

Получение рекомбинантного шаперона GroEL и его иммунологическая кросс-реактивность с Hsp60

Л. Н. Капустян, Р. Г. Киямова, В. С. Гришкова, А. Г. Терентьев,
В. В. Филоненко, Л. Л. Сидорик

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

sidorik@imbg.org.ua

Описан метод получения рекомбинантного шаперона GroEL (прокариотного гомолога эукариотного шаперона Hsp60), включающий экспрессию белка в клетках Escherichia coli с последующей очисткой белка градиентным высаливанием из лизата клеток-продуцентов, гель-фильтрацией на сефакриле-S300 и ионообменной хроматографией на MonoQ HR 5/5. Данный метод позволяет эффективно наработать белок GroEL 95 %-й степени очистки в препаративных количествах. Рекомбинантный белок затем использовали для получения поликлональных анти-GroEL антител и синтеза аффинной колонки. Показан иммунологический перекрест аффинно очищенных поликлональных анти-GroEL антител с представителями семейства Hsp60 в лизатах органов и клеток различных видов млекопитающих — от мыши до человека, что позволяет использовать данные антитела при изучении изменения уровней экспрессии и клеточной локализации Hsp60 в случае аутоиммунных и раковых патологий человека.

Ключевые слова: GroEL, Hsp60, ионообменная хроматография, гель-фильтрация, поликлональные антитела, аутоиммунные патологии человека.

Введение. Различные виды физиологического стресса (тепловой шок, вирусная инфекция, радиация, гемодинамические нарушения, ишемия, оксидативный стресс и др.) способны вызвать множественные изменения в клетках, в том числе затрагивающие структуру и функции белков. В последние годы накоплен ряд данных, позволяющих говорить о том, что молекулярной основой ряда заболеваний является неправильный фолдинг (укладка вновь синтезированных полипептидных цепей) белков [1—3]. Одним из факторов, влияющих на корректность фолдинга, является функционирование специализированного высококонсервативного семейства белков — молекулярных шаперонов (МШ), оп-

ределяющих правильность укладки белковых молекул, импорт предшественников органелльных белков в соответствующие клеточные компартменты, репарацию ионных каналов, апоптоз, активацию стероидных рецепторов, регуляцию сигнальных каскадов, синтез коллагена при репаративном фиброзе, презентацию внутриклеточных антигенов [4—6].

Белки теплового шока МШ подразделяются на несколько семейств в зависимости от молекулярной массы и специализированных функций [7, 8]. Семейство Hsp60 — это белки митохондриального матрикса, участвующие в сборке, транспорте митохондриальных белков и предотвращении белковой агрегации. При различных патологических состояниях наблюдаются изменения как в уровне экспрессии Hsp60, так и в его клеточной локализации [9—12].

© Л. Н. КАПУСТЯН, Р. Г. КИЯМОВА, В. С. ГРИШКОВА,
А. Г. ТЕРЕНТЬЕВ, В. В. ФИЛОНЕНКО, Л. Л. СИДОРИК,
2006

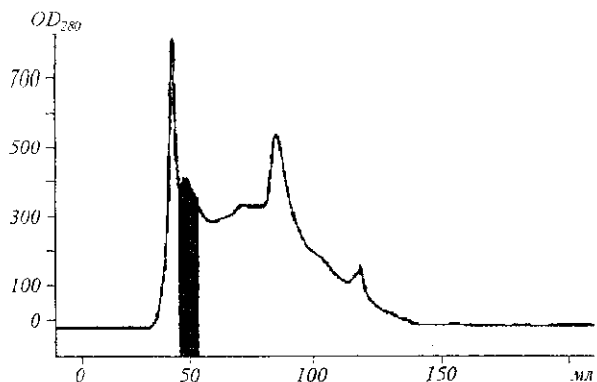


Рис. 1. Профиль гель-хроматографической очистки GroEL на колонке с сефакрилом-S300 (фракции, содержащие GroEL, выделены темным цветом)

Молекулярные шапероны Hsp60 из разных таксономических групп принадлежат к высококонсервативному семейству белков с гомологией до 50 % [13]. В частности, белок GroEL из *Escherichia coli* является прокариотным гомологом Hsp60 млекопитающих. Целью нашей работы была разработка эффективного и быстрого метода очистки бактериального белка GroEL, получение анти-GroEL антител, а также доказательство возможности их использования в исследованиях изменения уровня экспрессии и клеточной локализации Hsp60 при различных патологиях человека.

Материалы и методы. В работе использована рекомбинантная плазмида *pT-GroEL*, сконструированная на основе вектора *pACYC-184* («Fermentas», Литва) и содержащая кодирующую последовательность гена *GroEL* под T7 промотором, *p15a* репликон и маркер устойчивости к хлорамфениколу; штамм клеток *E. coli* BL21(DE3), контрольный белок GroEL («Sigma», США), моноклональные антитела к GroEL («Sigma»). Трансформацию проводили по стандартной методике [14].

Чистоту белков анализировали электрофоретически в денатурирующих условиях с додецилсульфатом натрия (DS-Na) в 12 %-м полиакриламидном геле (ПААГ) по Леммли [15]. Концентрацию белка определяли по методу Бредфорд [16]. Иммунизацию кроликов осуществляли по разработанному нами ранее методу [17]. Аффинную колонку изготавливали, как описано в работе [17]. Аффинность полученных анти-GroEL антител проверяли твердофазным иммуноферментным анализом (ELISA) [18], специфичность — методом иммуноблоттинга [19]. Лизаты органов млекопитающих получали согласно методике, описанной в [20].

Результаты и обсуждение. Экспрессию рекомбинантного GroEL индуцировали в клетках *E. coli* BL21(DE3), трансформированных плазмидой *pT-GroEL*, добавлением 1 mM IPTG (изопропил-1-тио-β-D-галактозид) и клетки инкубировали в течение ночи при $t = 37$ °C. Клетки осаждали, ресуспендировали в лизирующем буфере А, содержащем 10 mM трис-HCl, pH 8,0, 50 mM NaCl и ингибиторы протеаз (1 mM PMSF, 0,2 % аprotинин, 5 mM бензамидин), и разрушали ультразвуком на дезинтеграторе. Полученный после центрифугирования супернатант использовали для очистки GroEL хроматографическими методами. Белок очищали по следующей схеме: высаливание, HPLC гель-фильтрация и HPLC ионообменная хроматография. Показано, что наибольшее количество белка осаждается при насыщении раствора сульфатом аммония от 43 до 55 %. Гель-фильтрацию проводили на колонке (1 × 26 см) с сефакрилом-S300, уравновешенной буфером А (рис. 1).

Чистоту и специфичность фракций, содержащих GroEL, анализировали с помощью электрофоретического разделения белков по Леммли (рис. 2, а) и Вестерн-блот-анализа с использованием коммерческих анти-GroEL антител (рис. 2, б). Фракции, содержащие GroEL, собирали и наносили на колонку с ионообменником MonoQ HR 5/5 для ионообменной хроматографии. Колонку уравновешивали буфером А и элюцию проводили линейным градиентом концентрации NaCl (10—1000 mM). GroEL элюировался при концентрации NaCl 500—600 mM (рис. 3). Отобранные по результатам электрофореза фракции, содержащие белок не менее 95 % чистоты, диализовали против буфера А. Специфичность полученного белка определяли методом иммуноблоттинга, используя коммерческие моноклональные анти-GroEL-антитела («Sigma») (рис. 2, б).

Полученный препарат GroEL использовали для иммунизации кроликов при выделении антител. Через 7 дней после последней иммунизации у кроликов брали кровь для получения антисыворотки. Иммуноглобулины высаливали при 50 %-м насыщении сыворотки сульфатом аммония. Антитела очищали на ДЭАЭ-целлюлозе. Колонку уравновешивали PBS-буфером (0,75 M NaCl, 0,025 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, pH 7,4). Антитела элюировали буфером PBS, объем фракций составлял 0,5 мл. Пиковые фракции собирали и наносили на аффинную колонку с конъюгированным GroEL. Колонку

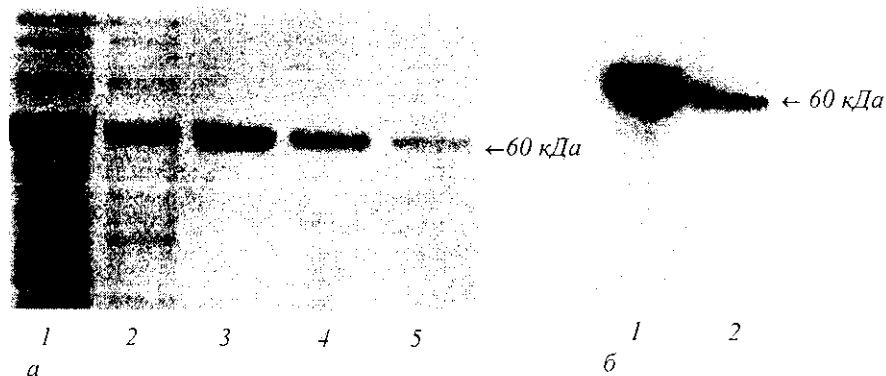


Рис. 2. Анализ чистоты и специфичности очищенного белка GroEL: а — электрофореграмма фракций, содержащих GroEL, на разных стадиях очистки (1 — после высадки; 2 — после гелефильтрации (пиковые фракции); 3, 4 — после ионообменной хроматографии на колонке с MonoQ; 5 — контрольный GroEL); б — Вестерн-блот-анализ GroEL (1 — очищенный GroEL после ионообменной хроматографии; 2 — контрольный GroEL)

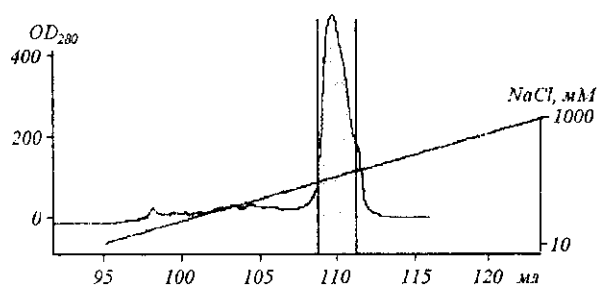


Рис. 3. Профиль элюции белков с колонки с носителем MonoQ линейным градиентом концентрации NaCl [(10—1000 мМ)]. GroEL элюировался в диапазоне концентраций NaCl 500—600 мМ

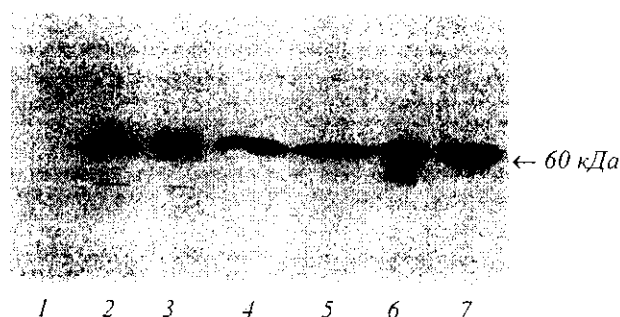


Рис. 4. Иммунологическая кросс-реактивность шаперонов семейства Hsp60, определенная с помощью иммуноблотинга (Вестерн-блот) с использованием аффинно очищенных поликлональных анти-GroEL антител в лизатах сердец различных видов млекопитающих: 1 — БСА; 2 — мышь BALB/c; 3 — кролик; 4 — бык; 5 — человек; 6 — *E. coli*; 7 — контрольный GroEL «Sigma»

уравновешивали буфером PBS. После инкубации с антителами в течение 2 ч при комнатной температуре колонку промывали буфером PBS, антитела элюировали 0,2 М глициновым буфером, pH 2,5, с последующей нейтрализацией pH 1 М трис-HCl (pH 11). Пиковые фракции антител диализовали против буфера PBS в течение ночи при $t = 4^\circ\text{C}$. Аффинность полученных анти-GroEL антител про-

веряли с помощью ELISA, специфичность — методом иммуноблотинга.

Поскольку в работе мы использовали рекомбинантный белок, полученный с помощью экспрессии гена *GroEL* (бактериальный гомолог шаперона млекопитающих Hsp60), было необходимо показать иммунологический перекрест антител с шаперонами данного семейства у разных организмов — от прокариотов до разных видов млекопитающих, включая клетки человека.

Данные изучения иммунореактивности поликлональных аффинно очищенных анти-GroEL антител показаны на рис. 4. Видно, что анти-GroEL антитела узнают полипептид с молекулярной массой около 60 кДа в лизатах сердец всех исследованных видов (от мыши до человека) и лизатах клеток *E. coli* и их иммунореактивность можно сопоставить с таковой коммерческих антиGroEL антител против контрольного антигена (рис. 2, б). Эти данные и данные литературы, подтверждающие высокую степень гомологии шаперонов семейства Hsp60 и белка GroEL, позволяют использовать рекомбинантный прокариотный белок GroEL и полученные к нему антитела в исследованиях, базирующихся на материале эукариотов.

Проведенный нами анализ временной стабильности клеток-продуцентов показал, что уровень экспрессии белка GroEL остается относительно стабильным в течение 4—6 месяцев при хранении суспензии клеток в 50 %-м глицерине при температуре -70°C .

Разработанный нами метод очистки GroEL позволяет быстро и эффективно получить препаративные количества белка высокой степени чистоты. Планируется использовать рекомбинантный прокариотный белок GroEL в исследованиях роли его

эукариотного гомолога — молекулярного шаперона Hsp60 при канцерогенезе и аутоиммунных патологиях человека.

L. N. Kapustian, R. G. Kyuyamova, V. S. Gryshkova,
A. G. Terentiev, L. L. Sidorik

Obtaining recombinant chaperon GroEL and its immunological cross-reactivity with Hsp60

Summary

The method of obtaining and purification of recombinant chaperon GroEL (prokaryotic homolog of eukaryotic chaperon Hsp60) including the protein expression in *E. coli* cells, precipitation with saturated ammonium sulphate from a producent lysate, gel-filtration on Sephacryl-300 column and ion-exchange chromatography on MonoQ HR 5/5 column, is described. The present method allows effective obtaining of the preparative amount of the GroEL protein of 95 % purity. The recombinant protein was used for the anti-GroEL antibodies production and synthesis of the affine column. The immunological cross-reactivity of polyclonal affine-purified anti-GroEL antibodies and members of Hsp60 family from different organs and cells lysates of different mammals, from mouse to human, have been revealed, which allows using these antibodies for research of Hsp60 expression alterations and cell localization at human autoimmune and cancer pathologies.

Key words: Hsp60, GroEL, ion-change chromatography, gel-filtration, polyclonal antibodies, human autoimmune pathologies.

Л. Н. Капустян, Р. Г. Киямова, В. С. Гришкова,
А. Г. Терентьев, В. В. Філоненко, Л. Л. Сидорик

Одержання рекомбінантного шаперону GroEL і його імунологічна крос-реактивність з Hsp60

Резюме

Описано метод одержання і очищення рекомбінантного шаперону GroEL (прокаріотного гомолога еукаріотного шаперону Hsp60), що включає експресію білка в клітинах *Escherichia coli* з наступним градієнтним висоловнянням з лізату клітин-продуцентів, гель-фільтрацією на сефакрилі-300 та іонообмінною хроматографією на MonoQ HR 5/5. Такий метод дозволив ефективно напрацювати білок GroEL у препаративних кількостях, який потім використовували для отримання анти-GroEL антитіл і синтезу афінної колонки. Показано імунологічний перехрест афінно очищених поліклональних анти-GroEL антитіл з білком родини Hsp60 у лізатах органів і клітин різних видів ссавців — від миші до людини, що дозволяє використовувати ці антитіла при вивченні змін рівня експресії і клітинної локалізації Hsp60 в разі аутоімунних і ракових патологій людини.

Ключові слова: GroEL, Hsp60, іонообмінна хроматографія, гель-фільтрація, поліклональні антитіла, аутоімунні патології людини.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Thomas P. J., Qu B. H., Pedersen P. L. Defective protein folding is a basis of human disease // *Trends Biochem. Sci.*—1995.—20.—P. 456—459.
2. Benjamin I. J., McMillan D. R. Stress (Heat shock) proteins. Molecular chaperons in cardiovascular biology and disease // *Circ. Res.*—1998.—83.—P. 117—132.

3. Hartl F. U. Molecular chaperons in cellular protein folding // *Nature.*—1994.—55.—P. 816—824.
4. Hubber M. M., Sievers R. E., Barbora V. Heat shock protein induction in rat hearts: a direct correlation between the amount of heat shock protein induced and the degree of myocardial protection // *Circulation.*—1994.—89.—P. 355—360.
5. Benjamin I. J., Jalil J. E., Tan I. B., Cho K., Weber K. T., Clark W. A. Isoproterenol-induced myocardial fibrosis in relation to myocyte necrosis // *Circ. Res.*—1989.—65.—P. 657—670.
6. Sreedhar A. S., Csermely P. Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy. A comprehensive review // *Pharmacology and Therapeutics.*—2004.—101.—P. 227—257.
7. Hendrick J. P., Hartl F. U. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins // *Annu. Rev. Biochem.*—1993.—62.—P. 349—384.
8. Ellis R. J., van der Vies S. M. Molecular chaperones // *Annu. Rev. Biochem.*—1991.—60.—P. 321—347.
9. Xu Q., Schett G., Seitz C. S., Hu Y., Gupta R. S., Wick G. Surface staining and cytotoxic activity of heat shock protein 60 antibody on stressed aortic endothelial cells // *Circulation Res.*—1994.—75.—P. 1078—1085.
10. Kaur I., Voss S. D., Gupta R. S., Schell K., Fisch P., Sondel P. M. Human peripheral T cells recognize HSP60 molecules on Daudi Burkitt's lymphoma cells // *J. Immunol.*—1993.—150.—P. 2046—2055.
11. Soltys B. J., Gupta R. S. Cell surface localization of the 60 kDa heat shock chaperonin protein (Hsp60) in mammalian cells // *Cell Biol. Int.*—1997.—21.—P. 315—320.
12. Belles C., Kuhl A., Nosheny R., Carding S. R. Plasma membrane expression of heat shock protein 60 *in vivo* in response to infection // *Infect. Immunol.*—1999.—67.—P. 4191—4200.
13. Sarto C., Binz P., Mocarelli P. Heat shock protein in human cancer // *Electrophoresis.*—2001.—21.—P. 1218—1226.
14. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование.—М.: Мир, 1984.—480 с.
15. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4 // *Nature.*—1970.—227.—P. 680—685.
16. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for quantities of utilizing the principle of protein binding // *Anal. Biochem.*—1976.—86.—P. 193—200.
17. Sidorik L. L., Gudžera O. I., Dragovoz V. A., Tukalo M. A., Beresten S. F. Immunochemical non-cross-reactivity between eukaryotic and prokaryotic seryl-tRNA synthetases // *FEBS Lett.*—1991.—292.—P. 76—78.
18. Matsiota P., Druet P., Dosquent P., Guilbert B., Avrames P. Natural autoantibodies at systemic lupus erythrematosus // *Clin. Exp. Immunol.*—1987.—69.—P. 79—88.
19. Avrames S., Termynck T. Monoclonal IgG and autoantibodies obtained after polyclonal activation, show reactivities similar to those of polyclonal natural autoantibodies // *Mol. Immunol.*—1993.—30.—P. 119—127.
20. Favorova O. O., Zargarova T. A., Rukosuyev V. S., Beresten S. F., Kisselev L. L. Molecular and cellular studies of tryptophanyl-tRNA synthetases using monoclonal antibodies // *Eur. J. Biochem.*—1989.—184.—P. 583—588.

УДК 577.21

Надійшла до редакції 29.04.05