

Очистка внутриклеточного рекомбинантного пролактина человека, синтезированного в клетках насекомых с помощью бакуловирусного вектора

Л. И. Строковская, Р. А. Мелешко, И. М. Кихно, А. П. Соломко

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

*Гормон пролактин человека (PRL) экспрессирован в клетках культуры насекомых, инфицированных бакуловирусами, содержащими кДНК гена PRL под контролем промотора гена полиэдрина вируса ядерного полиэдроза *Autographa californica*. Пролактин экспрессирован как 6 × His-связанный белок и очищен при помощи Co^{2+} -аффинной хроматографии. Выход чистого белка составлял от 2 до 50 мг на 1 л культуральной среды в зависимости от вида клеток насекомых и условий их культивирования. Полученный рекомбинантный пролактин биологически активен в системе тестирования *in vitro*.*

Введение. В течение последних 15 лет весьма успешным оказалось использование клеток насекомых и рекомбинантных бакуловирусов для производства лекарственных белков и белков для клинической диагностики. В большинстве случаев экспрессированные в бакуловирусных системах рекомбинантные белки процессированы, модифицированы и максимально соответствуют как структурно, так и функционально своим природным аналогам. Пролактин (PRL) — полипептидный гормон, представляющий собой единственную полипептидную цепь с тремя внутримолекулярными дисульфидными мостиками с молекулярной массой 23 кДа. В результате посттрансляционных модификаций гормон может фосфорилироваться, гликозилироваться, амидироваться, образовывать димеры и более сложные структуры. PRL относится к группе, состоящей из трех эволюционно связанных гормонов, — пролактина, гормона роста и лактогенного гормона, произошедших от общего гена-предшественника. В организме человека PRL регулирует множество физиологических функций. Основные функции, в регуляции которых участвует пролактин, — это стимулирование и поддержание лактации, а также участие в процессе репродукции.

Изменение уровня PRL (гипер- или гипопролактинемия) связано с нарушением многих функций гипофиза. Поэтому на сегодняшний день определение уровня PRL является базисом в диагностике ряда заболеваний. В связи с этим существует значительная потребность в высокоочищенном человеческом PRL для создания диагностических наборов.

Ранее нами показана экспрессия рекомбинантного PRL человека при заражении различных клеточных линий насекомых рекомбинантными бакуловирусами, содержащими кДНК гена пролактина [1–3].

Целью данной работы было получение и очистка биологически активного рекомбинантного пролактина человека. кДНК гена PRL с гекса-His последовательностью на N-конце была встроена в геном вируса ядерного полиэдроза (ВЯП) под контроль промотора гена полиэдрина, обеспечивающего высокие уровни экспрессии рекомбинантного белка. Очистку рекомбинантного PRL осуществляли с применением Co^{2+} -аффинной хроматографии, которой предшествовала солюбилизация белка из агрегатов путем денатурации с последующей ренатурацией. Использовано несколько методов денатурации и восстановления нативной конформации PRL в поисках оптимального, обеспечивающего максимальную активность ренатурированного бел-

ка. В работе также исследованы условия культивирования клеток и выбраны оптимальные, при которых обеспечивается наиболее высокий выход рекомбинантного PRL.

Материалы и методы. Клетки. Использованы монослойные культуры клеток насекомых Sf21 (*Spodoptera frugiperda*) и HF (*Trichoplusia ni*), выращенные на среде TC100 с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки. Клетки HF выращивали также в суспензии на бессывороточной среде Express Five SFM при 100 об/мин. Клетки насекомых и среды для их культивирования получены от фирмы «Invitrogen» (США). Также использована монослойная культура клеток *Antheraea pernyi* (Ap) [1, 3].

Для трансформации использовали клетки *Escherichia coli* DH5 и DH10 Bac («Gibco», США). Рестриктазы, лигаза и Taq-полимераза получены от MBI («Fermentas», Литва).

Получение рекомбинантной плазмиды pFast-HisPRL и рекомбинантного вируса AcHisPRL. В работе применена экспрессионная система Bac-to-Bac («Gibco»). Исследования выполняли в соответствии с протоколами фирмы и как описано ранее [2, 3].

Для создания рекомбинантной плазмиды кДНК гена пролактина вырезали из плазмиды pFastPRL [3] по сайтам *BamHI* и *KpnI*. После разделения в агарозном геле фрагмент вырезали и очищали на колонках с целлюлозно-ацетатными фильтрами Spin-X («Costar», США) и лигировали с плазмидой pFastHTa, обработанной этими же рестриктазами. Полученная рекомбинантная плазида pFastHisPRL содержит кДНК гена пролактина с областью 6 × His на N-конце, ген находится под контролем промотора гена полиэдрина ВЯП *Autographa californica* (Ac). Эта плазида была использована в качестве транспортного вектора для получения рекомбинантного бакуловируса AcHisPRL.

Инфицирование культур клеток насекомых. Вирус AcHisPRL амплифицировали в клетках Sf21 и титр его составлял $(5-7) \cdot 10^7$ БОЕ/мл. Монослойные культуры клеток Sf21, HF и Ap инфицировали вирусом с множественностью 5—10 БОЕ на клетку. Через 72 ч после заражения клетки собирали, отмывали 3 раза 1 × PBS и хранили при температуре -20 °С. Клетки HF при суспензионном культивировании инфицировали рекомбинантным вирусом с множественностью 1 БОЕ на клетку. Через 72 ч клетки собирали центрифугированием и хранили при $t = -20$ °С.

Фракционирование растворимых и нерастворимых клеточных белков. Инфицированные клетки ($1 \cdot 10^7$) суспендировали в 1 мл буфера А (20 мМ

трис-НСl, 100 мМ NaCl, 5 мМ β-меркаптоэтанол, 1 мкг/мл лейпептина, рН 8,0) («Sigma», США). Клетки разрушали трехкратным быстрым замораживанием (жидкий азот) и оттаиванием (37 °С). Затем центрифугировали в течение 15 мин при 14000 об/мин и 4 °С. Супернатант применяли для очистки растворимого пролактина нижеописанным методом 1. Осадок использовали для солюбилизации и очистки PRL из агрегатов по приведенным ниже методам 2 и 3.

Метод 1. К супернатанту, полученному, как описано выше, прибавляли 100 мкл суспензии Co^{2+} -агарозы Talon («Clontech», США), предварительно промытой буфером А и инкубировали при покачивании в течение 1 ч на холоду. Конечный осадок смолы, содержащий связанный HisPRL, промывали 3 раза буфером А. Пролактин экстрагировали буфером Б, содержащим 200 мМ имидазол, 20 мМ трис-НСl, 100 мМ NaCl, рН 8,0 (3 раза по 100 мкл при 4 °С). Аликвоты фракций анализировали в 12 %-м ПААГ. Для получения пролактина из осадка разрушенных клеток использованы два метода, в основе которых лежат недавно опубликованные методические подходы [4].

Метод 2. Очистка пролактина в денатурирующих условиях с последующей ренатурацией. Осадок разрушенных клеток суспендировали в 2 мл денатурирующего буфера В (6 М гуанидинхлорид, 20 мМ Na-фосфат, 300 мМ NaCl, рН 8,0) до однородной суспензии, затем пропускали четыре раза через иглу № 18. Далее смесь центрифугировали при 14000 об/мин в течение 15 мин. Осадок отбрасывали, а к супернатанту прибавляли 100 мкл смолы Talon, предварительно промытой буфером В. Инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре и постоянном покачивании. Затем смолу 3 раза промывали буфером Г (8 М мочевины, 20 мМ Na-фосфат, 300 мМ NaCl, рН 8,0). Пролактин элюировали буфером Д (8 М мочевины, 20 мМ Na-фосфат, 300 мМ NaCl, рН 4,5) и собирали 4—6 фракций по 100 мкл. После анализа в ПААГ фракции, содержащие пролактин, объединяли и диализовали против буфера А при постепенном увеличении его количества от 10 до 100 объемов (по отношению к объему диализуемого белка) в течение 48 ч.

Метод 3. Денатурация пролактина с последующей ренатурацией и очисткой на колонке в неденатурирующих условиях. Клеточный осадок суспендировали в 2 мл денатурирующего буфера Е (4,5 М мочевины, 20 мМ трис, 100 мМ NaCl, 5 мМ β-меркаптоэтанол, рН 11,0) и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре и постоянном покачивании для солюбилизации пролакти-

на. После центрифугирования при 14000 об/мин на холоду осадок отбрасывали, а супернатант инкубировали в течение ночи при 4 °С и постоянном покачивании для окисления пролактина. Затем к пробе по каплям в течение 1 ч добавляли равный объем буфера А и проводили диализ в течение 24 ч против 1 л буфера со сменой буфера через 12 ч. Конечный объем раствора белка после диализа составлял 4—5 мл. Связывание HisPRL со смолой Co²⁺ Talon и экстракцию с имидазолом проводили, как описано выше. После анализа в ПААГ фракции, содержащие пролактин, диализовали против 1 л буфера А в течение 24 ч со сменой буфера через 12 ч.

Разделение белков в ПААГ и иммунодетекция. Разделение белков проводили в 12 %-м ПААГ, как описано ранее [3]. Для иммунодетекции белки с геля переносили на мембрану Immobilon P («Millyproge», США), затем мембрану отмывали и обрабатывали первичными кроличьими антипролактин-антителами по методу [3] и далее мембрану инкубировали в течение 1 ч со вторичными антителами щелочной фосфатазы, конъюгированными с антикроличьими IgG («Sigma») в разведении 1:10000. После отмывки фильтр уравнивали в буфере AP, содержащем 100 мМ трис, 100 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂, pH 9,5, и окрашивали в смеси нитротетразолиевого голубого (NBT) и 5-бром-4-хлор-индолфосфата (BCIP) («Sigma»).

Концентрацию белка в пробах определяли по Бредфорду [5] с использованием красителя «Dye Reagent» фирмы «Bio-Rad» (США).

Определение активности пролактина. Биологическую активность PRL определяли в пролиферативном тесте с использованием пролактин-зависимых Nb2 клеток лимфомы крыс [6, 7]. Клетки Nb2 культивировали в суспензии в среде Фишера с 10 % эмбриональной телячьей сыворотки и 10 % лошадиной сыворотки. Количество клеток, определяемое колориметрически, увеличивалось в зависимости от добавляемого к среде пролактина. Уровень пролактина регистрировали на автоматическом анализаторе Axum («Abbot Laboratory», США), используя иммуноферментную технологию.

Результаты и обсуждение. Для синтеза рекомбинантного пролактина человека мы выбрали бакуловирусную экспрессионную систему Vac-to-Vac. Помимо того, что данная система облегчает получение рекомбинантных бакуловирусов, наличие челночных векторных плазмид с областью 6 × His tag позволяет экспрессировать белки, которые довольно легко можно очистить с применением металллоафинной хроматографии.

В предыдущих работах нами показано, что

рекомбинантный пролактин синтезируется в клетках Sf21, HF и Ar. В данной работе эти клетки использованы для наработки и очистки 6 × His-содержащего рекомбинантного PRL.

При заражении клеток насекомых рекомбинантным бакуловирусом *AcHisPRL* уже через 48 ч под микроскопом в клетках Sf21 и HF обнаруживали включения, количество которых возрастало к 96—120 ч (рис. 1). Такие включения отсутствовали в здоровых клетках, зараженных диким бакмидным вирусом, и практически не обнаруживались в клетках Ar. При анализе белков из зараженных рекомбинантным вирусом клеток Sf9 и HF в ПААГ и сравнении их с паттерном белков из здоровых и инфицированных диким бакмидным вирусом была обнаружена суперэкспрессия белка размером 28—29 кДа (на рис. 2 представлен электрофоретический профиль белков инфицированных клеток Hf). Эта величина соответствует молекулярной массе PRL с добавочными 26 аминокислотными остатками, привнесенными из векторной конструкции *pFastHTa* (область 6 × His tag и сайт расщепления энтерокиназой). Результаты иммуноблотинга подтвердили, что этот белок является пролактином.

Наличие гранул дало основание предположить, что в клетках насекомых, так же как и в клетках *E. coli* [8, 9], рекомбинантный пролактин синтезируется и накапливается в агрегированном состоянии в виде телец включений, что могло затруднить получение и очистку этого белка. Попытка получить нативный PRL из растворимой фракции белков клеток Sf21 и HF, используя очистку по методу 1 (см. «Материалы и методы»), оказалась безуспешной. И только в случае использования инфицированных клеток Ar удалось очистить пролактин из растворимой фракции клеточных белков в очень незначительных количествах — примерно 500 мкг на 1 л среды.

В клетках Ar ВЯП Ac реплицируется с низкой эффективностью, очевидно, с этим связан и низкий уровень пролактина, экспрессированного рекомбинантным вирусом в данных клетках. Возможно, что именно благодаря низкой концентрации пролактина в клетках Ar не весь рекомбинантный белок аккумулируется в гранулах и его удается очистить в неденатурирующих условиях. Однако количество растворимого PRL в клетках Ar так мало, что для практических целей использование этой линии клеток представляется нецелесообразным.

Поскольку основная масса PRL во всех трех исследуемых линиях клеток сосредоточена в гранулах, очистке его должна была предшествовать стадия солиubilизации из гранул, ведущая к потере белком нативной структуры. Как известно, молеку-

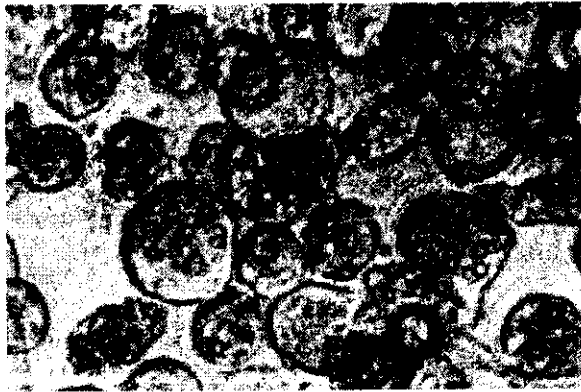


Рис. 1. Клетки HF, инфицированные рекомбинантным бакуловиром *AcHisPRL* (96 ч после заражения); $\times 300$

ла пролактина человека имеет три дисульфидных S-S-мостика [10], которые при денатурации восстанавливаются до SH-групп. Подбор условий ренатурации является ключевым фактором для правильного образования S-S-мостиков, восстановления нативной конформации молекулы и, как следствие, восстановления биологической активности ренатурированного белка.

Обычно пролактин из гранул получают при жестких денатурирующих воздействиях — обработкой 8 М мочевиной или 6 М гуанидинхлоридом [8, 9]. Мы также применяли эти реагенты для выделения пролактина из инфицированных клеток насекомых. На рис. 3 представлены результаты получения HisPRL из клеток HF при использовании жестких денатурирующих условий и последующей очистки на смоле Talon. Фракции очищенного денатурированного PRL объединяли и диализовали в течение 48 ч против постепенно увеличивающегося количества буфера для правильной ренатурации пролактина [4]. После диализа измеряли концентрацию пролактина и определяли его биологическую активность. Из клеток *Ar* пролактин был получен в количестве 1—3 мг/л среды, а из клеток HF при монослойном культивировании клеток количество HisPRL составляло 30—35 мг/л среды.

Для наработки и очистки пролактина использовали также клетки HF в суспензионном культивировании. Из таких инфицированных клеток удалось получить значительно большее количество пролактина — ~50—60 мг/л среды (рис. 3). Следует отметить, что при суспензионном культивировании клеток HF плотность инфицированных клеток в среде примерно в 2 раза выше, чем при монослойном. Возможно, вследствие этого в одном и том же объеме среды синтезируется большее количество пролактина.

Полученный рекомбинантный белок был биологически активен. Согласно результатам пролиферативного теста, количество рекомбинантного пролактина, требуемого для удвоения количества Nb2 клеток, составляло 471 ± 21 пг и было достаточно близким к значению, полученному для человеческого пролактина из контрольного набора — 625 ± 49 пг.

Условия солюбилизации и ренатурации, описанные выше, могли оказаться не идеальными для данного белка и вести к частичной потере его биологической активности. Поэтому мы воспользовались недавно опубликованным способом очистки и ренатурации PRL (метод 3, см. «Материалы и методы»), позволившем авторам получить биологически активный пролактин человека из телец включений *E. coli* [4]. Выход HisPRL при использовании этого метода оказался несколько ниже (примерно 20 мг/л среды для монослойной культуры клеток HF), а его биологическая активность практически не отличалась от таковой HisPRL, полученного с использованием метода 2. Следовательно, метод 2 представляется более перспективным для очистки рекомбинантного PRL, так как позволяет получать большие количества биологически активного продукта.

На рис. 4 представлены результаты иммуноблотинга препаратов рекомбинантного HisPRL, полученных различными методами.

Каждый из препаратов белка независимо от метода очистки демонстрировал наличие нескольких форм, количественное соотношение которых

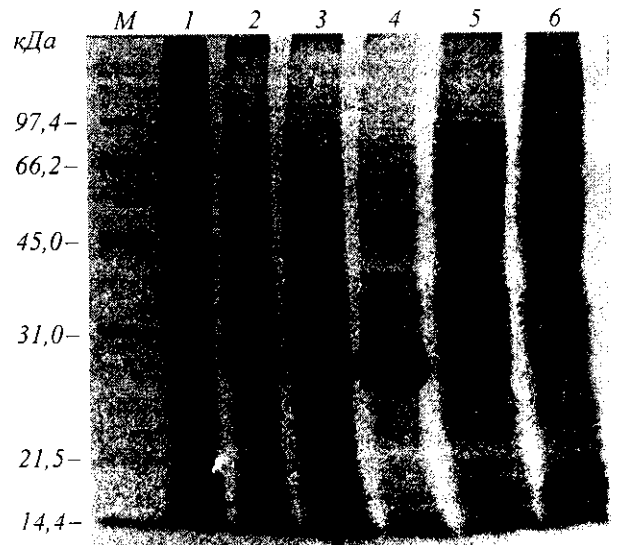


Рис. 2. Экспрессия рекомбинантного пролактина в клетках HF в разное время после инфекции: 1 — через 24 ч; 2 — 48 ч; 3 — 96 ч; 4 — 120 ч; 5 — клетки, инфицированные бакмидным вирусом; 6 — здоровые клетки; M — маркерные белки

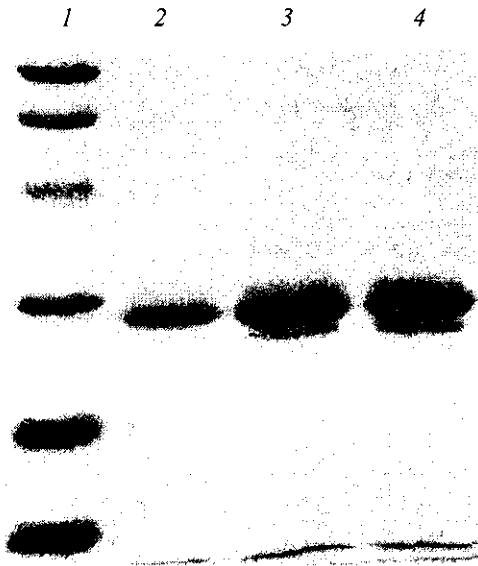


Рис. 3. Электрофоретический анализ в ПААГ окрашенного Кумасси рекомбинантного пролактина, очищенного из клеток: 2 — HF (суспензионная культура); 3 — HF (монослойная культура); 4 — Sf21; 1 — маркерные белки. Количество белка, внесенного в каждую лунку, соответствует очищенному из клеток, культивированных в 1 мл среды

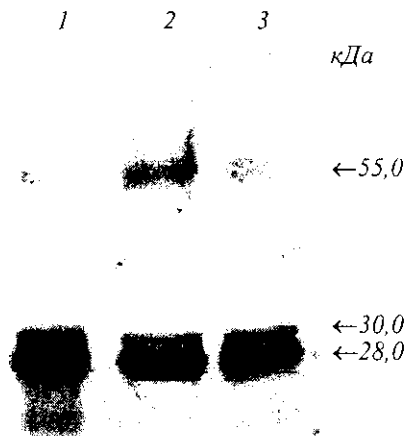


Рис. 4. Вестерн-блоттинг с последующей иммунодетекцией рекомбинантного пролактина, очищенного из клеток: 1 — Ap; 2 — Sf21; 3 — HF

также было одинаковым для всех. Кроме основного белка размером 28 кДа, доля которого составляет около 95 %, были обнаружены два белка с большей молекулярной массой — 30 и 55 кДа, взаимодействующих с антителами к пролактину. Наличие пролактинов разных размером — явление не исключительное. Известно, что пролактины, полученные из различных источников, в результате посттрансляционных модификаций могут образовывать формы разных размеров [10, 13]. Мы предположили, что 30 кДа-белок является гликозилированной формой

HisPRL, так как известно, что гликозилирование приводит к увеличению размера пролактина примерно на 2 кДа [11, 12]. При изучении амидирования пролактина также наблюдали гетерогенность форм по размеру [16, 17]. Белок размером 55 кДа может быть димером пролактина. При экспрессии в бакуловирусной системе рекомбинантные белки проходят упомянутые виды посттрансляционных модификаций, поэтому обнаруженная нами гетерогенность иммунореактивных форм пролактина может быть следствием этих процессов, что требует дальнейших исследований.

Таким образом, использование бакуловирусной экспрессионной системы позволило нам получить и очистить биологически активный в системе *in vitro* рекомбинантный пролактин человека. Выход очищенного пролактина составлял от 2 до 50 мг из 1 л среды и зависел от того, клетки какой линии использовали для наработки, от метода культивирования клеток и способа очистки пролактина. Самый высокий выход белка наблюдался в клетках HF при их суспензионном культивировании. Следует отметить, что культивирование клеток HF в суспензии помимо того, что дает более высокую продукцию белка, является менее трудоемким и более дешевым методом. Это является немаловажным условием для практического использования. Фактором повышения количественных показателей очищенного продукта является также выбор метода очистки. Сравнение двух методов позволило сделать вывод о том, что очистка PRL в денатурирующих условиях с последующей ренатурацией является более перспективной в сравнении с методом, основанным на очистке ренатурированного белка.

L. I. Strokovskaya, R. A. Meleshko, I. M. Kikhno, A. P. Solomko

Purification of intracellular recombinant human prolactin synthesized in insect cells

Summary

Human prolactin (PRL) was expressed in the insect cell culture infected with *Autographa californica* (Ac) nuclear polyhedrosis virus (NPV) which contained prolactin cDNA under the control of polyhedrin gene promoter. Prolactin was expressed as 6 × His-tagged protein and was purified using Co^{2+} -affinity chromatography. The yield of purified protein reached 5 to 50 mg/l depending on the type of insect cells and circumstances of their cultivation. The recombinant prolactin obtained was biologically active.

Л. І. Строчковська, Р. А. Мелешко, І. М. Кіхно, О. П. Соломко

Очищення внутрішньоклітинного рекомбінантного пролактину людини, синтезованого в клітинах комах

Резюме

Гормон пролактин людини (PRL) експресовано в клітинах культури комах, інфікованих бакуловірусами, що містять

кДНК гена PRL під контролем промотору гена поліедрину вірусу ядерного поліедрозу *Autographa californica*. Пролактин експресовано як 6 × His-зв'язаний білок і очищено за допомогою Co^{2+} -афінної хроматографії. Вихід чистого білка складав від 2 до 50 мг на 1 л культурального середовища залежно від виду клітин комах і умов їхнього культивування. Одержаний рекомбінантний PRL біологічно активний у системі тестування *in vitro*.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Строчковская Л. И., Калинина Н. О., Кихно И. М., Соломко А. П. Экспрессия рекомбинантного человеческого гена пролактина в клетках насекомых с использованием бакуловирусного вектора на основе вируса ядерного полиедроза кольчатого шелкопряда // Докл. АН Украины.—1997.—№ 1.—С. 166—169.
2. Строчковская Л. И., Мелешко Р. А., Кихно И. М., Соломко А. П. Сравнительное исследование эффективности экспрессии рекомбинантного пролактина человека в двух бакуловирусных системах. Биополимеры и клетка.—2002.—18, № 1.—С. 1—6.
3. Strokovskaya L., Bartoszewicz Z., Szolajska E., Kikhno I., Solomko A., Michalik J. Expression and one-step purification of intracellular human prolactin in insect cells // Protein Exp. and Purif.—2001.—22.—P. 242—248.
4. Peterson F. S., Anderson P. J., Berliner L. J., Brooks C. L. Expression, folding, and characterization of small proteins with increasing disulfide complexity by pT7-derived phagemid // Protein Exp. and Purif.—1999.—15.—P. 16—23.
5. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem.—1976.—72.—P. 248—254.
6. Gout P. W., Beer C. T., Noble R. L. Prolactin-stimulated growth of cell cultures established from malignant Nb rat lymphomas // Cancer Res.—1980.—40.—P. 2433—2436.
7. Gout P. W. Transient requirements for prolactin as a growth initiator following treatment of autonomous Nb2 node rat lymphoma cell cultures with butyrate // Cancer Res.—1987.—47.—P. 1751—1755.
8. Paris N., Renier-Delrue F., Rerliner L. J., Brooks C. L. Bacterial Production and purification of recombinant human prolactin // Biotechnol. Appl. Biochem.—1990.—21.—P. 436—449.
9. Gilbert M. S., Lowry P. J., Castro M. J., Woods R. J., Saavva D. Expression and partial purification of human prolactin in *Escherichia coli* // Int. J. Biochem.—1991.—23.—P. 107—114.
10. Bole-Feysot C., Goffin V., Edery M., Binart N., Kelly P. Prolactin (PRL) and its receptors: actions, signals transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice // Endocrinol. Rev.—1998.—19.—P. 225—268.
11. Sinha Y. N. Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance // Endocrinol. Rev.—1995.—16.—P. 354—369.
12. Lewis U. J., Singh R. N. P., Sinha Y. N., Vanderlaan W. P. Glycosylated human prolactin // Endocrinology.—1985.—116.—P. 359—363.
13. Smith C. R., Norman M. R. Prolactin and growth hormone: molecular heterogeneity and measurement in serum // Ann. Clin. Biochem.—1990.—27.—P. 542—550.
14. Andries M., Tilemans D., Deneef C. Isolation of cleaved prolactin variants that stimulate DNA synthesis in specific cell types in rat pituitary cell aggregates in culture // Biochem. J.—1992.—281.—P. 393—400.
15. Clapp C., Sears P. S., Hussel D. H., Richards J., Levay-Young B. K., Nicoll C. S. Biological and immunological characterization of cleaved and 16K forms of rat prolactin // Endocrinology.—1988.—122.—P. 2892—2898.

УДК 577.112

Надійшла до редакції 05.05.03