

## ЭКСПРЕССИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО АКТИНА 5С ИЗ ДРОЗОФИЛЫ В МЕТИЛОТРОФНЫХ ДРОЖЖАХ *PICHLIA PASTORIS*

© О. В. Невзглядова,<sup>1</sup> А. В. Артемов,<sup>1</sup> В. В. Зенин,<sup>1</sup> В. В. Верхуша,<sup>2</sup> М. М. Шавловский,<sup>3</sup>  
О. И. Поварова,<sup>1</sup> Олеся В. Степаненко,<sup>1</sup> И. М. Кузнецова,<sup>1</sup> К. К. Туроверов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, <sup>2</sup> Центр молекулярной медицины,  
Московский государственный университет и

<sup>3</sup> Институт экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург;

<sup>1</sup> электронный адрес: kkt@mail.cytspb.rssi.ru

Разработана система экспрессии чужеродного гена актина в клетках дрожжей *Pichia pastoris*. В качестве целевого белка использовали цитоплазматический актин 5С дрозифилы, на 90 % гомологичный β-актину высших эукариот. Для отработки условий биосинтеза целевого белка в дрожжевых клетках и методики очистки рекомбинантного актина в настоящей работе экспрессирован и очищен белок слияния GFP-актин, содержащий в качестве репортерной части зеленый флуоресцентный белок GFP. Охарактеризованы размеры и выживаемость клеток *P. pastoris*, продуцирующих рекомбинантный белок. Показано, что размер и форма клеток могут зависеть от накопления в них рекомбинантного актина. Очищенный белок слияния был использован при получении поликлональных антител, необходимых для тестирования рекомбинантного актина.

Ключевые слова: рекомбинантный актин, зеленый флуоресцентный белок, белок слияния GFP-актин, *Pichia pastoris*, актиновый цитоскелет.

Актин является одним из основных белков системы мышечного сокращения и цитоскелета неммышечных клеток эукариот (Левицкий и др., 1995; Sheterline et al., 1998; Pollard et al., 2000). При низкой ионной силе актин в растворе является мономером (G-актин). В присутствии нейтральных солей актин полимеризуется с образованием фибриллярного F-актина).

Пространственная структура актина была определена для его комплексов с белками, препятствующими полимеризации: ДНКазой I (Kabsch et al., 1990), гельзолином (McLaughlin et al., 1993; Robinson et al., 1999) и профилином (Schutt et al., 1993), а также для не связанного с другими белками АДФ-актина, модифицированного тетраметил-родамин-5-малеимидом (Otterbein et al., 2001). Глобула G-актина (42 кДа) сформирована одной полипептидной цепью из 375 аминокислотных остатков, образующей два домена, каждый из которых состоит из двух субдоменов. В состав макромолекулы входят нуклеотид (АТФ или АДФ) и прочно связанный двухвалентный катион Mg<sup>2+</sup>. При исследовании актина *in vitro* ион Mg<sup>2+</sup> обычно замещен на ион Ca<sup>2+</sup>. Нуклеотид и двухвалентный катион локализованы в щели между доменами. Актин является высококонсервативным белком, так что гомология между α-изоформой актина из скелетных мышц и цитоплазматическим β-актином из высших эукариот составляет более 90 % (Vandekerckhove, Weber, 1978).

В тонких филаментах мышечной ткани актин присутствует в фибриллярной форме. Хотя при физиологических условиях актин полимеризуется, в цитоплазме

эукариот он может находиться как в фибриллярной, так и в мономерной формах. Процессы полимеризации—деполимеризации актина в клетке определяются его взаимодействием с минорными регуляторными белками (Pollard et al., 1994, 2000). Ввиду исключительной роли актина в генерации движения как в мышечных, так и в неммышечных клетках изучение процессов его полимеризации и взаимодействия с регуляторными белками является предметом интенсивных исследований (Левицкий и др., 1995; Sheterline et al., 1998; Pollard et al., 2000). Большое внимание уделяется также исследованию структуры, динамики и структурных превращений этого белка, изучению его спектральных свойств, а также проблеме его фолдинга (Bertazzon et al., 1990; Le Bihan and Gicquaud, 1993; Kuznetsova et al., 1999a, 1999b, 1999c; Turouverov et al., 1999, 2002; Shuller et al., 2000). Мощным инструментом при проведении такого рода исследований, очевидно, может являться получение мутантных рекомбинантных форм этого белка с точечными аминокислотными заменами (Schuler et al., 2000; Doyle et al., 2001).

Целью настоящего исследования стала разработка высокоэффективной системы экспрессии актина на базе дрожжей *Pichia pastoris*. В качестве целевого белка был выбран цитоплазматический актин 5С дрозифилы, на 90 % гомологичный β-актину высших эукариот, ген которого клонирован и легко может быть использован в различных генноинженерных конструкциях (Fyrberg et al., 1981; Verkhusha et al., 1999). Для отработки условий биосинтеза целевого белка в дрожжевых клетках и методики очистки рекомбинантного актина в настоящей ра-

боте экспрессирован и очищен белок слияния GFP-актин, содержащий в качестве репортерной части зеленый флуоресцентный белок GFP, впервые выделенный из медузы *Aequorea victoria*, в последние годы все чаще используется для визуализации экспрессии и поведения белков в живых клетках и тканях (Prasher et al., 1992; Chalfie et al., 1994; Ludin, Matus, 1998).

### Материал и методика

Создание плазмиды. Плазмида рPIC3-GFP-актина 5С была создана следующим образом. Плазмиду рRmHa-3 (Bunch et al., 1988) гидролизировали с использованием рестриктаз EcoRI и KpnI, после чего клонировали в ней лишённую стоп-кодона, амплифицированную методом PCR кДНК гена GFP. В результате была получена плазмида рRmHa-3-GFP. Чтобы включить в нее ген актина дрозофилы, KpnI-VamHI-фрагмент, кодирующий актин 5С с дополнительными 15 нуклеотидами в начале последовательности, амплифицировали и клонировали в конце GFP-гена. В результате проклонированной оказалась нуклеотидная последовательность, кодирующая белок слияния GFP-Gly-Thr-Ala-Ser-Ala-актин 5С. На последнем этапе фрагмент VamHI-EcoRI (1.9 т. п. н.), содержащий GFP-актин 5С, амплифицировали и вводили в вектор экспрессии для *P. pastoris* (рPIC 3), что позволило получить плазмиду рPIC-3-GFP-актин 5С.

Трансформация и селекция. Штамм *P. pastoris* GS115, мутантный по гену *HIS4*, был трансформирован плазмидами рPIC-3-актин 5С и рPIC-3-GFP-актин 5С, линейризованными рестриктазой *StuI* (10—20 мкг на пробу) в области *HIS4*. Трансформацию проводили с помощью хлорида лития по методике, описанной для *Saccharomyces cerevisiae* (Ito et al., 1983). В качестве «хелперной» ДНК использовали денатурированную фрагментированную ДНК спермы лосося (25 мкл на пробу) в концентрации 2 мг/мл.

Трансформанты ( $\text{His}^+$ ) были отобраны на безгистидиновой среде. Клоны, несущие рPIC3-GFP-актин 5С, были протестированы цитологически по зеленому свечению зеленого флуоресцентного белка, а также иммунохимически при помощи антител к GFP. Для достижения суперэкспрессии несколько клонов-трансформантов культивировали до лог-фазы в буферной среде с глицерином, а затем переводили на метанольную среду, что вызывало индукцию синтеза белка слияния. Приготовление сред для культивирования *P. pastoris*, трансформацию и индукцию клонированного белка осуществляли согласно руководству фирмы Invitrogen (США). Для поддержания индукции метанол добавляли каждые 24 ч в течение 3 сут культивирования. Для микрофлуориметрического анализа клетки отбирали из среды на 1, 2 и 3-и сут роста.

Флуоресцентная микроскопия. Клетки *P. pastoris*, экспрессирующие GFP-актин 5С, исследовали с помощью флуоресцентного микроскопа Axioskop (С. Zeiss, Германия). Изображения клеток были получены с помощью камеры VarioCam (PCO), проанализированы с помощью программы Quantum Image и обработаны с использованием программы Adobe Photoshop software.

О накоплении активных форм кислорода (АФК) в митохондриях судили по появлению свечения АФК-зависимого зонда — дигидрородамина 123.

Проточная цитофлуориметрия. Метод проточной цитофлуориметрии использовали для оценки флуоресценции GFP-актина и для сравнения профиля рассеяния трансформированных и исходных клеток *P. pastoris*. Анализ образцов проводили на проточном цитофлуориметре ACR1400 (Bruker, Германия) с ртутной лампой HBO100 в качестве источника возбуждающего света. Регистрировали три параметра — малоугловое рассеяние (FS), рассеяние под большими углами (SS) и флуоресценцию в зеленой области (525—560 нм). Флуоресценцию возбуждали в области 450—485 нм. Анализировали обычно более 10 000 клеток. Для количественного сравнения результатов разных экспериментов чувствительность каждого измеряемого параметра приводили к единому масштабу, добавляя к образцам калибровочные флуоресцентные шарики диаметром 1.98 мкм (Bruker, Германия). Для нормирования масштабов сигналы шариков выводили на определенное место на шкале соответствующего параметра путем изменения подаваемого на ФЭУ напряжения. Клетками, продуцирующими GFP-белок, считали те, величина флуоресценции которых превышала величину собственной флуоресценции контрольных клеток, не содержащих GFP-белка. Условную величину средней флуоресценции клеток определяли как сумму значений флуоресценции всех проанализированных флуоресцирующих клеток, деленную на число этих клеток.

Очистка белка. Через 72 ч после метанольной индукции клеточную массу разрушали перемешиванием в присутствии стеклянных шариков (425—600 мкм, Sigma, США) в буфере А (2 мМ Tris-HCl, 0.2 мМ АТФ, 0.5 мМ 2-меркаптоэтанол, 0.2 мМ CaCl<sub>2</sub> и 0.005 % азида натрия, pH 8.5) в присутствии 1 мМ фенилметилсульфонилфторида, набора ингибиторов протеаз (в концентрации, рекомендованной Boehringer Mannheim, Германия) и ацетонового порошка мышечного актина кролика (0.03 г порошка на 1 г клеток). Затем материал центрифугировали в течение 10 мин при 10 000 g (центрифуга типа K-24, Janetzki). Супернатант хроматографировали на ДНКазе-I-Сефарозе. ДНКазе-I-Сефарозу после сорбции белков последовательно промывали исходным буфером А и буфером А, содержащим 10 % глицерина и 10 % формамида. Белок элюировали буфером А, содержащим 10 % глицерина и 40 % формамида. Поскольку 40%-ный формамид вызывает денатурацию актина, элюированный белок сразу же разводили в 5 раз буфером А (Karlsson, 1988).

Характеристика рекомбинантного белка. Степень очистки GFP-актин 5С определяли электрофоретически в присутствии и в отсутствие SDS (Laemmli, 1970). Вестерн-блот выполняли, как это описано в работе Верхуши с соавторами (Verkhusha et al., 1999). Нативность рекомбинантного актина и белка слияния GFP-актин 5С была также оценена по собственной флуоресценции триптофана и зеленого хромофора. Флуоресцентные измерения были выполнены на установке, описанной ранее (Туроверов и др., 1998). Триптофановую флуоресценцию и флуоресценцию зеленого хромофора GFP возбуждали при 297 и 480 нм соответственно. Интенсивность флуоресценции корректировали на чувствительность установки.

Получение поликлональных антител к белку слияния. Для дополнительной очистки белок слияния подвергали электрофорезу в полиакриламидном геле (ПААГ) без SDS и зоны, обладающие зеленой флуо-

ресценцией, вырезали. Содержащие целевой белок кусочки полиакриламидного геля растирали в гомогенизаторе с небольшим количеством физиологического раствора и добавляли полный или неполный адъювант Фрейнда. Полученной взвесью подкожно в области спины иммунизировали кроликов. Иммунизацию проводили 3 раза через 2 нед. Полный адъювант использовали только для первого этапа иммунизации. Забор крови производили через 10 сут после последней иммунизации. Кровь инкубировали в течение 2 ч при 37 °С. Сыворотку отделяли центрифугированием. Иммуноглобулины отделяли осаждением в 1.75 М сульфате аммония. После удаления соли белок лиофилизировали. Электрофорез в 7.5%-ном ПААГ с SDS и электроперенос на нитроцеллюлозные мембраны с иммунодетекцией осуществляли по общепринятой методике.

### Результаты и обсуждение

Как было показано (Frankel et al., 1990), рекомбинантный актин не может быть получен в бактериальной системе. Наши попытки получить рекомбинантный актин 5С и белок слияния GFP-актин 5С в бактериальной системе с помощью бактериальных векторов экспрессии также не дали положительных результатов. Белки оказались в нерастворимой фракции и накапливались в клетке в телах включения.

Поэтому было решено для получения актина и его аналогов использовать эукариотическую систему. Возможность такого получения, хотя и с низким уровнем выхода (40 мкг/л), была ранее показана для  $\beta$ -актина цыпленка с использованием *Saccharomyces cerevisiae* (Karlsson, 1988). В последующих работах этих авторов выход белка был увеличен в 40 раз. Это было достигнуто в основном благодаря более эффективной дезинтеграции клеток дрожжей и увеличению объема ДНКазы-I-сефарозной колонки (Aspenstrom et al., 1992). Мы решили использовать некоторые преимущества другого низшего эукариота — дрожжей *P. pastoris*. В *P. pastoris* особенности процессинга белка, его сворачивания и посттрансляционных модификаций (гликозилирование) приближаются к таковым высших эукариот. *P. pastoris* представляет собой метилотрофные дрожжи, которые способны эффективно утилизировать метанол в качестве единственного источника углерода.

Метаболизм метанола в дрожжевых клетках на первом этапе состоит в его окислении до формальдегида под

влиянием двух алкогольоксидаз AOX1 и AOX2, гомологичных друг другу на 97 %. Так как АОХ характеризуются низкой аффинностью в отношении кислорода, их высокая суммарная активность в клетках обеспечивается синтезом больших количеств ферментов. Усиленный синтез АОХ обусловлен тем, что метанол активирует сверхмощный промотор гена *АОХ*. Используемый нами дрожжевой вектор pPIC3, содержащий ген целевого белка актина, устроен таким образом, что этот ген находится под контролем промотора гена *АОХ1*. Поэтому активный ген активируется в присутствии метанола так же эффективно, как и собственный ген *АОХ1*.

Клетки *P. pastoris* трансформировали вектором pPIC3, содержащим помимо слитых генов GFP и целевого гена актина интактный ген гистидиндегидрогеназы (*HIS4*), который в используемом нами штамме GS115 инактивирован. Так как плазмида pPIC3 является интегративной, т. е. лишена дрожжевого ордигина репликации, His<sup>+</sup>-трансформанты могут быть получены только в результате рекомбинации между плазмидой и геномом *P. pastoris*. Линеаризация вектора в уникальном сайте, приходящемся на *HIS4*, стимулирует интеграцию плазмиды в ген *HIS4* хромосомы. Таким образом, отбирая His<sup>+</sup>-трансформанты на синтетической среде без гистидина, мы тем самым отбираем клетки, включившие в свой геном ген белка слияния GFP-актин 5С дрожжевые. Аналогичным образом были получены клоны *P. pastoris*, содержащие гены актина дикого типа дрожжевые и его мутантные аналоги.

Культивирование клонов-трансформантов в присутствии метанола в качестве единственного источника углерода стимулировало экспрессию гена белка слияния GFP-актин 5С, при этом флуоресценция GFP позволяет визуализировать синтез актина и тем самым контролировать его индукцию.

Было обнаружено, что форма светящихся структур в клетках *P. pastoris* изменяется в зависимости от стадии роста культуры (рис. 1). На начальной стадии интенсивного клеточного деления (экспоненциальная фаза роста) в дрожжевых клетках видны формирующиеся актиновые бляшки, которые не всегда попадают в почки. На более поздних стадиях роста культуры четко выявляются светящиеся тяжи и крестообразные структуры. Такие структуры характерны для актинового цитоскелета в состоянии, когда актин полимеризован и собран в микрофиламенты.

Представляется вероятным, что в течение 1-х сут индукции уровень экспрессии GFP-актина еще низок. Особенно это относится к почкам, так как на этом этапе роста культуры скорость почкования обгоняет скорость накопления GFP-актина. При этом GFP-актин неравномерно распределяется между материнской и дочерней клетками, оставаясь преимущественно в более старой — материнской (рис. 1, а). Однако по истечении 1-х сут роста культуры на метаноле в ней происходит стремительное накопление клеток, в которых синтез GFP-актина достигает пороговой величины, т. е. уровня экспрессии, достаточного для визуализации других типичных структурных компонентов актинового цитоскелета (рис. 1, б). При этом чем старше культура, тем виднее становятся пересекающиеся и ветвящиеся фибриллярные структуры.

Возможность наблюдения по свечению GFP структур, характерных для цитоскелета в конденсированном состоянии, свидетельст-

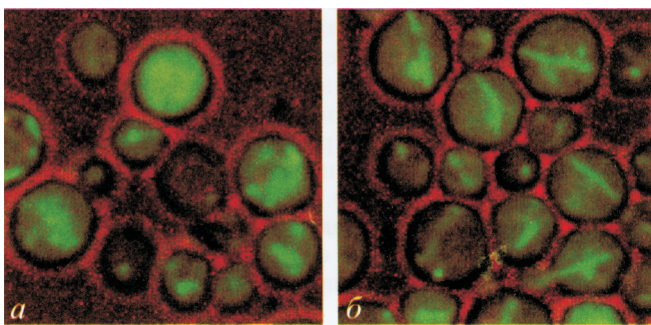


Рис. 1. Экспрессия актина в клетках дрожжей *Pichia pastoris*. Представлены актиновые структуры в клетках *P. pastoris* через 1 (а) и 2—3 (б) сут, культивируемых на среде, содержащей метанол.

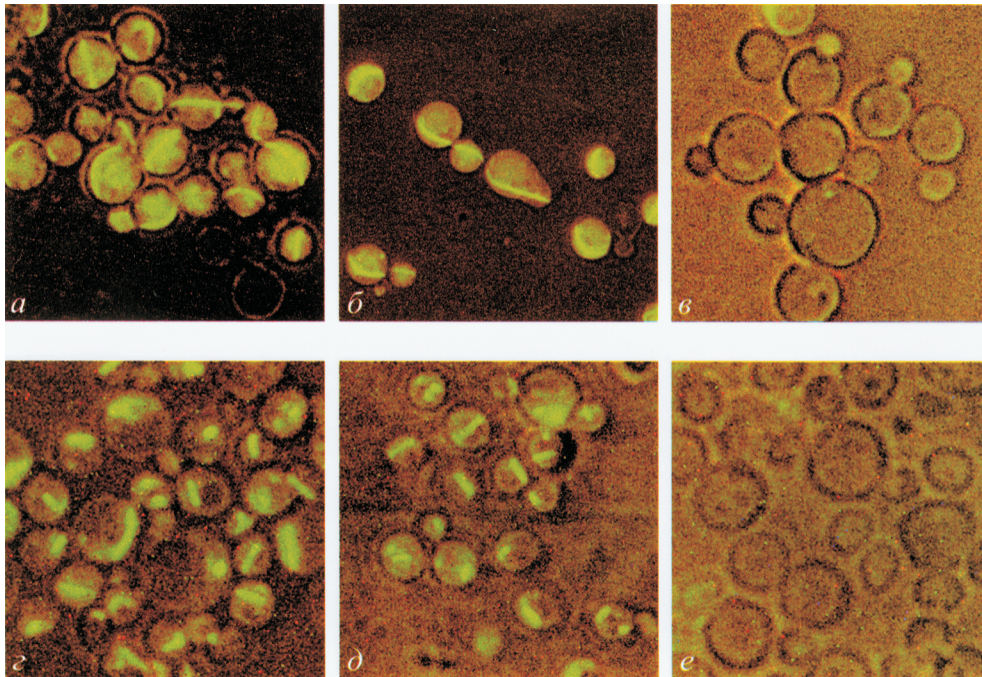


Рис. 2. Экспрессия GFP-актина в трансформированных клетках *Pichia pastoris*, выращенных на метаноле (а–в) и глицерине (г–е). Представлены исходный штамм *P. pastoris* (в, е) и трансформанты tr30 (а, г) и tr2 (б, д).

вует о том, что чужеродный актин дрозофилы в составе белка слияния GFP-актин сополимеризуется с дрожжевым актином *in vivo* и, таким образом, является функционально активным.

Ранее было показано, что наличие мономерных структур актина (бляшек) жизненно важно, в то время как мутация *tmpl*, приводящая к отсутствию прослеживаемых актиновых тяжей или фибрилл, не является летальной (Karova et al., 1998). Так как мутантов, у которых тяжи могли бы существовать в отсутствие бляшек, найти не удалось, авторы предположили, что бляшки требуются для сборки тяжей. В трансформантах *S. cerevisiae*, содержащих белок слияния GFP-актин, наблюдали только мономерный светящийся актин, а видимых тяжей обнаружено не было (Doyle, Botstein, 1996). Наблюдения за отдельными клетками *D. discoideum*, выявили, что филаменты, содержащие не более 30 % GFP-актина, обладали почти нормальной подвижностью, в то время как у филаментов, у которых этот уровень гибридного белка был превышен, в опытах *in vitro* скольжение по другим молекулам было затруднено (Westphal et al., 1997). Авторы объясняют это нарушением взаимодействия GFP-актина

с миозином в структуре цитоскелета. При этом экспрессия гибридного белка *in vivo* была очень слабой, поэтому за его локализацией в какой-либо клеточной структуре проследить не удалось. Сопоставление полученных нами данных с данными литературы (Doyle, Botstein, 1996; Westphal et al., 1997) позволяет предположить, что использованная нами N-терминальная GFP-конструкция гибридного белка оказалась в функциональном отношении значительно более удачной, чем C-терминальная (Verkhusha et al., 2003).

Следует отметить, что в полученных нами трансформантах *P. pastoris* GFP-актин синтезируется в клетках независимо от источника углерода в среде. При отсутствии индукции, когда клетки выращиваются в течение 2 сут в среде, содержащей глицерин, структуры, типичные для актина, также можно наблюдать под люминесцентным микроскопом (рис. 2). Однако в этом случае уровень синтеза GFP-актина, очевидно, значительно ниже, чем в присутствии метанола, о чем свидетельствует увеличенная более чем в 4 раза фотоэкспозиция (рис. 2, а–в — 700 мкс, г–е — 3 с). Таким образом, показано, что рекомбинантный актин вырабатывается в клетке как в индуцибельных услови-

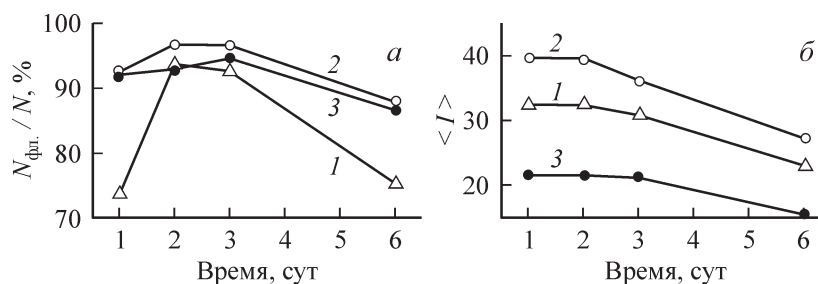


Рис. 3. Изменение доли флуоресцирующих клеток (а) и средней интенсивности флуоресценции в пересчете на одну клетку (б) у трех независимых трансформантов tr2 (1), tr20 (2) и tr30 (3), экспрессирующих GFP-актин, после индукции метанолом.

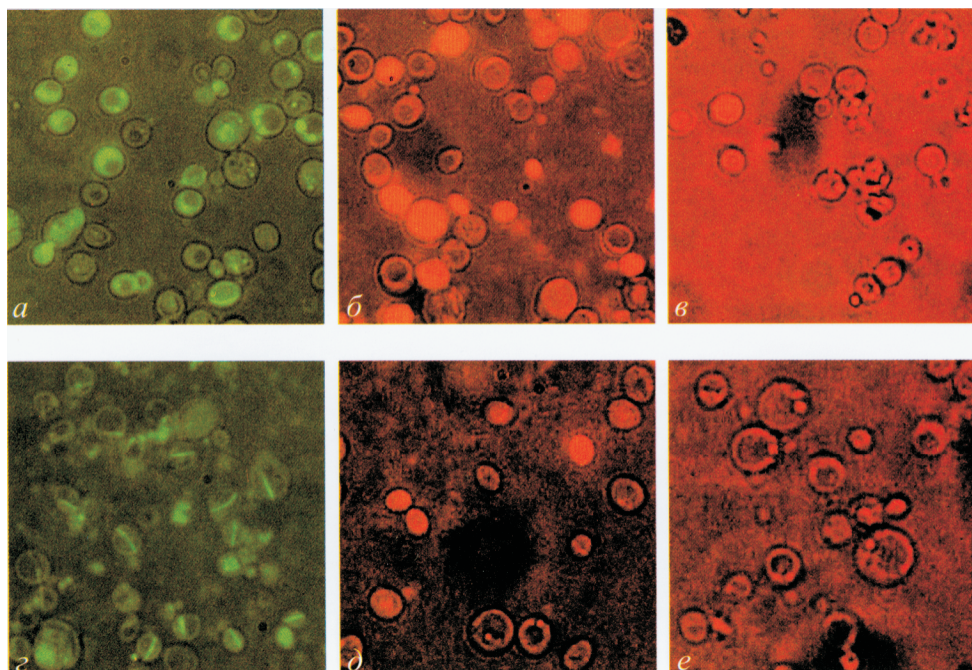


Рис. 4. Флуоресценция клеток двух независимых трансформантов, экспрессирующих GFP-актин: tr20 (a—в) и tr30 (z—e). a, z — актинсодержащие структуры, видимые по флуоресценции GFP в клетках, выращенных на метаноле; б, д, в, e — флуоресценция АФК-чувствительного зонда дигидрородамина 123 в клетках после длительного выращивания на среде с метанолом (б, д) или глицерином (в, e).

ях выращивания (в присутствии метанола), так и в неиндуцибельных (на среде с глицерином). Различие заключается лишь в количестве синтезированного белка.

Методом цитофотометрии была изучена динамика накопления гибридного белка по изменению интенсивности флуоресценции, обусловленной его GFP-частью. В течение 6 сут культивирования трех трансформантов в среде, содержащей метанол, измеряли число флуоресцирующих клеток и интенсивность их флуоресценции (рис. 3). Несмотря на то что процесс образования тяжелей начинается примерно через 1 сут с момента появления бляшек (мономерных форм актина), он мало сказывается на накоплении флуоресцентной метки. На основании данных, представленных на рис. 3, можно предполагать, что концентрация гибридного белка спустя 1 сут мало меняется, хотя имеет тенденцию к уменьшению, заметную через 4 сут метанольной индукции. Как видно на рис. 3, у трансформантов tr20 и tr30 спустя 1 сут культивирования

доля флуоресцирующих клеток составляет около 100 %, а у трансформанта tr2 — 78 %, достигая практически до 100 % уже на 2-е сут культивирования с метанолом. При этом средняя интенсивность флуоресценции клеток (рис. 3, б) оказывается более варибельным признаком, зависящим как от возраста культуры, так и от трансформанта.

Одной из важных характеристик клеток-продуцентов рекомбинантного белка является зависимость их выживаемости от присутствия чужеродного белка. До настоящего времени вопрос о том, как сказывается присутствие чужеродного актина на выживаемости клеток, не изучали. Для дрожжей сахарометов показано, что клеточное старение происходит по механизму апоптоза, «ключевой» реакцией которого является накопление АФК в митохондриях. Показана роль актинового цитоскелета в регуляции апоптоза у сахарометов, причем эта роль увеличивается с возрастом клеток (Gourlay et al., 2004). Изучая мутанты с разной активностью белка SCP1, авторы обнаружили, что уровень этого белка, связывающего F-актин и тем самым ограничивающего его динамику, пропорционален деполяризации митохондриальных мембран и продукции АФК. Предполагается, что актин ассоциирован в каналах митохондриальных мембран, помогая им открываться и закрываться. При этом замедление динамики актина, по-видимому, приводит к тому, что поры или каналы остаются открытыми дольше, чем следует, в результате выход цитохрома *c* в цитозоль увеличивается. Цитохрому *c* отводится особая роль в дрожжевом апоптозе, так как выходя в цитозоль, он активирует дрожжевую каспазу УСА-1 (Karova et al., 1998). В то же время повышение динамики актина сокращает время, в течение которого мембранные поры оказываются открытыми. Это уменьшает высвобождение цитохрома *c* и увеличивает продолжительность жизни клеток.

#### Влияние чужеродного актина на накопление АФК и выживаемость клеток *Pichia pastoris*

Штамм <i>P. pastoris</i>	Доля клеток (%), содержащих АФК на среде		Относительная выживаемость на метаноле
	с глицерином	с метанолом	
tr2	29	25	0.96
tr20	22	39	0.36
tr30	4	9	0.29
GS115 (исходный)	20	21	0.99

Примечание. Суммировали данные двух повторностей, в каждой из которых просчитывали не менее 300 клеток; АФК — активные формы кислорода.

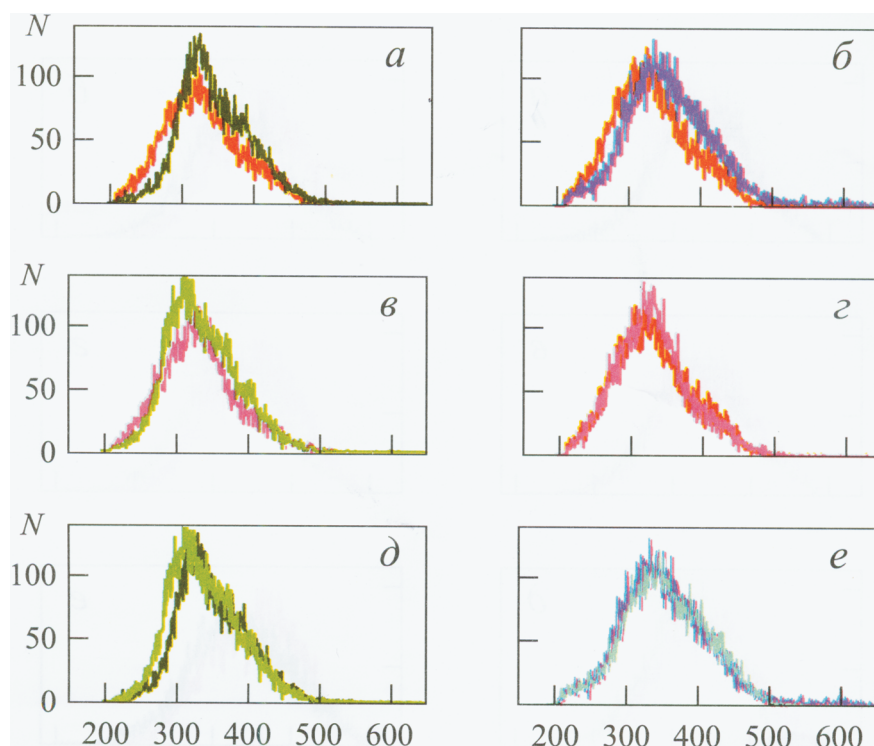


Рис. 5. Гистограммы светорассеяния исходных и трансформированных клеток *Pichia pastoris*, содержащих разные плазмиды и выращенных на синтетической среде с метанолом.

*P. p. 1* (красные кривые на панелях *a*, *b* и *з*) и *P. p. 2* (розовые кривые на панелях *в* и *з*) — клетки разных клонов исходной культуры *P. pastoris*; tr2 и tr30 (темно- и светло-зеленые кривые на панелях *a*, *д* и *в*, *г* соответственно) — трансформанты, несущие рекомбинантный GFP-актин; tr6 и tr7 (синие и голубая кривые на панелях *б*, *е* соответственно) — трансформанты, несущие рекомбинантный актин дрозофилы без GFP. Здесь и на рис. 6—8 *N* — количество клеток.

Нами показано, что разные трансформанты по-разному реагируют на присутствие чужеродного актина, если их долго выращивать на среде, индуцирующей его синтез (рис. 4). Мы определили накопление АФК в старых (14-суточных) клетках у трансформантов и сравнили его с накоплением АФК у исходного штамма. Для определения АФК использовали дигидрородамин 123. Данные таблицы свидетельствуют о том, что разные трансформанты, выросшие на глицерине и метаноле, по-разному накапливают АФК в своих митохондриях.

У трансформанта tr2 рост на метаноле не сопровождается увеличением количества клеток, накапливающих АФК, в то время как у tr20 и tr30 количество клеток, содержащих АФК, больше в среде с метанолом, чем в среде с глицерином. Чтобы выяснить, коррелирует ли избыточное накопление АФК с понижением выживаемости, мы проверили сравнительную эффективность клонирования на метаноле в следующем эксперименте.

Клетки, которые выращивали газонем в течение 2 нед на средах с метанолом и с глицерином, суспендировали в воде. Их оптическую плотность выравнивали до определенной величины ( $OD_{600} = 1.3$ ), после чего клетки высевали на обычную агаризованную полную питательную среду с глюкозой. Высев делали с разведением в  $10^5$  раз, чтобы выросшие на чашках колонии можно было легко подсчитать. Отношение числа клеток, выросших на метаноле, к числу клеток, выросших на глицерине, отражает относительную выживаемость клеток на метаноле.

Данные, приведенные в таблице, позволяют говорить о том, что у разных трансформантов выживаемость на среде с метанолом разная, причем она коррелирует с

данными накопления АФК. У tr2, как и в контроле (т. е. у исходного штамма GS115), накопление АФК на средах с метанолом и глицерином практически не различалось, выживаемость на обеих средах также была одинаковой. Для штаммов tr20 и tr30 накопление АФК было эффективнее в клетках, выросших на среде с метанолом, и выживаемость на этой среде за 14 сут падала у них примерно до 30 %.

Причина, по которой разные трансформанты по-разному реагируют на присутствие чужеродного актина, остается непонятной. Если считать, что генетически клетки трансформантов идентичны, то в основе их различий должны лежать какие-то эпигенетические различия, например разный прионовый статус. Можно предположить, что эти различия связаны с взаимодействием актинового цитоскелета с прионами, уровень которых в разных клетках может быть разным. На дрожжах-сахаромицетах была показана связь пролиферации приона Sup35 с клеточным цитоскелетом (Bailleul-Winslett et al., 1999, 2000).

Влияние синтеза чужеродного белка на величину и форму клеток было показано методом проточной цитометрии по изменению профиля клеточного рассеяния. На рис. 5 представлены гистограммы рассеяния у выросших на синтетической среде, содержащей метанол, исходных и трансформированных, несущих рекомбинантный ген актина клеток *P. pastoris*. Как видно, разные клоны штамма GS115 дают идентичные гистограммы при выращивании в одних условиях (рис. 5, *з*). Клетки, несущие белок слияния GFP-актин (tr20 и tr30) или рекомбинантный актин без белка слияния (tr6 и tr7), почти

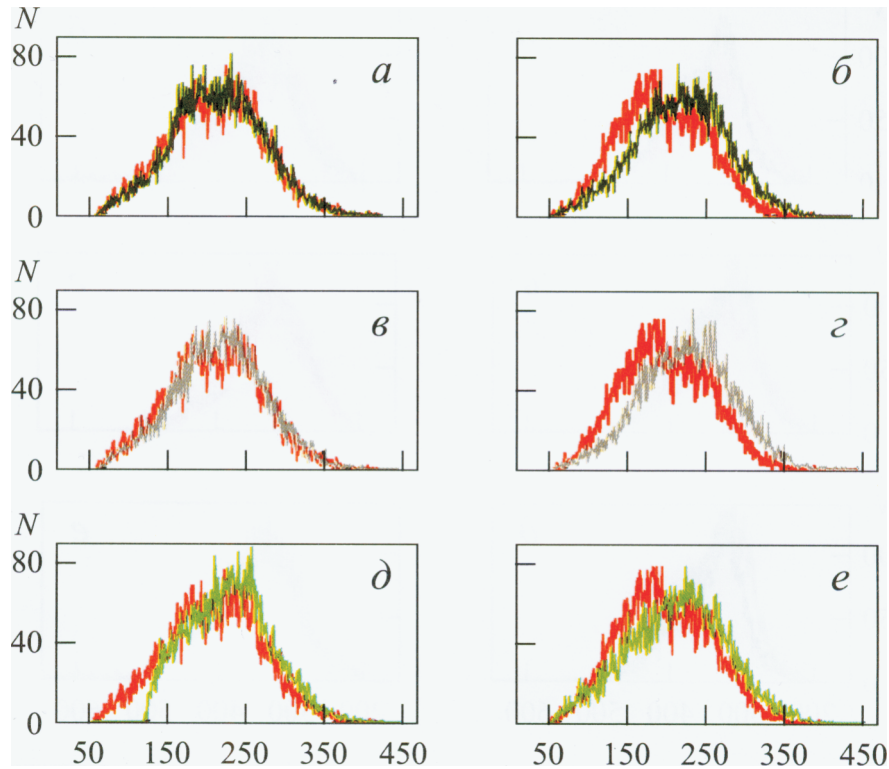


Рис. 6. Гистограммы светорассеяния клеток, выращенных на полной питательной среде с глицерином (а, в, д) или метанолом (б, з, е).  
P. p. 1 — красная кривая; tr2, tr20 и tr30 — темно-зеленая, серая и светло-зеленая соответственно.

не различаются (рис. 5, д, е соответственно). Однако по сравнению с нетрансформированными клетками для всех трансформантов характерен небольшой сдвиг вправо (рис. 5, а—в).

Данные, полученные при выращивании клеток на полных питательных средах, различающихся источником углерода, подтверждают, что именно метанол индуцирует описанные выше различия.

Оказалось, что на среде с глицерином клетки tr2, tr20 и tr30 дают то же рассеяние, что и сам исходный штамм *P. pastoris* (рис. 6, а, в, д). Эти же клетки, выращенные на среде с метанолом, существенно отличаются от исходного штамма (рис. 6, б, з, е). Мутации, полученные в рекомбинантном гене актина, названные «С» (W340F и W356F), «D» (V10C, W340F и W 356F) и «Е» (W86F, W340F и W356F), не влияют на профиль рассея-

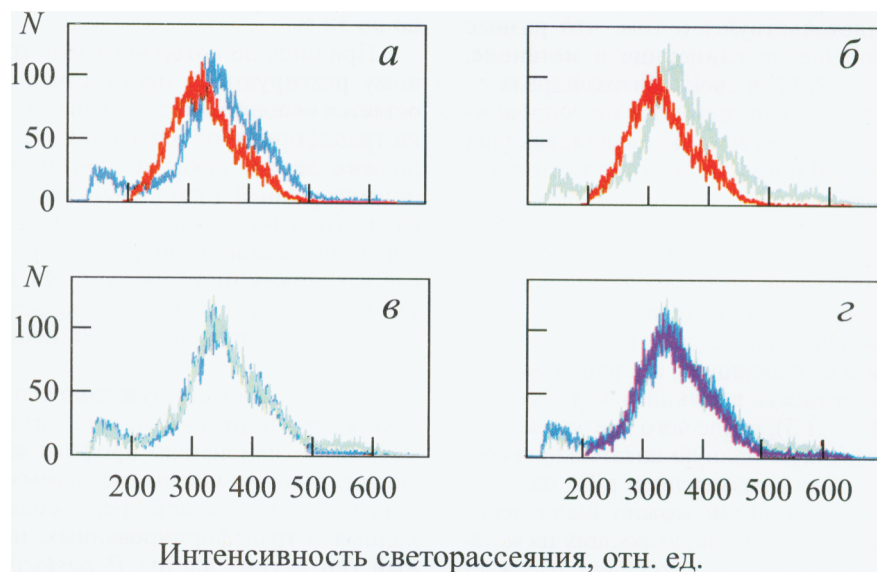


Рис. 7. Гистограммы светорассеяния клеток исходного штамма *Pichia pastoris* и трансформантов, несущих немутантный актин дрожофилы (tr6) и мутантные формы актина (trC, trD).

а, б; P. p. 1 — красные кривые, trD и trC — синие и голубые соответственно; в — trD и trC (голубая и синяя соответственно); д — trD, trC и tr6 (голубая, синяя и ярко-синяя кривые соответственно).

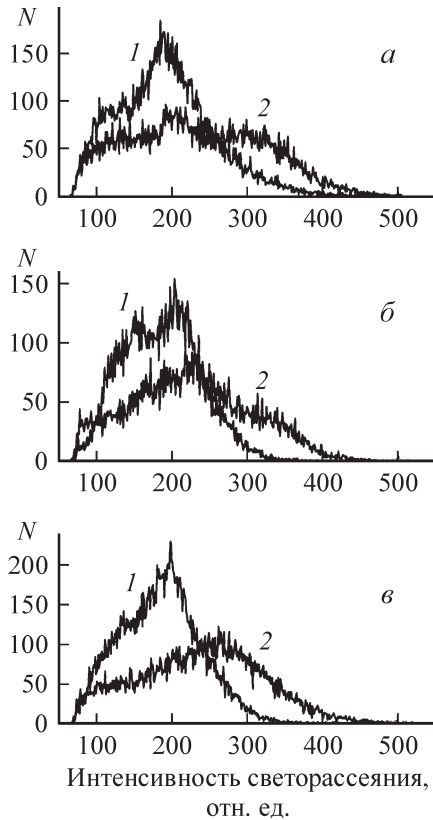


Рис. 8. Гистограммы светорассеяния для трансформированных штаммов *Pichia pastoris*, различающихся ростом на среде, содержащей метанол.

a — trC, б — trD, в — trE; 1 — штаммы mut<sup>+</sup> с хорошим ростом на средах, содержащих метанол, 2 — штаммы Mut/s (methanol utilization slow) со сниженной скоростью роста на метаноле.

ния (рис. 7). Они приводят к сдвигу гистограмм рассеяния по сравнению со штаммом *P. pastoris* (рис. 7, а, б) и не отличаются от клеток с немутантным рекомбинантным актином (рис. 7, в, г).

При этом существенным фактором, как выяснилось, является способность клеток утилизировать метанол. Все приведенные выше сравнения касались клеток, принадлежащих Mut<sup>+</sup>-штаммам, хорошо растущим на средах, содержащих метанол. Если из этих штаммов получить Mut/s-мутанты, которые плохо утилизуют метанол и поэтому медленно растут на нем, то гистограммы рассеяния у них будут сдвинуты вправо весьма ощутимо (рис. 8). Очевидно, медленное почкование приводит к тому, что материнская клетка успевает достичь значительного размера.

Таким образом, различия в гистограммах рассеяния, наблюдаемые у трансформантов по сравнению с исходным штаммом, очевидно, отражают изменения цитоскелета дрожжей, связанные с интенсивным синтезом чужеродного актина и влияющие на форму и размер клеток. Существенно, что этот эффект наблюдается на средах с метанолом, приводящим к сверхпродукции рекомбинантного актина, но отсутствует на средах с глицерином.

Белок слияния, синтезируемый в дрожжевых клетках, достаточно легко экстрагируется из дезинтегрированной дрожжевой биомассы буферными растворами,

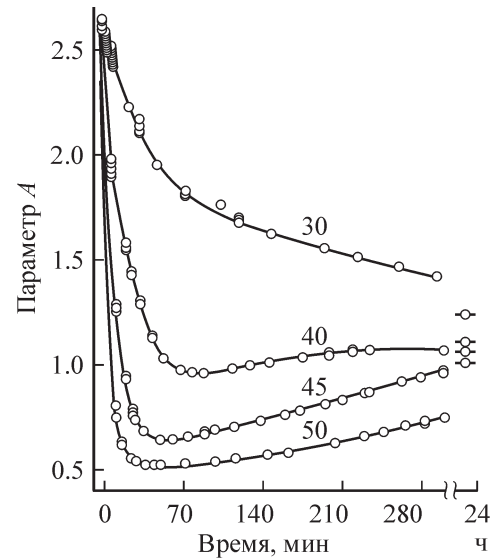


Рис. 9. Кинетика денатурации актина из мышцы кролика формалидом.

Представлены временные зависимости параметра  $A = I_{320}/I_{365}$ , характеризующего положение спектра флуоресценции. Цифры у кривых — концентрации формалида, %. Концентрация белка 0.5 мг/мл;  $\lambda_{возб.} = 297$  нм.

обычно используемыми при получении глобулярного актина кролика. При этом, по данным иммунохимического анализа, в раствор переходит весь синтезированный белок слияния. Для очистки белка слияния была использована способность природного нативного актина эффективно связываться с ДНКазой-1 из поджелудочной железы крупного рогатого скота. Действительно, при фильтрации экстракта дрожжевых клеток через слой ДНКазы-1-Сефарозы с сорбентом связывается белок, обладающий зеле-

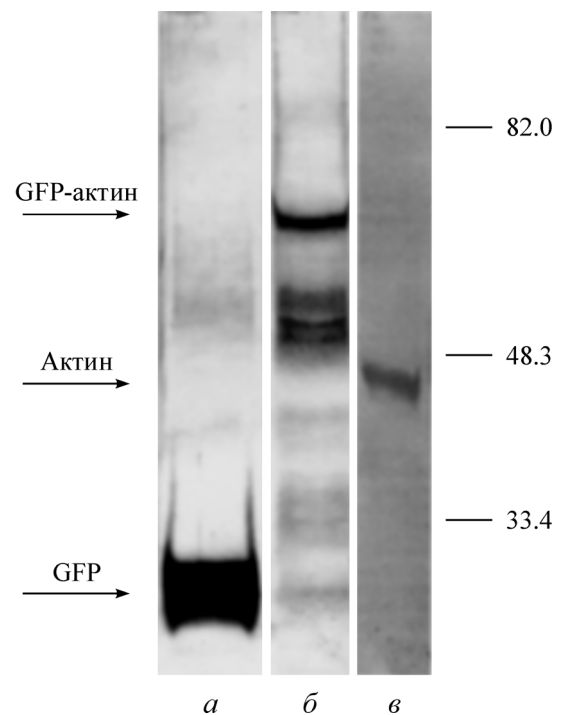


Рис. 10. SDS-электрофорез в полиакриламидном геле зеленого флуоресцентного белка GFP (а), белка слияния GFP-актин 5С (б) и актина из мышц кролика (в).



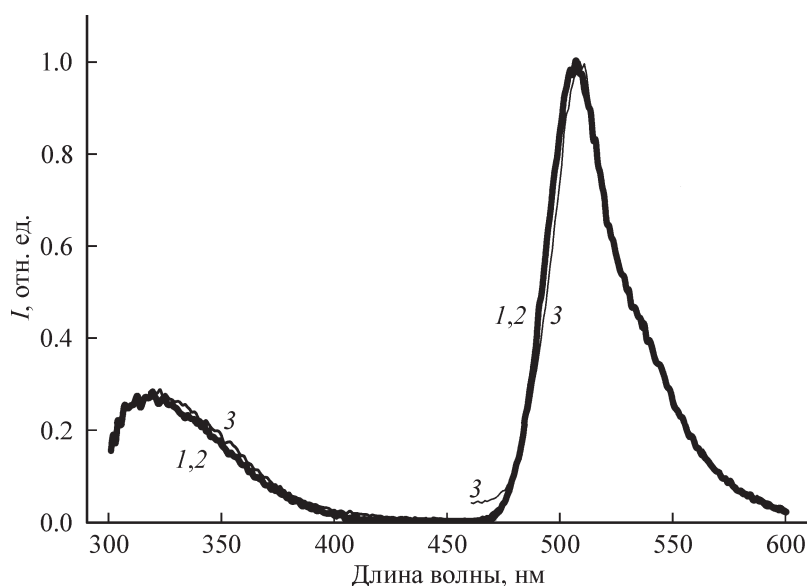


Рис. 11. Спектр флуоресценции рекомбинантного белка слияния GFP-актин 5С.

Две полосы флуоресценции характерны для нативного актина и зеленого белка GFP. 1—3 — спектры флуоресценции, измеренные при длинах волн возбуждающего света 280, 297 и 365 нм соответственно.

ной флуоресценцией. Элюция белка осуществляется 40%-ным формамидом с последующим разведением исходным буфером.

Поскольку формамид является денатурантом, было проведено специальное исследование влияния формамида на структуру актина из мышц кролика. Были измерены временные зависимости интенсивности флуоресценции актина и построены кинетические кривые изменения параметра  $A$ , характеризующего положение спектра флуоресценции ( $A = I_{320}/I_{365}$ ; рис. 9). Характер этих зависимостей аналогичен зависимостям, полученным при денатурации актина гуанидингидрохлоридом (GdnHCl), лишь скорость денатурации при этом значительно ниже. Эти результаты подтвердили, что формамид является классическим денатурантом, хотя и менее сильным, чем мочевины и GdnHCl (Поварова и др., 2005). Проверка стабилизирующего действия на актин сахарозы показала, что присутствие 48 % сахарозы не препятствует, а лишь замедляет необратимый переход актина в инактивированное состояние. Показано также, что присутствие сахарозы не позволяет получить нативный актин из полностью развернутого состояния при уменьшении концентрации денатуранта.

Таким образом, размер колонки и скорость элюции являются весьма существенными факторами в получении нативного рекомбинантного актина.

По данным флуоресцентного и иммунохимического анализа, элюированный материал содержит GFP. При электрофорезе в ПААГ без денатурантов светящийся белок мигрирует более медленно, чем стандартный GFP (рис. 10). По данным электрофореза в ПААГ с SDS, иммунологически родственный GFP белок имеет мол. массу 67 кДа. Представленные результаты указывают на то, что получаемый нами белок является белком слияния и содержит актиновый компонент (судя по аффинности к ДНКазе I и флуоресцентным характеристикам в области эмиссии триптофана) и GFP-компонент (судя по иммунологическим свойствам и флуоресценции в видимой

области спектра). Характер спектра флуоресценции белка слияния (рис. 11) позволяет сделать заключение о том, что актин в составе белка слияния имеет нативную структуру.

К данному белку слияния получены поликлональные антитела, которые предполагается в дальнейшем использовать для экспресс-тестирования рекомбинантного актина и его мутантных форм, синтезируемых в дрожжах.

Представленные результаты позволяют говорить о том, что нами разработана достаточно эффективная система получения нативных препаратов рекомбинантных актинов в клетках *P. pastoris*. Анализ системы *in vivo* показал, что синтезируемый в *P. pastoris* чужеродный актин вступает во взаимодействие с собственным актином и сказывается на жизнедеятельности клеток. Суперпродукция актина приводит к изменению формы клеток и их величины, а также может снижать выживаемость некоторых трансформантов после длительного выращивания на среде с метанолом.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 04-04-49622, 04-04-49290) и (06-04-48324), Фонда содействия отечественной науке (Гранты О. И. Поваровой, 2006 и О. В. Степаненко, 2007), программы фундаментальных исследований президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология», программы «Ведущие научные школы России» (грант НШ-9396.2006.4), ФЦНТП по приоритетному направлению «Развитие инфраструктуры» (гос. контракт № 02.445.11.7338), с использованием оборудования ЦКП «Материаловедение и диагностика в передовых технологиях».

#### Список литературы

Левцкий Д. И., Хайтлина С. Ю., Гусев Н. Б. 1995. Белки актомиозиновой системы подвижности. В кн.: Белки и пептиды. М.: Наука. 1 : 249—293.

- Поварова О. И., Кузнецова И. М., Туроверов К. К. 2005. Физико-химические свойства актина в различных структурных состояниях. Новые представления о процессах его сворачивания — разворачивания. Цитология. 47 (11) : 953—977.
- Туроверов К. К., Бикташев А. Г., Дорофеюк А. В., Кузнецова И. М. 1998. Комплекс аппаратных и программных средств для измерения спектральных, поляризационных и кинетических характеристик флуоресценции в растворе. Цитология. 40 (8/9) : 806—817.
- Aspenstrom P., Engkvist H., Lindberg U., Karlsson R. 1992. Characterization of yeast-expressed beta-actins, site-specifically mutated at the tumor-related residue Gly245. Eur. J. Biochem. 207 : 315—320.
- Bailleul-Winslett P. A., Newnam G. P., Steenbergen J. N., Chernoff Y. O. 1999. Genetic study of interaction between the cytoskeletal assembly protein Sla1 and prion-forming domain of the factor Sup35 (eRF3) in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics. 153 : 81—94.
- Bailleul-Winslett P. A., Newnam G. P., Wegrzyn R. D., Chernoff Y. O. 2000. An antiprion effect of the anticytoskeletal drug latrunculin A in yeast. Gene Expression. 9 : 145—156.
- Ballemstrem C., Wehrle-Haller B., Imhof B. A. 1998. Actin dynamics in living mammalian cells. J. Cell Sci. 111 : 1649—1658.
- Bertazzon A., Tian G. H., Lamblin A., Tsong T. Y. 1990. Entropic and enthalpic contributions to actin stability: calorimetry, circular dichroism and fluorescence study and effect of calcium. Biochemistry. 29 : 291—298.
- Bunch T. A., Grinblat Y., Goldstein L. S. 1988. Characterization and use of the *Drosophila* metallothionein promoter in cultured *Drosophila melanogaster* cells. Nucl. Acids Res. 16 : 1043—1061.
- Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W. W., Prasher D. C. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Science. 263 : 802—805.
- Doyle T., Botstein D. 1996. Movement of yeast cortical actin cytoskeleton visualized *in vivo*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 93 : 3886—3891.
- Doyle T. C., Hansen J. E., Reisler E. 2001. Tryptophan fluorescence of yeast actin resolved via conserved mutations. Biophys. J. 80 : 427—434.
- Frankel S., Condeelis J., Leinwand L. 1990. Expression of actin in *Escherichia coli*. Aggregation, solubilization, and functional analysis. J. Biol. Chem. 265 : 17 980—17 987.
- Fyrberg E. A., Bond B. J., Hershey N. D., Mixer K. S., Davidson N. 1981. The actin genes of *Drosophila*: protein coding regions are highly conserved but intron positions are not. Cell. 24 : 107—116.
- Gourlay C. W., Carpp L. N., Timpson P., Winder S. J., Ayscough K. P. 2004. A role for the actin cytoskeleton in cell death and aging in yeast. J. Cell Biol. 164 : 803—809.
- Ito H., Fukuda Y., Murata K., Kimura A. 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. J. Bacteriol. 153 : 163—168.
- Kabsch W., Mannherz H. G., Suck D., Pai E. F., Holmes K. C. 1990. Atomic structure of the actin: DNase I complex. Nature. 347 : 37—44.
- Karlsson R. 1988. Expression of chicken beta-actin in *Saccharomyces cerevisiae*. Gene. 68 : 249—257.
- Karpova T. S., McNally J. G., Moltz S. L., Cooper J. A. 1998. Assembly and function of the actin cytoskeleton of yeast: relationships between cables and patches. J. Cell Biol. 142 : 1501—1517.
- Kuznetsova I. M., Biktashev A. G., Khaitlina S. Yu., Vassilenko K. S., Turoverov K. K., Uversky V. N. 1999a. Affect of self-association on the structural organization of partially folded proteins: inactivated actin. Biophys. J. 77 : 2788—2800.
- Kuznetsova I. M., Turoverov K. K., Uversky V. N. 1999b. Inactivated actin, an aggregate comprised of partially-folded monomers, has an overall native-like packing density. Protein Peptide Lett. 6 : 173—178.
- Kuznetsova I. M., Yakusheva T. A., Turoverov K. K. 1999c. Contribution of separate tryptophan residues to intrinsic fluorescence of actin. Analysis of 3D structure. FEBS Lett. 452 : 205—210.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227 : 680—685.
- Le Bihan T., Gicquaud C. 1993. Kinetic study of the thermal denaturation of G actin using differential scanning calorimetry and intrinsic fluorescence spectroscopy. Biochem. Biophys. Res. Commun. 194 : 1065—1073.
- Ludin B., Matus A. 1998. GFP illuminates the cytoskeleton. Trends Cell Biol. 8 : 72—77.
- McLaughlin A., Gooch J. T., Mannherz H. G., Weeds A. G. 1993. Structure of gelsolin segment 1-actin complex and the mechanism of filament severing. Nature. 364 : 685—692.
- Otterbein L. R., Graceffa P., Dominguez R. 2001. The crystal structure of uncomplexed actin in the ADP state. Science. 293 : 708—711.
- Pollard T. D., Almo S., Quirk S., Vinson V., Lattman E. E. 1994. Structure of actin binding proteins: insights about function at atomic resolution. Annu. Rev. Cell Biol. 207 : 49.
- Pollard T. D., Blanchoin L., Mullins R. D. 2000. Molecular mechanism controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 29 : 545—576.
- Pollard T. D., Cooper J. A. 1986. Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions. Annu. Rev. Biochem. 55 : 987—1035.
- Prasher D. C., Eckenrode V. K., Ward W. W., Prendergast F. G., Cormier M. J. 1992. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. Gene. 111 : 229—233.
- Robinson R. C., Mejilano M., Le V. P., Burtnick L. D., Yin H. L., Choe S. 1999. Domain movement in gelsolin: a calcium-activated switch. Science. 286 : 1939—1942.
- Schuler H., Lindberg U., Schutt C. E., Karlsson R. 2000. Thermal unfolding of G-actin monitored with the DNase I-inhibition assay. Stability of actin isoforms. Eur. J. Biochem. 267 : 476—486.
- Schutt C. E., Myslik C., Rozycki M. D., Goonesekere N. C., Lindberg U. 1993. The structure of crystalline profilin-β-actin. Nature. 365 : 810—816.
- Sheterline P., Clayton J., Sparrow J. 1998. Actin. Protein profile. Oxford: Oxford Univ. Press. 271 p.
- Turoverov K. K., Biktashev A. G., Khaitlina S. Yu., Kuznetsova I. M. 1999. The structure and dynamics of partially folded actin. Biochemistry. 38 : 6261—6269.
- Turoverov K. K., Verkhusha V. V., Shavlovsky M. M., Biktashev A. G., Povarova O. I., Kuznetsova I. M. 2002. Kinetics of actin unfolding induced by guanidine hydrochloride. Biochemistry. 41 : 1014—1019.
- Vandekerckhove J., Weber K. 1978. Actin amino-acid sequences. Comparison of actins from calf thymus, bovine brain, and SV340-transformed mouse 3T3 cells with rabbit skeletal muscle actin. Eur. J. Biochem. 90 : 451—462.
- Verkhusha V. V., Shavlovsky M. M., Nevzglyadova O. V., Gai-voronsky A. A., Artemov A. V., Stepanenko O. V., Kuznetsova I. M., Turoverov K. K. 2003. Expression of recombinant GFP-actin fusion protein in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. FEMS Yeast Res. 3 : 105—111.
- Verkhusha V. V., Tsukita S., Oda H. 1999. Actin dynamics in lamellipodia of migrating border cells in the *Drosophila* ovary revealed by a GFP-actin fusion protein. FEBS Lett. 445 : 395—401.
- Westphal M., Jungbluth A., Heidecker M., Muhlbauer B., Heizer C., Schwartz J. M., Marriott G., Gerisch G. 1997. Microfilament dynamics during cell movement and chemotaxis monitored using a GFP-actin fusion protein. Curr. Biol. 7 : 176—183.

EXPRESSION OF RECOMBINANT ACTIN 5C FROM DROSOPHILA  
IN THE METHYLOTROPHIC YEAST *PICHIA PASTORIS*

*O. V. Nevzglyadova*,<sup>1</sup> *A. V. Artemov*,<sup>1</sup> *V. V. Zenin*,<sup>1</sup> *V. V. Verkhusha*,<sup>2</sup> *M. M. Shavlovsky*,<sup>3</sup> *O. I. Povarova*,<sup>1</sup>  
*Olesya V. Stepanenko*,<sup>1</sup> *I. M. Kuznetsova*,<sup>1</sup> *K. K. Turoverov*<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, <sup>2</sup> Center for Molecular Medicine, Moscow State University, and <sup>3</sup> Institute for Experimental Medicine RAMS, St. Petersburg; <sup>1</sup> e-mail: kkt@mail.cytspb.rssi.ru

A system for actin expression in cells of yeast *Pichia pastoris* was constructed. *Drosophila* actin 5C, by 90% homologous to  $\beta$ -actin of higher eukaryotes, was used as a target protein. To improve the procedures of target protein biosynthesis in yeast cells and of extraction and purification of recombinant actin the fusion protein GFP-actin 5C, having fluorescence protein GFP as a reporter part, was expressed and purified. The dimensions and resistance of yeast cells producing recombinant actin were characterized. It was shown that the size and form of cells depended on the accumulation of recombinant protein. The purified fusion protein was used for obtaining polyclonal antibody for testing recombinant actin.

Key words: recombinant actin, green fluorescent protein, GFP-actin fusion, *Pichia pastoris*, actin cytoskeleton.

---