

Секция «Биоинженерия и биоинформатика»

Совместная экспрессия трех компонентов холестерингидроксилазной/лиазной системы в клетках *Escherichia coli*

Маслова А.О.¹, Макеева Д.С.²

1 - Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Факультет биоинженерии и биоинформатики, 2 - Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, Россия

E-mail: an.mslv@gmail.com

Первый этап стероидогенеза, лимитирующий скорость биосинтеза всех стероидных гормонов в организме млекопитающих, осуществляет митохондриальная холестерингидроксилазная/лиазная (ХГ/Л) система, включающая цитохром P450_{scc}, аденодоксинредуктазу (AdR) и аденодоксин (Ax), которые переносят электроны от NADPH на P450_{scc}, катализирующий превращение холестерина в прегненолон. Актуальность работы обусловлена интересом к сборке и функционированию сложных белковых комплексов и связана с решением конкретных биотехнологических задач, направленных на создание новых рекомбинантных штаммов микроорганизмов, способных осуществлять несвойственные им метаболические процессы.

Для совместной экспрессии трех белков ХГ/Л системы из митохондрий коры надпочечников быка в качестве организма-хозяина использовались клетки *E. coli* штамма DH5 α . Была сконструирована плазида pBar/AdR/Ax/P450_{scc}, в которой кДНК цитохрома P450_{scc}, AdR и Ax находятся в составе одной экспрессионной кассеты: считывание генов всех белков регулируется одним промотором и одним терминатором, в результате образуется одна мРНК, а присутствие сайтов связывания рибосомы перед иницирующими кодонами гетерологических генов обеспечивает синтез трех индивидуальных белков.

Показано, что в клетках *E. coli*, трансформированных плазмидой pBar/AdR/Ax/P450_{scc}, в условиях индукции транскрипции генов млекопитающих синтезируются полноразмерные рекомбинантные белки, взаимодействующие с антителами, специфичными к цитохрому P450_{scc}, AdR и Ax коры надпочечников быка, а их молекулярная масса соответствует массе белков-стандартов. Анализ проводили с помощью Ds-Na-PAAG-электрофореза белков клеточного гомогената с последующим иммуноблоттингом. При измерении активности ХГ/Л системы *in vitro* методом ELISA обнаружено, что она составляет 80 пкмоль/мин \times мг белка гомогената бактерий, культивируемых в течение 48 часов. Клетки полученного рекомбинантного штамма способны *in vivo* осуществлять биоконверсию холестерина в прегненолон: активность, измеренная с использованием метода HPLC, составила 0,42 мг прегненолона/л культуры за 24 часа. Активность *in vivo* данного штамма значительно выше активности штамма, созданного ранее (0,06 мг прегненолона/л культуры за 24 часа), осуществляющего экспрессию ХГ/Л системы, составленной из P450_{scc} быка и AdR и Ax человека [1]. Обнаружено, что решающее влияние на эффективность биоконверсии холестерина оказывает способ внесения субстрата.

Литература

1. Т.В. Шашкова, В.Н. Лузиков, Л.А. Новикова. Совместная экспрессия всех компонентов холестерингидроксилазной/лиазной системы в клетках *Escherichia coli* // Биохимия, 2006, том 71, вып. 7, с. 996-1001.

Слова благодарности

Хочется выразить слова благодарности Л.А. Новиковой за критическую оценку и помощь в проведенной работе. Благодарим сотрудников лаборатории микробиологической трансформации органических соединений ИБФМ им. Г.К. Скрыбина за измерение активности *in vivo* рекомбинантных штаммов.