

СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

УДК 548.73

ПОЛУЧЕНИЕ, КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ И ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЕ РЕНТГЕНОВСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО АЛЛЕРГЕНА Der p 3 ИЗ КЛЕЩА ДОМАШНЕЙ ПЫЛИ *Dermatophagoides pteronyssinus*

© 2023 г. В. И. Тимофеев^{1,3}, Ю. А. Абрамчик^{1,2}, Н. Е. Жухлистова¹, О. О. Михеева²,
М. Б. Шевцов⁴, Е. А. Заяц², Д. Д. Лыкошин², М. А. Костромина²,
Р. С. Есипов², И. П. Куранова^{1,3,*}

¹ Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН, Москва, Россия

² Институт биоорганической химии РАН, Москва, Россия

³ Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

⁴ Московский физико-технический институт, Долгопрудный, Россия

*E-mail: inna@crys.ras.ru

Поступила в редакцию 07.02.2022 г.

После доработки 07.02.2022 г.

Принята к публикации 01.03.2022 г.

Получен высокоэффективный штамм-продуцент С3029/pGro7/pERDerp3 аллергена Der p 3 из клеща домашней пыли *Dermatophagoides pteronyssinus*, продуцирующий рекомбинантный белок в *Escherichia coli* в растворимой форме, и разработана методика очистки рекомбинантного аллергена. Методом диффузии паров растворителя выращены кристаллы рекомбинантного белка Der p 3, пригодные для рентгеноструктурного исследования. Дифракционный набор до разрешения 2.25 Å собран на синхротроне ESRF (Франция, станция ID23-1) при температуре 100 К. Кристаллы относятся к пр. гр. C121, в независимой части ячейки содержатся две молекулы фермента.

DOI: 10.31857/S0023476122060273, EDN: DMUZXL

ВВЕДЕНИЕ

К аллергенам относят антигены белковой природы, вызывающие аллергию и обладающие способностью связываться с иммуноглобулином E (IgE) [1]. Белки из клещей домашней пыли *Dermatophagoides pteronyssinus* составляют большую часть домашних аллергенов и являются одним из главных факторов, ответственных за развитие аллергии и бронхиальной астмы во всем мире [2, 3]. В связи с этим экстракты *Dermatophagoides pteronyssinus* используются для подкожной (SCIT) или сублингвальной иммунотерапии, а также для диагностики аллергии [4, 5]. Однако поскольку натуральные экстракты довольно разнообразны по содержанию и составу аллергенов, для диагностики и терапии все чаще используются рекомбинантные аллергены и гипоаллергены [6, 7].

Главными аллергенами клеща домашней пыли *Dermatophagoides pteronyssinus* являются белки Der p, многие из которых относятся к протеазам [8]. Высокий уровень IgE против аллергенов Der p 1 и Der p 2 обнаружен более чем у 70% пациентов. Важную роль в аллергии играют также сериновые протеазы Der p 3, Der p 6 и Der p 9 [9, 10]. При этом сериновая протеаза Der p 3 является одним

из ключевых аллергенов. Имеются данные о взаимодействии протеазы Der p 3 с дыхательным эпителием [11, 12]. Установлена роль сериновой протеазы Der p 3 в стимулировании кальциевых каналов семейства Orai1. Показано, что терапия, включающая одновременное ингибирование белка Der p 3 и каналов Orai1, подавляет активацию тучных клеток клещами домашней пыли. Кроме того, Der p 3 является важным аэроаллергеном, активирующим Ca²⁺-каналы [13].

Основная проблема при диагностике аллергии в настоящее время заключается в поиске эпитопов для прогнозирования аллергенной активности [14]. Задача распознавания антигенных участков белков является ключевой при создании синтетических вакцин, иммунодиагностических тестов и производстве антител. Поэтому данные о пространственной структуре белков-аллергенов представляют существенный интерес. Информация о структуре позволяет проследить эволюцию аллергенов, объясняет наблюдаемую клинически кросс-реактивность и делает возможным дизайн гипоаллергенных производных для аллергических вакцин.

В настоящей работе описана новая методика получения и очистки рекомбинантного белка-аллергена Der p 3 из *Dermatophagoides pteronyssinus*, найдены условия кристаллизации белка. От выращенных кристаллов получен дифракционный набор, пригодный для установления пространственной структуры Der p 3 при разрешении 2.25 Å.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение экспрессионного плазмидного вектора, содержащего ген Der p 3. Из клещей домашней пыли *Dermatophagoides pteronyssinus* при помощи набора для выделения суммарной РНК ExtractRNA (Евроген, Россия) выделена матрица, из которой с помощью ревертазы Mint (Евроген, Россия) в соответствии с протоколом фирмы-производителя получена кДНК. Для амплификации гена аллергена Der p 3 были синтезированы олигонуклеотидные праймеры (Der-forward 5'-GGTGGT-CATATGAATCCCAATTCTACCAGCATCAC-3' и Der-reverse 5'-GGTGGTCTCGAGCTGTGAC-GTTTTGATTTCAATCCAA-3'), подобранные на основании последовательности мРНК из банка данных (LOC113796035). Полученные полимеразные фрагменты были расщеплены эндонуклеазами рестрикции *NdeI* и *XhoI* (ThermoScientific, США) и клонированы в экспрессионный вектор рЕТ-23а+, предварительно обработанный этими же рестриктазами, в одной рамке считывания с фрагментом, кодирующим His₆-метку. В результате получен экспрессионный вектор рERDerp3.

Культивирование штамма-продуцента аллергена Der p 3. При электропорации рекомбинантной плазмиды рERDerp3 в штамм *Escherichia coli* C3029/pGro7 получен высокоэффективный штамм-продуцент *E. coli* C3029/pGro7/pERDerp3 рекомбинантного аллергена Der p 3, продуцирующий белок в растворимой форме. Трансформированные клетки высевали на твердую агаризованную среду LB, содержащую 100 мкг/мл ампициллина и 20 мкг/мл хлорамфеникола, и выращивали в течение 14 ч при 37°C для получения отдельных колоний. После этого несколько колоний переносили в 100 мл среды LB с 100 мкг/мл ампициллина и 20 мкг/мл хлорамфеникола и выращивали в течение 16 ч при 37°C на шейкере CERTOMAT® SII (Sartorius, Германия) при перемешивании со скоростью 180 об./мин для получения инокулята. Полученной культурой засеивали среду LB, содержащую 50 мкг/мл ампициллина, 20 мкг/мл хлорамфеникола и 0.5 мг/мл L-арабинозы, и культивировали при 37°C до оптического поглощения A₅₉₅ = 0.6, затем индуцировали изопропил-β-D-1-тиогактопиранозидом до концентрации 0.4 мМ и выращивали 18 ч при 23°C. Клетки отделяли центрифугированием при 3900 об./мин в течение 20 мин при 4°C на центрифуге Avanti J30I (BeckmanCoulter, Германия). Из 1 л культуры штамма-

продуцента *E. coli* C3029/pGro7/pERDerp3 получили 3 г влажных клеток.

Выделение аллергена Der p 3. Клетки ресуспендировали в буферном растворе А (50 мМ Трис-HCl, pH 8.5, 5 мМ ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота), 1 мМ PMSF) и разрушали во льду с помощью ультразвукового дезинтегратора LABSONIC (Sartorius). Клеточный дебрис отделили центрифугированием при 12000 об./мин в течение 30 мин при 4°C на центрифуге HERMLE Z383K (Hermlelabortechnik). На первой стадии очистки осветленный клеточный лизат разбавляли в 2 раза буферным раствором Б (20 мМ NaOAc (Merk), pH 6.0) с титрованием до pH 6.0 и наносили на колонку XK16/20 с катионообменным сорбентом Macro-Prep High S Support (Bio-Rad, США) объемом 20 мл, предварительно уравновешенную буферным раствором Б. Элюцию белка проводили в градиенте хлорида натрия от 0 до 500 мМ.

На второй стадии очистки обогащенные фракции аллергена после катионообменной хроматографии наносили на колонку с металл-аффинным сорбентом Ni²⁺-IDA (Qiagen, Германия) объемом 30 мл, предварительно уравновешенным буферным раствором Б. Элюцию белка проводили в градиенте имидазола от 0 до 500 мМ. После аффинной хроматографии к фракциям, содержащим целевой белок, добавляли ЭДТА до 5 мМ и концентрировали при помощи ультрафильтрационной ячейки Amicon 8200 объемом 200 мл (Millipore, США) на мембране Ultracel®10 кДа (Millipore).

Последующую очистку проводили на гель-фильтрационной колонке HiLoad 16/60 с сорбентом Superdex 75 (GE Healthcare, США) в буфере В (20 мМ NaH₂PO₄, pH 6.0, 100 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 5% глицерина, 0.04% NaN₃). Очищенные фракции целевого белка после гель-хроматографии объединяли и концентрировали до 25 мг/мл (рис. 1).

Кристаллизация рекомбинантного аллергена Der p 3. Подбор условий кристаллизации аллергена Der p 3 проводили методом диффузии паров растворителя при температуре 20–22°C. Для этого к 2 мкл раствора белка в 20 мМ NaH₂PO₄, pH 6.0, 100 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 5% глицерина, 0.04% NaN₃ с концентрацией 10 мг/мл добавляли равный объем раствора-осадителя. Каплю раствора помещали на поверхность силиконированной стеклянной пластинки, которой накрывали кювету, содержащую 1 мл раствора-осадителя. В качестве осадителя использовали наборы HR2-110, HR2-112, HR2-126, HR2-144 (Hampton Research, США). Кристаллы, использованные при получении дифракционного набора, выращены из 1%-ного раствора белка при добавлении равного объема раствора-осадителя, содержащего 3 М

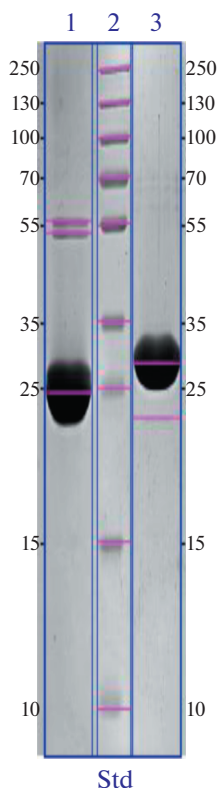


Рис. 1. Гель-электрофореграмма рекомбинантного аллергена Der p 3 из *Dermatophagoides pteronyssinus* в 15%-ном полиакриламидном геле ПААГ в денатурирующих условиях: 1 – Der p 3 в невосстанавливающих условиях; 2 – стандарты молекулярных масс PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (ThermoScientific™); 3 – Der p 3 в восстанавливающих условиях.

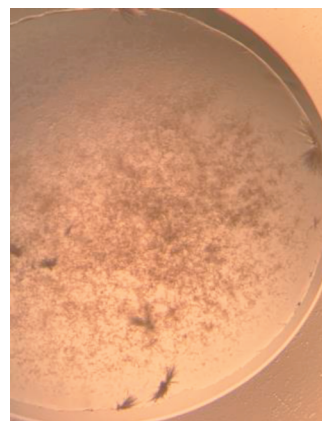


Рис. 2. Кристаллы аллергена Der p 3, полученные методом диффузии паров растворителя при использовании в качестве осадителя сульфата аммония.

сульфат аммония, 0.1 М цитрат натрия, pH 5.8, 0.6 М хлорида натрия, 4% 2-метил-2,4-пентандиола МПД. Кристаллы в виде игольчатых друз появлялись через три недели (рис. 2).

Сбор и обработка дифракционных данных. Дифракционный набор до разрешения 2.25 Å собран на синхротроне ESRF (Франция, станция ID23-1) при температуре 100 К. Перед получением дифракционного набора кристаллы замораживали в кристаллизационном растворе.

Дифракционные данные получали от одного кристалла методом вращения–качания при расстоянии между кристаллом и детектором 400 мм и длине волны 0.96772 Å; углы качания и вращения – 0.1° и 360° соответственно. Для регистрации отражений использовали детектор прямого действия Pilatus6MF. Обработку набора экспериментальных интенсивностей отражений проводили с помощью программы iMosflm [15]. Статистические характеристики дифракционных данных приведены в табл. 1. Кристаллы относятся к пр. гр. C121. В независимой части ячейки содержатся две молекулы фермента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Белок Der p 3 согласно анализу аминокислотной последовательности является сериновой протеазой группы трипсина. В нативных условиях он выделяется в виде предшественника про Der p 3, который активируется протеазой Der p 1 [16]. Согласно [16] Der p 3 не содержит потенциальных сайтов гликозилирования, хотя не исключены другие посттрансляционные модификации. Рекомбинантный Der p 3 получен в *Pichia pastoris* [17]. Было показано, что белок подвергается автолизу, поэтому наряду с нативным белком приготовлена мутантная форма S196A, в которой остаток серина активного центра заменен на аланин. Мутантная форма оказалась стабильной и способной связываться с IgE, поэтому она более подходит для использования при диагностике и иммунотерапии, чем природный белок.

В данной работе получен высокоэффективный штамм-продуцент C3029/pGro7/pERDerp3 аллергена Der p 3, продуцирующий рекомбинантный белок в *E. coli* в растворимой форме, и разработана методика очистки рекомбинантного аллергена. Ген, кодирующий аллерген Der p 3 из

Таблица 1. Статистические характеристики дифракционного набора

Пространственная группа	C121
$a, b, c, \text{Å}; \alpha, \beta, \gamma, \text{град}$	134.66, 44.65, 72.50; 90, 102.828, 90
Разрешение, Å	30.00–2.25 (2.31–2.25)
Количество независимых рефлексов	19143 (1393)
Полнота набора, %	96.3 (96.8)
$I/\sigma(I)$	6.63 (2.65)
R _{merge} -F, %	15.2 (53.2)

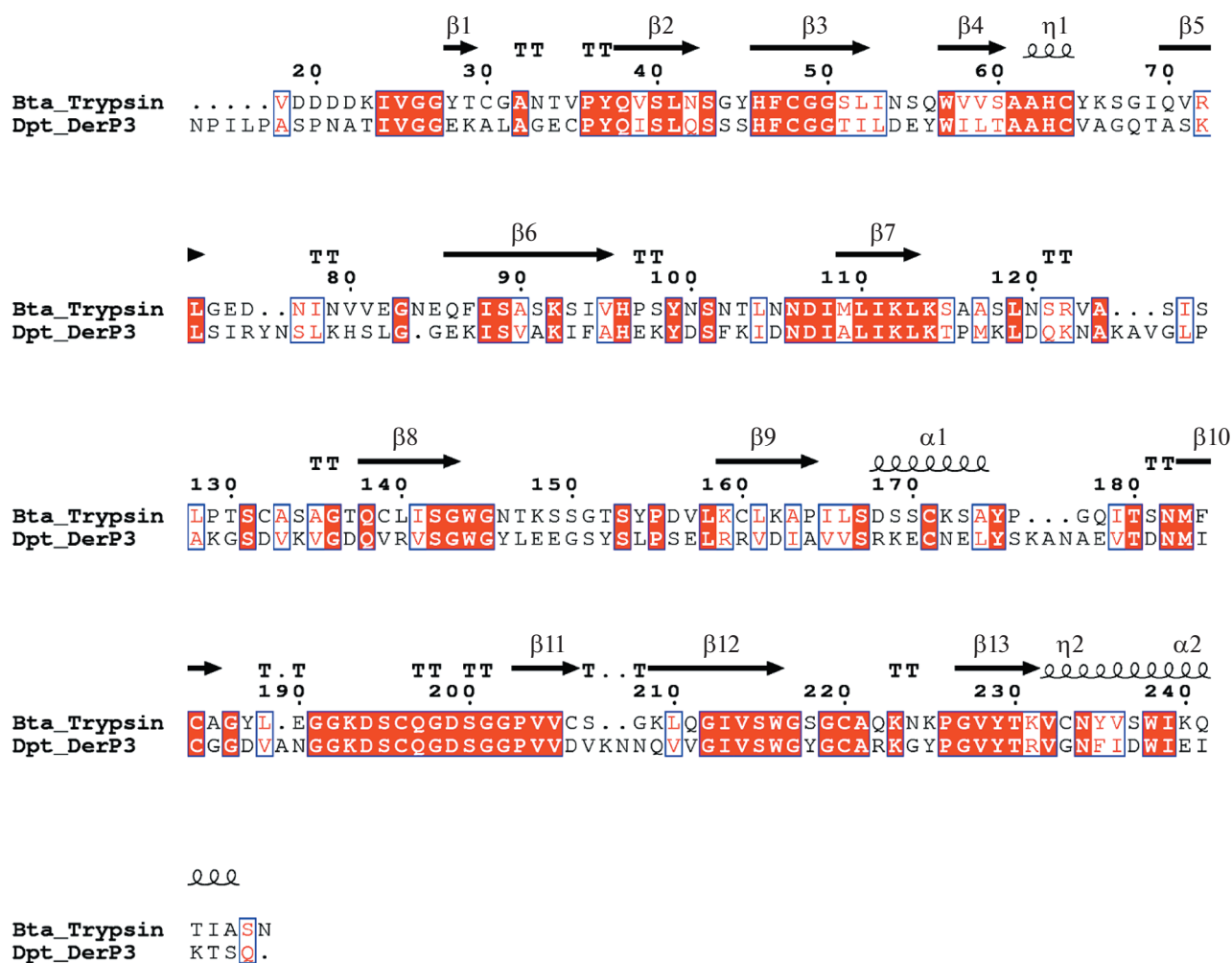


Рис. 3. Выравнивание аминокислотных последовательностей трипсина из *Bos taurus* и аллергена Der p 3 из *Dermatophagoides pteronyssinus*. Выравнивание построено при помощи ClustalW, визуализация – web-сервер ESPript3 (<https://esprict.ibcp.fr/ESPript/ESPript/index.php>).

Dermatophagoides pteronyssinus, получен методом обратной транскрипции на матрице мРНК, выделенной из клеща домашней пыли, и клонирован в плазмидный вектор рЕТ23a+ для прокариотической экспрессии в *E. coli*. В ходе культивирования клеточной культуры штамма-производителя *E. coli* C3029/pGro7, трансформированного плазмидным вектором рER-Derp3, целевой белок накапливался в растворимой форме. После разрушения клеточной биомассы осуществляли очистку Der p 3 посредством трех последовательных стадий катионообменной, металл-аффинной и гельпроницающей хроматографий. Разработанная методика позволяет получать препарат рекомбинантного аллергена Der p 3 из *Dermatophagoides pteronyssinus* 98%-ной чистоты с концентрацией 25 мг/мл (рис. 1).

По аминокислотному составу и молекулярной массе белок гомологичен бычьему трипсину (идентичность 41%). Выравнивание аминокис-

лотных последовательностей между трипсином из *Bos taurus* (Uniprot P00760) и объектом исследования представлено на рис. 3. Выравнивание содержит аннотацию элементов вторичной структуры бычьего трипсина в соответствии с кристаллической структурой из базы данных PDB (PDB_ID: 418H).

Раствор рекомбинантного белка использовали для получения кристаллов, пригодных для исследования пространственной структуры методом рентгеноструктурного анализа. Поиск условий кристаллизации проведен методом диффузии паров растворителя с использованием наборов фирмы Hampton Research и приготовленных вручную водно-солевых растворов. Кристаллы, использованные для рентгеновского исследования, получены из 1%-ного раствора белка в цитратном буфере, pH 5.8, с использованием в качестве раствора-осадителя сульфата аммония. Собранный от полученных кристаллов дифракционный набор

пригоден для определения пространственной структуры аллергена Der p 3 при разрешении 2.25 Å.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования в рамках Государственного задания ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Murphy K., Weaver C.* // *Janeway's Immunobiology*. 2017. 9th Edition. Garland Science, Taylor & Francis Group. 927 p.
2. *Bousquet P.-J., Chinn S., Janson C. et al.* // *European Community Respiratory Health Survey I. Allergy*. 2007. V. 62. P. 301.
<https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2006.01293.x>
3. *Gaffin J.M., Phipatanakul W.* // *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2009. V. 9. P. 128.
<https://doi.org/10.1097/aci.0b013e32832678b0>
4. *Gaffin J.M., Spergel J.M., Boguniewicz M. et al.* // *Allergy Asthma Proc.* 2012. V. 33. P. 282.
<https://doi.org/10.2500/aap.2012.33.3572>
5. *Cox L., Nelson H., Lockey R. et al.* // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2011. V. 127 (1 Suppl.). P. S1–55.
6. *Thomas W.R.* // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2011. V. 127. P. 855.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.12.1084>
7. *Pauli G., Malling H.J.* // *Curr. Top Microbiol. Immunol.* 2011. V. 352. P. 43.
https://doi.org/10.1007/82_2011_125
8. *Gregory L.G., Lloyd C.M.* // *Trends Immunol.* 2011. V. 32. P. 402.
<https://doi.org/10.1016/j.it.2011.06.006>
9. *Hales B.J., Martin A.C., Pearce L.J. et al.* // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2006. V. 118. P. 361.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2006.04.001>
10. *Weghofer M., Thomas W.R., Kronqvist M. et al.* // *Eur. J. Clin. Invest.* 2008. V. 38. P. 959.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2008.02048.x>
11. *King C., Brennan S., Thompson P.J., Stewart G.A.* // *J. Immunol.* 1998. V. 161. P. 3645.
12. *Sun G., Stacey M.A., Schmidt M. et al.* // *J. Immunol.* 2001. V. 167. P. 1014.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.2.1014>
13. *Lin Y.-P., Nelson C., Kramer H., Parekh A.B.* // *Mol. Cell.* 2018. V. 70 (2). P. 228.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.03.025>
14. *Ivanciuc O., Schein C.H., Braun W.* // *Bioinformatics.* 2002. V. 18. № 10. P. 1358.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/18.10.1358>
15. *Battye T.G., Kontogiannis L., Johnson O. et al.* // *Acta Cryst. D.* 2011. V. 67. P. 271.
<https://doi.org/10.1107/S0907444910048675>
16. *Smith W.A., Thomas W.R.* // *Clin. Exp. Allergy.* 1996. V. 26. P. 571.
17. *Bouaziz A., Walgraffe D., Bouillot C. et al.* // *Clin. Exp. Allergy.* 2015. V. 45. P. 823.
<https://doi.org/10.1111/cea.12452>