищала плазмиду от гидролиза. Таким образом, полученный белок апоАрК10 специфически связывается с ДНК и может являться перспективным переносчиком нуклеиновых кислот.

**Ключевые слова:** рекомбинантный аполипопротеин А-I человека, трансфекция, ДНК, *E. coli*

**DESIGN OF MODIFIED RECOMBINANT APOLIPOPROTEIN A-I FOR TRANSFER OF NUCLEIC ACIDS****Kotova M.V., Ryabchenko A.V., Trifonova N.V., Knyazev R.A., Polyakov L.M.***Institute of Biochemistry, Novosibirsk, e-mail: borrelia@mail.ru*

The paper report design of a modified apolipoprotein A-I (apoA-I), and the study of its ability to bind to DNA fragments of different lengths in comparison with a recombinant native protein. The modification consisted introducing into the apoA-I structure from the C-terminus 10 amino acid residues of lysine (apoApK10). It was assumed that the introduced polylysine fragment would be able to condense DNA. Recombinant proteins were obtained by cloning coding DNA in *E. coli* cells, as part of an expression vector, followed by destruction and purification of proteins by affinity chromatography. The retardation of DNA fragments in an agarose gel showed a dose-dependent binding of apoApK10 to double-stranded DNA of size ~ 1000 and 4700 bp. In contrast, the native protein did not show a specific interaction with DNA. Incubation of plasmid DNA with excess protein in the presence of restriction endonuclease protected the plasmid from hydrolysis. Thus, the obtained apoApK10 protein specifically binds to DNA, and can be a promising nucleic acid carrier.

**Keywords:** recombinant human apoA-I, transfection, DNA, *E. coli*

В настоящее время большую роль в области генной терапии занимают исследования по конструированию безопасных переносчиков нуклеиновых кислот на основе модульных полипептидов. Такие полипептиды состоят из различных функциональных модулей: сигналы ядерной локализации; лиганды для распознавания полипептидом определенного типа клеток; домены, конденсирующие нуклеиновые кислоты; пептиды способствующие высвобождению комплексов полипептид-НК из эндосом и другие различные модули [1, 2]. В настоящем исследовании мы предположили, что основой для такого полипептида-переносчика мог бы быть белковый компонент липопротеинов высокой плотности – аполипопротеин А-I (апоА). Многие клетки организма имеют на мембранах к апоА специфические рецепторы [3], особенно высокий уровень рецепторов был обнаружен в гепатоцитах и опухолевых клетках. Это свойство мо-

жет быть использовано в качестве одной из функций полипептида на основе апоА при доставке плазмидных ДНК (пДНК) в клетки с помощью рецептор-опосредованного эндоцитоза. Второй особенностью апоА является его свойство взаимодействовать с нуклеиновыми кислотами. Так, ранее в Институте биохимии было показано, что свободный апоА, а также в комплексе с тетрагидрокортизолом связывается с эукариотической ДНК [4]. Эти предпосылки – специфическое (или слабоспецифическое) взаимодействие апоА с ДНК и рецепторный эндоцитоз апоА клетками, позволили предположить возможность использования этого белка в качестве переносчика пДНК в клетку. Мы также предположили, что можем увеличить аффинность апоА к ДНК путем введения в структуру белка фрагмента, состоящего из повторов аминокислоты лизина, имеющей положительный заряд при нейтральном рН. Известно, что фрагменты гистоновых белков, способных

связываться с ДНК, богаты лизином [5]. В связи с этим **целью настоящего исследования** явилась модификация рекомбинантного апоА человека путем введения в его структуру полилизинного фрагмента, в также изучение способности полученного белка специфически связываться с ДНК.

### Материалы и методы исследования

Для амплификации гена апоА была использована плазида, полученная ранее в нашей лаборатории, несущая ген апоА человека [6]. Для амплификации использовали праймеры, представленные в таблице. ПЦР проводили с помощью набора реагентов с Taq ДНК-полимеразой («Евроген», Россия) на амплификаторе МС-2 («ДНК-технология», Москва). Состав реакционной смеси использовали согласно инструкции к набору. Для клонирования гена использовали модифицированный нами ранее вектор рЕТ36b(+) «Novagen» (США) [7]. Для модификации гена в составе плазмиды рЕТ36b(+) по сайту XhoI на 3'-конце гена апоА был встроены дуплекс, кодирующий 16 а.о., в том числе 10 а.о. лизина. Для получения дуплекса использовались олигонуклеотиды № 12 и № 13 (таблица). Олигонуклеотиды были синтезированы ЗАО «Биосан» (Россия).

Плазмиды гидролизировали эндонуклеазами рестрикции FauND I (прототип Nde I) и Sfi274 I (прототип Xho I), согласно инструкции фирмы-производителя ферментов «СибЭнзим» (Россия). Фрагменты ДНК разделяли с помощью электрофореза в агарозном геле с последующим извлечением нужного фрагмента из геля набором «Cleanup Standard» «Евроген» (Россия). Фрагменты ДНК лигировали с помощью фермента Т4 ДНК-лигазы согласно инструкции фирмы производителя «СибЭнзим» (Россия).

Трансформацию клеток *E. coli* плазмидными ДНК проводили с помощью электропорации по методике фирмы-производителя прибора («PepLab, Biotechnologie GmbH», Германия). Рекомбинантные клоны *E. coli* отбирали на селективной среде LB (lysogeny broth), содержащей канамицин (30 мкг/мл).

Для изучения связывания белков с ДНК использовали плазмиду рTagGFP2-С размером ~ 4700 п.н. («Евроген», Россия) и амплифицированный фрагмент плазмиды рЕТ36b(+), размером ~ 1000 п.н., содержащий ген апоА. Плазмиду нарабатывали в клетках *E. coli* штамм «NovaXGF» («Novagen», США) в среде LB в присутствии канамицина 30 мкг/мл. Плазмиду выделяли из клеток набором «PlasmidMidiprep» («Евроген», Россия). Фрагмент плазмиды, содержащий ген апоА, получали с помощью ПЦР с праймерами № 268F и № 13. Качество плазмиды, анализ фрагментов ДНК и продуктов ПЦР осуществляли методом электрофореза в 0,8–1,2% агарозном геле с последующим окрашиванием ДНК бромистым этидием.

В качестве хозяйских клеток-продуцентов рекомбинантных белков использовали клетки *E. coli* шт. BL21(DE3). Для наработки биомассы клеток и выделения белка из отобранного клона *E. coli* выращивали ночную культуру в среде LB объемом 5 мл при 37 °С. На следующий день ночную культуру переносили в двухлитровую колбу с 500 мл свежей среды LB, содержащей канамицин 30 мкг/мл. Клетки выращивали при активном перемешивании и 37 °С до оптической плотности  $D_{600} = 0,8–1,2$  о.е. и добавляли

индуктор – изопропил-β-D-1-тиогактопиранозид до 0,05 мМ. Далее клетки инкубировали 18 ч при 30 °С. По окончании инкубации клетки осаждали центрифугированием при 3000 об/мин в течение 20 мин, осадок замораживали и хранили до выделения белка. Клеточные лизаты и белки анализировали в 12% полиакриламидном геле (ПААГ) по Лэммли.

Рекомбинантные белки выделяли из клеток-продуцентов *E. coli* с помощью аффинной хроматографии на сорбенте «Ni-NTA Superflow» («Qiagen», США) в денатурирующих условиях. Белки обессоливали методом диализа против фосфатно-солевого буфера рН 7,4–7,5 и стерилизовали фильтрованием через фильтр с размером пор 0,22 мкм.

Измерение концентрации белков и пДНК проводили спектрофотометрически в ЦКП «Спектрометрические измерения» на базе НИИ биохимии, г. Новосибирск. Измерение концентрации белков при  $\lambda = 280$  нм и концентрации ДНК при  $\lambda = 260$  нм проводили на спектрофотометре Evolution 300 («Thermo Scientific», США).

### Результаты исследования и их обсуждение

Ранее в нашей лаборатории был получен продуцент рекомбинантного белка апоА на основе клеток *E. coli* [6]. Эта конструкция была использована в качестве матрицы для последовательной амплификации гена с помощью пар праймеров № 3Fa + № 6R, № 3Fb + № 6R и № 3Fc + № 6R (таблица). Это позволило ввести с 5'-конца гена фрагмент ДНК, кодирующий пептид проформы белка (Agr-His-Phe-Trp-Gln-Gln), поскольку известно, что без данного пептида уровень синтеза белка в клетках *E. coli* является очень низким. Праймеры № 3Fc и № 6R в своей структуре несли сайты эндонуклеаз рестрикции Nde I и Xho I, соответственно. Ампликон гена апоА был встроены в модифицированный нами вектор рЕТ36b(+) [7], при этом на 3'-конце гена апоА, после сайта эндонуклеазы рестрикции Xho I появлялась последовательность ДНК, кодирующая 8 а.о. гистидина, что позволяло в дальнейшем выделять белок с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии. При трансформации клеток было отобрано несколько клонов, положительных в ПЦР, несущих вставку гена апоА и способных синтезировать рекомбинантный белок при индукции клеток-продуцентов 0,05 мМ ИПТГ. Последующее выделение белка апоА из этих клонов и анализ фракций в ПААГ подтвердило правильность выбора (рис. 1, дорожки 1–3). Выход рекомбинантного апоА составил около 50 мг/л культуры клеток продуцента. Один из клонов использовался для выделения пДНК, которая в дальнейшем послужила для модификации гена апоА и введения в структуру фрагмента, кодирующего 10 а.о. лизина.

Используемые в работе олигонуклеотиды

Название	Структура (5'-3')
Прямой праймер № 3Fa	CTGGCAGCAAGATGATCCGCCGCAGAGC
Прямой праймер № 3Fb	TGCGCCATTTCTGGCAGCAAGATGATCC
Прямой праймер № 3Fc	TATCTTCATATGCGCCATTTCTGGCAGC
Обратный праймер № 6R	TACATCTCGAGCTGGGTGTTCAGCTTCTTAG
№ 12 (смысловый олигонуклеотид)	TCGACGGCCCCGGCGAAAAAGAAAAAGAAAT TAAAGAAAAAGAAAAAGC
№ 13 (антисмысловый олигонуклеотид)	TCGAGCTTTTCTTTTCTTTTCTTAAATTTCTTTTTC TTTTTCGCCGGGCCG
Прямой праймер № 268F	ATGCGTCCGGCGTAGA

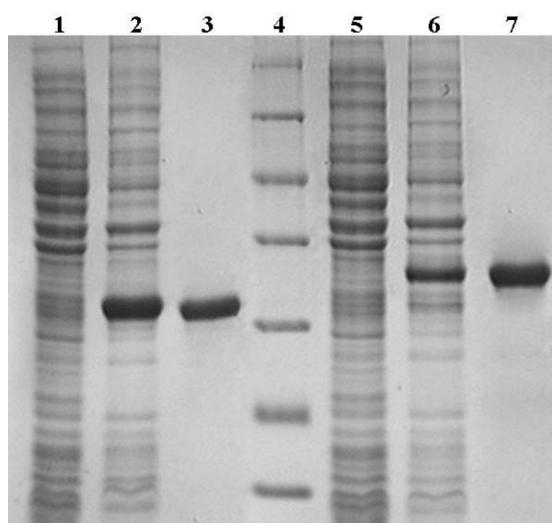


Рис. 1. Электрофореграмма анализа фракций получения рекомбинантных белков apoA и apoArK10 из клеток *E. coli* в 12% ПААГ. Дорожки: 1 и 2 – клеточные лизаты клеток-продуцентов apoA без индуктора и с индуктором соответственно; 3 – очищенный apoA; 4 – маркерные белки, бета-галактозидаза 116 кДа, бычий сывороточный альбумин 66,2 кДа, овальбумин 45,0 кДа, лактатдегидрогеназа 35 кДа, эндонуклеаза рестрикции *Vsp98I* 25 кДа, бета-лактоглобулин 18,4 кДа, лизоцим 14,4 кДа (*Thermo Fisher Scientific, США*); 5 и 6 – клеточные лизаты клеток-продуцентов apoArK10 без индуктора и с индуктором, соответственно; 7 – очищенный apoArK10

В полученную пДНК по сайту Xho I между геном apoA и 8 а.о. гистидина был встроены дуплекс, кодирующий 16 а.о., десять из которых представляли полилизиновый фрагмент, поделенный на две части остатком лейцина (LDGPAKKKKKLKKKKK). Дуплекс был получен путем эквимольярной гибридизации олигонуклеотидов № 12 и № 13, при этом дуплекс образовывал «липкие концы» для встройки в плазмиду, гидролизованную по Xho I сайту рестрикции. Клоны, несущие вставку полилизино-

вого фрагмента в составе плазмиды, были отобраны методом ПЦР и проанализированы на способность синтезировать модифицированный белок apoArK10 с помощью индукции ИПТГ и последующим анализом клеточных лизатов в ПААГ (рис. 1, дорожки 5–7). Часть положительных клонов была отобрана в музей и далее использовалась для наработки биомассы и выделения белка apoArK10, аналогично рекомбинантному apoA.

Известно, что необходимой предпосылкой для использования белка в качестве переносчика нуклеиновых кислот является его специфическое взаимодействие с ними. Одним из способов определения взаимодействия белка с ДНК является метод ретардации фрагментов ДНК в агарозном геле. Задержка ДНК в присутствии белка свидетельствует об образовании комплексов белок – ДНК,двигающихся с уменьшенной скоростью относительно свободной ДНК, либо полностью останавливающихся в геле. Для анализа мы использовали амплифицированный методом ПЦР фрагмент плазмиды размером ~1000 п.н. и плазмидную ДНК рTagGFP2-С размером ~4700 п.н. Исследовались различные соотношения по массе белок/ДНК, от 0,5:1 до 16:1. Смеси инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре в фосфатно-солевом буфере при комнатной температуре, затем к образцам добавляли 1/10 часть 100% глицерина, образцы сразу же вносили в карманы геля и проводили электрофорез. Анализ взаимодействия apoArK10 и ДНК показал, что полная задержка фрагментов ДНК и плазмиды в карманах геля происходила при избытке белка в ~16 раз (рис. 2, А, дорожка 8 и рис. 2, Б, дорожка 7).

В качестве контрольного анализа аналогичным образом было исследовано взаимодействие рекомбинантного apoA не содержащего полилизинового фрагмента. Результаты показали отсутствие изменений подвижности фрагментов ДНК в геле, даже при избытке белка по массе в 16 раз (данные

не приводятся). Таким образом, задержка фрагментов ДНК в агарозном геле свидетельствует о том, что модифицированный апоАрК10, за счет введения в его структуру фрагмента из 10 а.о. лизина, приобрел способность конденсировать на себе ДНК, т.е. образовывать комплекс белок – ДНК. Из литературных данных известно, что ги-

стоновые белки, эффективно переносящие ДНК в клетки млекопитающих, осуществляют полную задержку плазмиды в карманах геля уже при соотношении белок – ДНК равном 1:1, например Н1С гистон [8]. Возможно, что введение в структуру белка 10 а.о. лизина оказалось недостаточным для эффективного переноса ДНК в клетки.

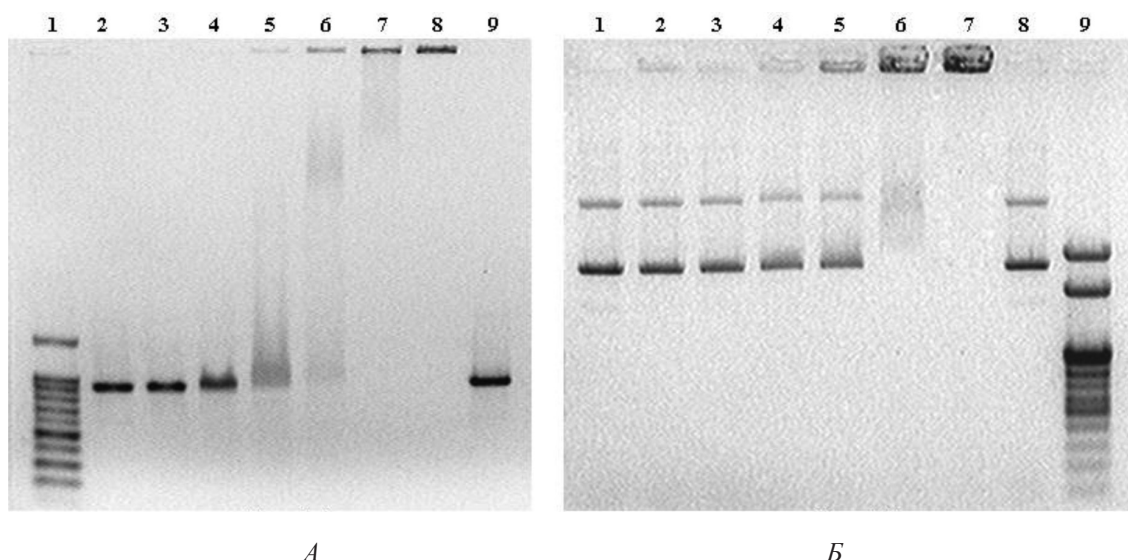


Рис. 2. А. Электрофореграмма анализа смесей амплифицированных фрагментов плазмиды и апоАрК10. Дорожки: 1 – ДНК маркер 100–1000 и 1500 п.н. («СибЭнзим», Россия); 2 и 9 – фрагменты без инкубации с белком; 3–8 – фрагменты, инкубированные с избытком белка по массе в 0,5, 1, 2, 4, 8 и 16 раз соответственно. Б. Электрофореграмма анализа смесей плазмиды rTagGFP2-С и апоАрК10. Дорожки: 1 и 8 – контрольная плазида, инкубированная без апоАрК10; 2–7 – образцы плазмиды, инкубированные с избытком апоАрК10 по массе в 0,5, 1, 2, 4, 8 и 16 раз соответственно; 9 – ДНК маркер 100–1000 п.н., 2 и 3 т.п.н. («СибЭнзим», Россия)

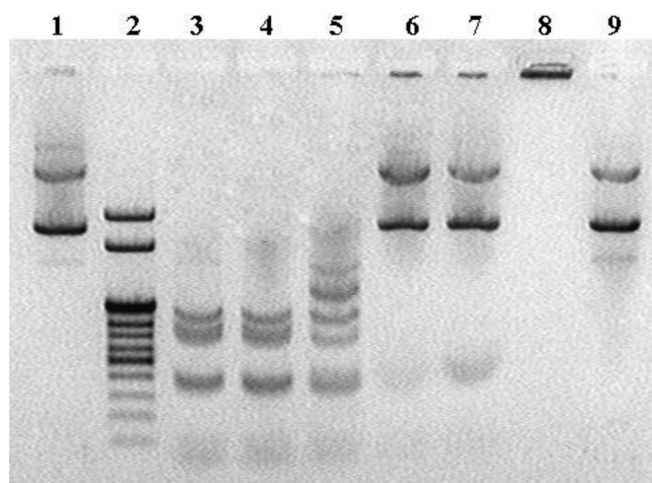


Рис. 3. Электрофореграмма анализа смесей плазмиды rTagGFP2-С и апоАрК10 в присутствии Hinf I. Дорожки: 1 и 9 – контрольная плазида, инкубированная без апоАрК10; 2 – ДНК маркер 100–1000 п.н., 2 и 3 т.п.н. («СибЭнзим», Россия); 3 – плазида, инкубированная с ферментом; 4–7 – образцы плазмиды, инкубированные с ферментом, в присутствии белка апоАрК10 с избытком по массе в 2, 4, 8 и 16 раз соответственно; 8 – плазида, инкубированная с избытком апоАрК10 по массе в 16 раз, в пробу не добавляли додецилсульфат натрия

Известно, что для успешного применения белка в качестве переносчика нуклеиновых кислот в клетки млекопитающих белок должен защищать переносимый материал от нуклеаз [1, 2]. В частности, трансфекция обычно проводится в присутствии 10% фетальной бычьей сыворотки, которая является источником нуклеаз. Чтобы смоделировать подобную ситуацию, мы решили изучить взаимодействие плазмиды pTagGFP2-C с апоАрК10 в присутствии эндонуклеазы рестрикции Hinf I. В результате полного гидролиза плазмиды ферментом должно образовываться 13 фрагментов размером 1010, 860, 782, 464, 442, 410, 396, 134, 58, 55, 52, 37 и 22 п.н. Как и в предыдущем эксперименте, белок инкубировали с плазмидой, затем в пробы добавляли по 1 ед. фермента и продолжали инкубацию проб при 37°C в течение 30 мин. После чего, для диссоциации комплексов белок – плазида, к пробам добавляли додецилсульфат натрия до 0,5% по объему и вносили пробы в карманы геля. Результаты анализа представлены на рис. 3.

Анализ взаимодействия апоАрК10 с плазмидой в присутствии эндонуклеазы рестрикции Hinf I показал, что при малом избытке белка (в 2 раза) плазида полностью гидролизовалась, аналогично плазмиде, инкубированной без белка (рис. 3, дорожки 3 и 4). При избытке белка в 8 и 16 раз плазида сохраняла исходную форму и не подвергалась гидролизу.

#### Заключение

В результате выполнения работы получен модифицированный апоА-I человека,

содержащий на С-конце 10 а.о. лизина. Полученный белок апоАрК10 дозозависимым образом взаимодействовал с ДНК и защищал ее от нуклеазы Hinf I, что свидетельствует о специфичности взаимодействия. Полученный белок может быть перспективным переносчиком нуклеиновых кислот в клетки организма.

#### Список литературы

1. Canine B.F., Hatefi A. Development of recombinant cationic polymers for gene therapy research // *Advanced drug delivery reviews*. – 2010. – vol. 62, no. 15. – P. 1524–1529.
2. Использование процессов внутриклеточного транспорта для доставки лекарств в заданный компартмент клетки / А.А. Розенкранц [и др.] // *Биохимия*. – 2014. – № 9. – С. 1148–1168.
3. Farve G., Tazi K., Le G., Bennis F., Hachem H., Soula G. High density lipoprotein3 bindings sites are related to DNA biosynthesis in the adenocarcinoma cell line A549 // *J. Lipid. Res.* – 1993. – vol. 34, no. 7. – P. 1093–1106.
4. Структура сайтов взаимодействия ДНК эукариот с комплексами стероидный гормон-аполипопротеин А-I / Л.Е. Панин [и др.] // *Молекулярная биология*. 2007. – № 4. – С. 583–588.
5. Соловьева В.В. Перенос рекомбинантных нуклеиновых кислот в клетки (трансфекция) с помощью гистонов и других ядерных белков / В.В. Соловьева, Н.В. Кудряшова, А.А. Ризванов // *Гены и Клетки*. – 2011. – № 3. – С. 29–40.
6. Рябченко А.В. Конструирование суперпродукта рекомбинантного аполипопротеина А-I человека на основе клеток *Escherichia coli* / А.В. Рябченко, М.В. Котова, Л.М. Поляков // *СНМЖ*. – 2015. – № 6. – С. 16–21.
7. Рябченко А.В. Сравнительный структурный и иммунохимический анализ рекомбинантных антигенов OspC новосибирских изолятов спирохет *Borrelia garinii* и *Borrelia afzelii* / А.В. Рябченко, В.С. Караваев, А.Б. Беклемишев // *Сиб. науч. мед. ж.* – 2010. – № 2. – С. 6–12.
8. Jung H.J., Hwang D.S., Wei Q.D., Cha H.J. Carassius auratus-originated recombinant histone H1 C-terminal peptide as gene delivery material // *Biotechnology progress*. – 2008. – vol. 24, no. 1. – P. 17–22.