

## Разработка методологии получения растворимой формы рекомбинантной N-ацетилтрансферазы-2 человека

М.С. Дуля, Е.Д. Шевченко, Н.В. Петрова

ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России», Московская область

Контактная информация: Дуля Максим Сергеевич, [mdulya@gmail.com](mailto:mdulya@gmail.com)

---

В статье представлена разработка методологии и оптимизация условий получения рекомбинантной N-ацетилтрансферазы-2 человека (*hNAT2*), найдены оптимальные параметры наработки фермента в растворимой форме и в достаточном количестве для *in vitro* биоаналитических экспериментов. Приводятся данные о дизайне генетической конструкции для эффективной экспрессии рекомбинантного фермента N-ацетилтрансферазы-2 человека, методом гель-электрофореза в денатурирующих условиях подтверждается молекулярная масса белка (34-35 кДа), указывается количественное содержание фермента (3,14 мг/мл).

**Ключевые слова:** N-ацетилтрансфераза-2 (*NAT2*), фермент, гель-электрофорез, человек.

---

### Введение

Биотрансформация ксенобиотиков и лекарственных средств в подавляющем большинстве случаев осуществляется под контролем ферментов. Ферменты, участвующие в метаболизме ксенобиотиков, локализованы главным образом в печени, хотя немаловажную роль могут играть ферменты кишечника, лёгких, почек, кожи и других тканей.

Внимание нашего исследования посвящено условиям экспрессии ферментов второй фазы биотрансформации – N-ацетилтрансфераз. Ацетилирование эволюционно является одним из ранних механизмов адаптации, т.к. эта реакция необходима для синтеза жирных кислот, стероидов, функционирования цикла Кребса, метаболизма ксенобиотиков (лекарственных препаратов, бытовых и промышленных ядов). Процессы фер-

ментативного ацетилирования арилгидразинов и ариламинов – как у прокариот, так и у эукариот – осуществляются с помощью NAT.

У человека известно три гена NAT, один из которых является псевдогеном. Два экспрессирующихся гена *NAT1* и *NAT2* расположены на одной хромосоме и кодируют N-ацетилтрансферазу-1 (*NAT1*) и N-ацетилтрансферазу-2 (*NAT2*), которые имеют 81% идентичности, и оба проявляют генетический полиморфизм. В настоящее время известно четыре изоформы NAT: *NAT1*, *NAT2*, *NAT3*, *NAT4* соответственно. У изоформ *NAT1* и *NAT2* было обнаружено большое разнообразие аллельных вариантов [1]. Данные об аллельном полиморфизме генов *NAT1* и *NAT2* позволили выделить в человеческой популяции носителей мутаций, обладающих фенотипом мед-

ленных и быстрых ацетиляторов [2]. Соотношение «быстрых» и «медленных» ацетиляторов значительно варьирует в популяциях с различным этническим и географическим происхождением.

Также установлена ассоциация полиморфизма гена *NAT2* с различными заболеваниями и различной чувствительностью к лекарственным препаратам [4]. Так, например, наличие «медленного» фенотипа ацетилирования является фактором риска развития рака молочной железы и рака мочевого пузыря. Кроме того, генетический полиморфизм *NAT2* может определять токсикологическое и фармакологическое действие лекарственных препаратов, которые подвергаются N-ацетилированию посредством данного фермента [3]. Например, «медленные» ацетиляторы характеризуются более продолжительным фармакологическим эффектом и, в то же время, обнаруживают повышенную чувствительность к некоторым лекарственным препаратам и побочным иммуноотоксическим эффектам ариламинов и гидразинов.

Процессы ацетилирования N-ацетилтрансферазами сосредоточены главным образом в печени, но также этот фермент обнаруживают в легких, толстом кишечнике, почках, мочевом пузыре и даже в головном мозге.

Оба фермента играют важную роль в нейтрализации ксенобиотиков, катализируя перенос ацетильной группы с ацетил-кофермента А (ацетил CoA) на концевой атом азота арилгидразинов и арилзамин-содержащих лекарственных препаратов и канцерогенов. Типичными примерами лекарственных средств, подвергающихся катаболизму N-ацетилтрансферазами, являются сульфанила-

миды, противотуберкулёзные средства, транквилизаторы, психостимуляторы и многие другие. Число новых субстратов NAT постоянно растёт. Единственным известным на сегодняшний день эндогенным субстратом *NAT1* является п-аминобензоилглутамат – продукт катаболизма фолиевой кислоты.

Активность ферментов NAT может быть управляема субстратоспецифичными агентами (селективно для *NAT1* и *NAT2*) в каскадах реакций ацетилирования субстратов, приводящих к ацетилированным промежуточным интермедиатам и конечным метаболитам. Ингибирующее действие на фермент определяется фермент-субстратной реакцией и зависит от аффинности связывания с активным центром фермента ковалентными или нековалентными взаимодействиями.

Считается, что *NAT2* обладает меньшей специфичностью и метаболизирует более широкий круг веществ, чем и привлекает наше внимание.

Подробное изучение субстратной специфичности и лекарственной биоактивности, как и другие исследования, требуют большого количества очищенного NAT. Первоначально этот фермент получали из животных источников, но из человеческих и животных тканей получать *NAT2* в достаточном объёме невозможно.

**Целью** исследования стала разработка методологии и оптимизация условий получения рекомбинантного *NAT2* человека в растворимом биологически активном виде в достаточном количестве для дальнейших исследований.

### **Материалы и методы**

В работе по получению рекомби-

нантного белка N-ацетилтрансферазы-2 человека (*hNAT2*) были использованы следующие методы:

- молекулярное клонирование фрагмента гена *NAT2*;
- моделирование и конструирование экспрессионного вектора;
- трансформация компетентных клеток, отбор клонов;
- выращивание культуры в селективных условиях;
- выделение и очистка целевого белка.

В качестве реципиентных клеток использовали бактерии *E. Coli* компании «NewEnglandBioLabs». Генотип штамма: *fhuA2 Δ(arg-lacZ)U169 phoAglNv44 φ80Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1*

*endA1 thi-1 hsdR17*. Штамм с чувствительностью к ампициллину, канамицину, стрептомицину, спектиномицину, тетрациклину, хлорамфениколу и нитрофурантиону.

Для экспрессии *hNAT2* в бактериальной культуре была сконструирована экспрессионная плаزمида (рис. 1).

Плазмида pET-30 (b) *hNAT2* сконструирована с целью выделения нативного белка *NAT2* совместно со всем пулом бактериальных белков *E. Coli* и последующего очищения с помощью гель-хроматографии. Для этого вектор *NAT2* клонировали в полилинкер по сайтам рестрикции KpnI и BamHI под контроль экспрессии лактозного оперона. Также плазмида несёт селективный маркер-ген устойчивости к канамицину.

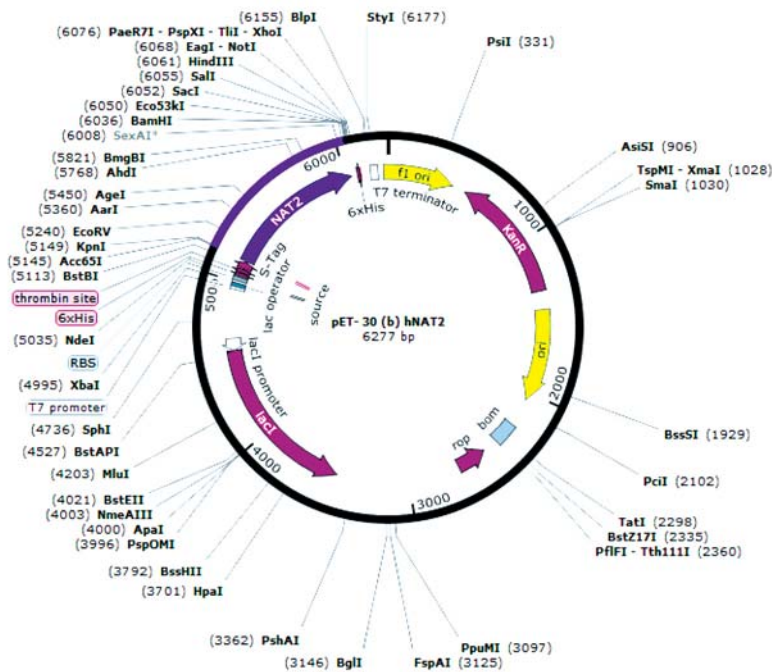


Рис. 1. Кольцевая карта плазмиды pET-30 (b), содержащая цельноразмерный ген *hNAT2*, 887 п.о. (фиолетовый цвет). Показаны основные рестриктазы, для которых имеются сайты узнавания на плазмиде.

Работа выполнена совместно с ЗАО «Евроген».

Следующим этапом работы являлась трансформация клеток экспрессионной плазмидой. Для этого использовали метод нагрева-оттаивания. Бактериальные клетки (100 мкл) в смеси с рекомбинантной плазмидой (5 мкг/мл) подвергали непродолжительному нагреву на водяной бане при 42°C в течение 1 мин, затем последующему выдерживанию во льду в течение 5 мин и инкубированию при 37°C в течение 1 ч с добавлением питательной среды SOC до конечного объёма 1 мл.

После стадии восстановления клетки разводят в 100 раз средой SOC и высевают либо на твёрдую среду, содержащую антибиотик, агарозу и индуктор экспрессии, либо в жидкую среду, также содержащую антибиотик и индуктор экспрессии. Бактериальные клетки культивируют при температуре 37°C.

Выбор индуктора и его оптимальная концентрация была найдена в следующем эксперименте. В культуры трансформированных клеток были добавлены

два индуктора IPTG и лактоза в разных концентрациях (рис. 2), культивирование проходило 16 ч, после чего была замерена оптическая плотность ( $OD_{600}$ ) во всех образцах (Multiscan GO, Thermo Scientific).

По результату эксперимента в качестве индуктора было решено использовать IPTG с концентрацией 0,1 mM.

Бактериальные клетки культивировали при 37°C и непрерывном перемешивании до  $OD_{600}=0,8-1$ . Затем бактериальные клетки осаждали центрифугированием при 3700 об/мин в течение 10 мин, удаляли супернатант и ресуспендировали осадок в буфере TBS (6,06 гТрис и 8,76 гNaCl). Процедуру повторяли 3 раза, с каждым разом уменьшая объём отмывочного буфера. Пробирки с клетками помещали в ледяную баню и обрабатывали ультразвуком в течение 3 мин. Затем центрифугировали образцы на максимальной скорости при 4°C, супернатант отбирали и замораживали.

Далее из клеточного лизата выделяли плазмидную ДНК и белковую

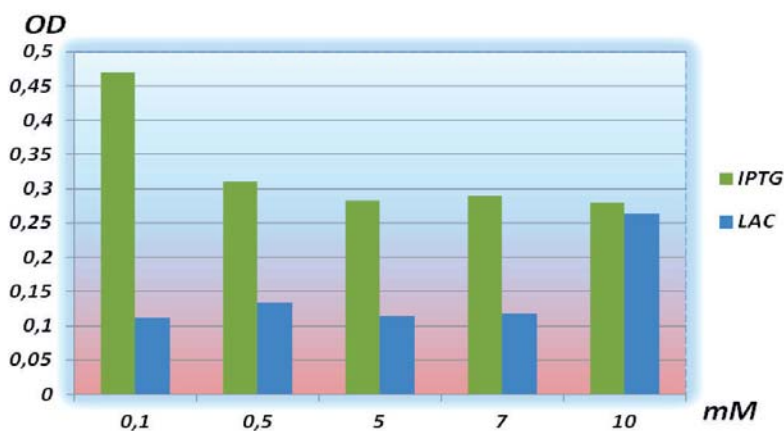


Рис. 2. Зависимость оптической плотности бактериальных клеток в жидкой питательной среде от концентрации индуктора (лактозы и IPTG).

фракцию. Выделение плазмидной ДНК проводили двумя независимыми способами: методом щелочной экстракции и с помощью набора «ДНК-Сорб» («АмплиСенс»). Для выделения бактериальных плазмид методом щелочной экстракции готовили растворы буферов для ресуспендирования и лизиса. Второй метод выделения бактериальной плазмиды был осуществлён с помощью коммерческого набора «ДНК-сорб» («АмплиСенс») в соответствии с протоколом производителя.

Измерение концентрации суммарной ДНК проводили на флуориметре Quibit 3,0 LifeTechnologies в соответствии с протоколом производителя. После процедуры выделения плазмидной ДНК концентрация ДНК в образцах, выделенных по протоколу щелочной экстракции, составила 19680 нг/мл и 53600 нг/мл по протоколу набора «ДНК-Сорб».

Для оценки уровня экспрессии гена *hNAT2* и локализации белка из лизированных клеток выделяли белковую фракцию. Для этого лизат центрифугировали при 4000 об/мин для отделения растворимой фракции от фракции, содержащей белок в тельцах включений, и подвергали очистке на мембранном катридже 30 кДа.

Для визуализации качественного и количественного состава белковой фракции образцы наносили на 12% гель для белкового электрофореза в системе ДСД-ПААГ (Mini-Protean Tetra, «Bio-Rad»).

Оценку количественного состава белковых фракций на геле проводили с помощью программы ImageLab («Bio-Rad») в соответствии с интенсивностью представленных полос белковых компонентов на электрофореграмме.

## Результаты исследований

Электрофореграммы разделения белкового пула представлены на рис. 3 и 4.

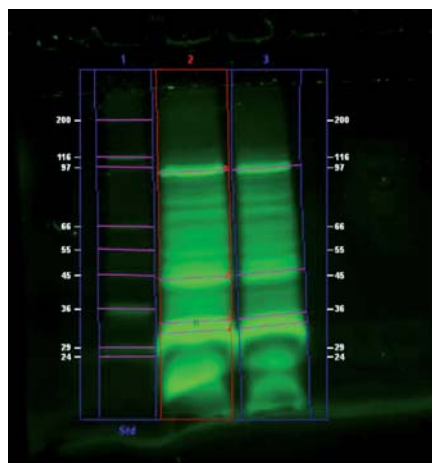


Рис. 3. Анализ продукции белка *hNAT2* методом электрофореза в полиакриламидном геле. Детекция в камере Gel/ChemiDoc («Bio-Rad»). 1-я дорожка – маркеры молекулярных масс; 2-я,3-я дорожки – неочищенная на мембране растворимая фракция белков после лизирования бактериальных клеток *E. Coli*.

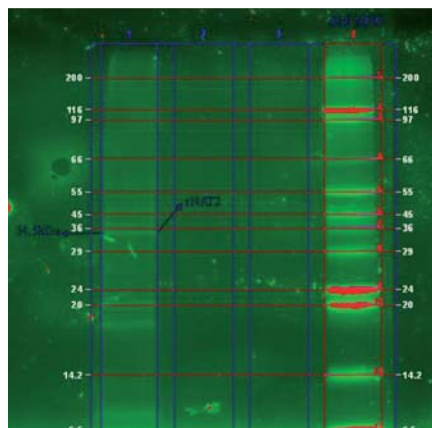


Рис. 4. Анализ продукции белка *hNAT2* методом электрофореза в полиакриламидном геле. Детекция в камере Gel/ChemiDoc («Bio-Rad»). 1-я дорожка – очищенная на мембране 10 кДа фракция белка клеток *E. coli*; 2-я, 3-я дорожки – без нагрузки образцами; 4-я дорожка – маркеры молекулярных масс.

Область молекулярной массы целого белка *hNAT2* имеет выраженную интенсивность флуоресценции и выделена в области 34-35 кДа.

Из 6,29 г бактериальной культуры удалось выделить белковую фракцию с концентрацией 3,14 мг/мл общего белка.

Анализ белковой фракции *hNAT2* электрофорезом в полиакриламидном геле показал, что очищенная фракция была неоднородна по составу и содержала набор белков с молекулярной массой ~45 кДа, ~20 кДа, ~17 кДа, ~10 кДа.

### Выводы

В ходе исследования по разработке методологии и оптимизации условий получения рекомбинантного *NAT2* человека найдены оптимальные параметры наработки фермента в растворимой форме и достаточном количестве для биоаналитических *in vitro* экспериментов.

Данные результаты позволят использовать рекомбинантный фермент *hNAT2* в серии постановок для оценки сравнительной ферментативной активности *in vitro*, а также проводить сравнительную оценку активности видоспецифичных

выделенных ферментов NAT-семейства лабораторных животных (мыши, крысы, мини-свиньи) с активностью полученного рекомбинантным способом фермента *NAT2* человека.

Предварительно очищенная методами препаративной гель-проникающей и металл-аффинной хроматографии белковая фракция *hNAT2* позволит проводить скрининговую оценку молекул-кандидатов в последующих исследованиях регуляции активности *NAT2* человека (ингибиторов, активаторов).

### Список литературы

1. Каркищенко Н.Н., Петрова Н.В., Слободенюк В.В. Высокоспецифичные видовые праймеры к генам *Nat1* и *Nat2* для сравнительных исследований у человека и лабораторных животных // Биомедицина. 2014. № 2. С. 4-16.
2. Кукес В.Г. Метаболизм лекарственных средств: клинико-фармакологические аспекты. - М.: Реафарм. 2004. 144 с.
3. Grant D.M., Blum M., Meyers U.A. Polymorphisms of N-acetyltransferase genes // Xenobiotica. 1992. № 22. P. 1073-1081.
4. Hein D.W. Molecular genetics and function of NAT1 and NAT2: role in aromatic amine metabolism and carcinogenesis // Mutation Research. 2002. № 506-507. P. 65-77.

## Development of methodology for production of a soluble form of recombinant human N-acetyltransferase-2

M.S. Dulya, E.D. Shevchenko, N.V. Petrova

The paper presents the development of a methodology and optimization of recombinant N-acetyltransferase-2 of human (*hNAT2*), found the optimal parameters of use of the enzyme in a soluble form and in sufficient quantity for the *in vitro* bioanalytical experiments. Presents data on the design of genetic constructs for efficient expression of recombinant enzyme human N-acetyltransferase 2, by the method of SDS-PAGE electrophoresis confirmed the molecular weight of the protein (34-35 kDa), indicated quantitative content of enzyme (3.14 mg/ml).

**Key words:** N-acetyltransferase-2 (NAT2), enzyme, method of SDS-PAGE electrophoresis, human.