

EKSPRESJA I OCZYSZCZENIE REKOMBINOWANEGO BIAŁKA FUZYJNEGO GST-PROTEAZA CYSTEINOWA *ANCYLOSTOMA* *CEYLANICUM*

MARCIN WIŚNIEWSKI¹, JULIUSZ MIESZCZANEK¹ I HALINA WĘDRYCHOWICZ^{1,2}

¹Zakład Parazytologii i Inwazjologii, SGGW, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa;

²Instytut Parazytologii im. Witolda Stefańskiego PAN, ul Twarda 51/55, 00-818 Warszawa

ABSTRACT. Expression and purification of the recombinant fusion protein GST-cysteine protease of *Ancylostoma ceylanicum*. cDNA encoding *Ancylostoma ceylanicum* cysteine protease (ACEY-1) was cloned into pGEX-4T eucaryotic expression vector then *E. coli* BL2 cells were transformed with the plasmid using electroporation method. The expression of the recombinant protein in liquid cultures was induced by the addition of IPTG. The Western blot analysis showed that the recombinated ACEY-1 may be solublised only partially at pH 7.4 which allowed affinity – purification of this protein using glutathione-sepharose column.

Key words: *Ancylostoma ceylanicum*, cystein proteinase, hookworm.

WSTĘP

Nicień *Ancylostoma ceylanicum* należy do rodziny *Ancylostomatidae* (tęgoryjce). Dorosłe osobniki pasożytują w jelicie cienkim ludzi, psów oraz chomików odżywiając się krwią i śluzówką jelita żywiciela. Szacuje się, że ponad milion ludzi na ziemi zarażonych jest tęgoryjcami (Hotez i Pritchard 1995). Inwazje te najczęściej mają przebieg chroniczny i szczególnie u dzieci, przyczyniają się do fizycznego wyniszczenia organizmu, a w konsekwencji do zaburzeń w rozwoju fizycznym i psychicznym. Zdolność do nabywania przez te nicienie oporności na antyhelminthyki, a także możliwość przechodzenia tęgoryjców w stadium larw drzemających, niewrażliwych na leki, zmusza do poszukiwania alternatywnych w stosunku do obecnie stosowanych, metod terapii i zapobiegania inwazjom tych pasożytów. Duże nadzieje wiąże się ze szczepionkami opartymi na rekombinowanych proteazach cysteinowych tegoryjców. Wykazano udział tych enzymów w odżywianiu się, migracji przez tkanki oraz w unikaniu efektów odpowiedzi immunologicznej żywiciela (Pritchard i wsp. 1990, Kumar i Pritchard 1992, Williamson i wsp. 2003). Badania Kofty i wsp. (2000) wykazały, że szczepionka zawierająca cDNA proteazy cysteinowej *Fasciola hepatica* wywoływała bardzo wysoką odporność żywicieli na

zarażenie metacerkariami tej przywry. Podobne wyniki (redukcja o 63 % liczby nicieni zasiedlających jelito) uzyskano immunizując chomiki cDNA proteazy cysteinowej *A. ceylanicum* (Mieszczanek i wsp. 2000a).

Wobec obaw opinii publicznej przed szczepionkami DNA, prowadzone są jednoczesne badania nad uzyskaniem rekombinowanych białek antygenów pasożytniczych w różnych układach ekspresyjnych. Celem podjętych badań było uzyskanie ekspresji proteazy cysteinowej *A. ceylanicum* (*acey-1* cDNA) w *Escherichia coli* oraz sprawdzenie możliwości oczyszczania fuzyjnego białka transferaza-S-glutatio-nowa-proteaza cysteinowa *A. ceylanicum* (GST-ACEY-1) metodą chromatografii powinowactwa.

MATERIAŁ I METODY

Klonowanie cDNA *Acey-1* w wektorze ekspresyjnym pGEX-4T

cDNA kodujące proteazę cysteinową *A. ceylanicum* (Mieszczanek i wsp. 2000b) namnożono metodą PCR z wykorzystaniem linker-starterów niosących miejsca restrykcyjne dla enzymów *Bam*HI i *Hind*III. Produkt PCR klonowano w bakteryjnym wektorze ekspresyjnym pGEX-4T (Pharmacia) trawionym odpowiednio enzymami *Bam*HI i *Hind*III. Bakterie *E. coli* szczepu BL2 transformowano rekombinowanym plazmidem przy użyciu elektransformatora Electro Cell Manipulator ECM 600 (BTX) zgodnie z instrukcją producenta. Obecność zrekombinowanych plazmidów w koloniach bakterii potwierdzono poprzez oczyszczenie ich z bakterii i trawienie enzymami *Bam*HI i *Hind*III. Produkty analizy restrykcyjnej rozdzielono elektroforytycznie w 1% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny.

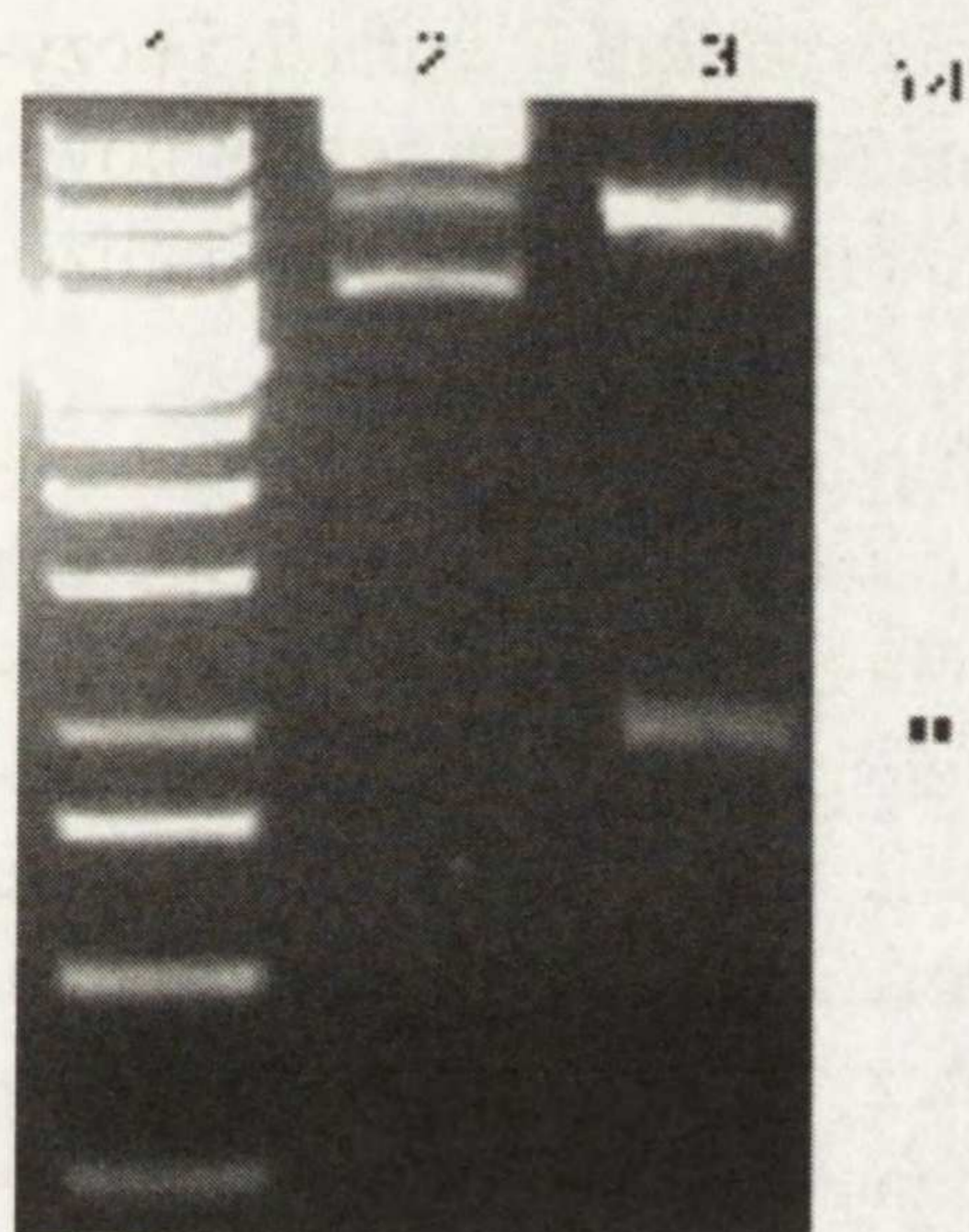
Ekspresja cDNA *Acey-1* w bakteriach *E. coli* szczepu BL2

Tysiąc mililitrów pożywki LB zaszczipiono 18 godziną hodowlą transformowanych bakterii niosących plazmid pGEX-4T-PC (pGEX-4T zawierający cDNA proteiny cysteinowej *A. ceylanicum*).

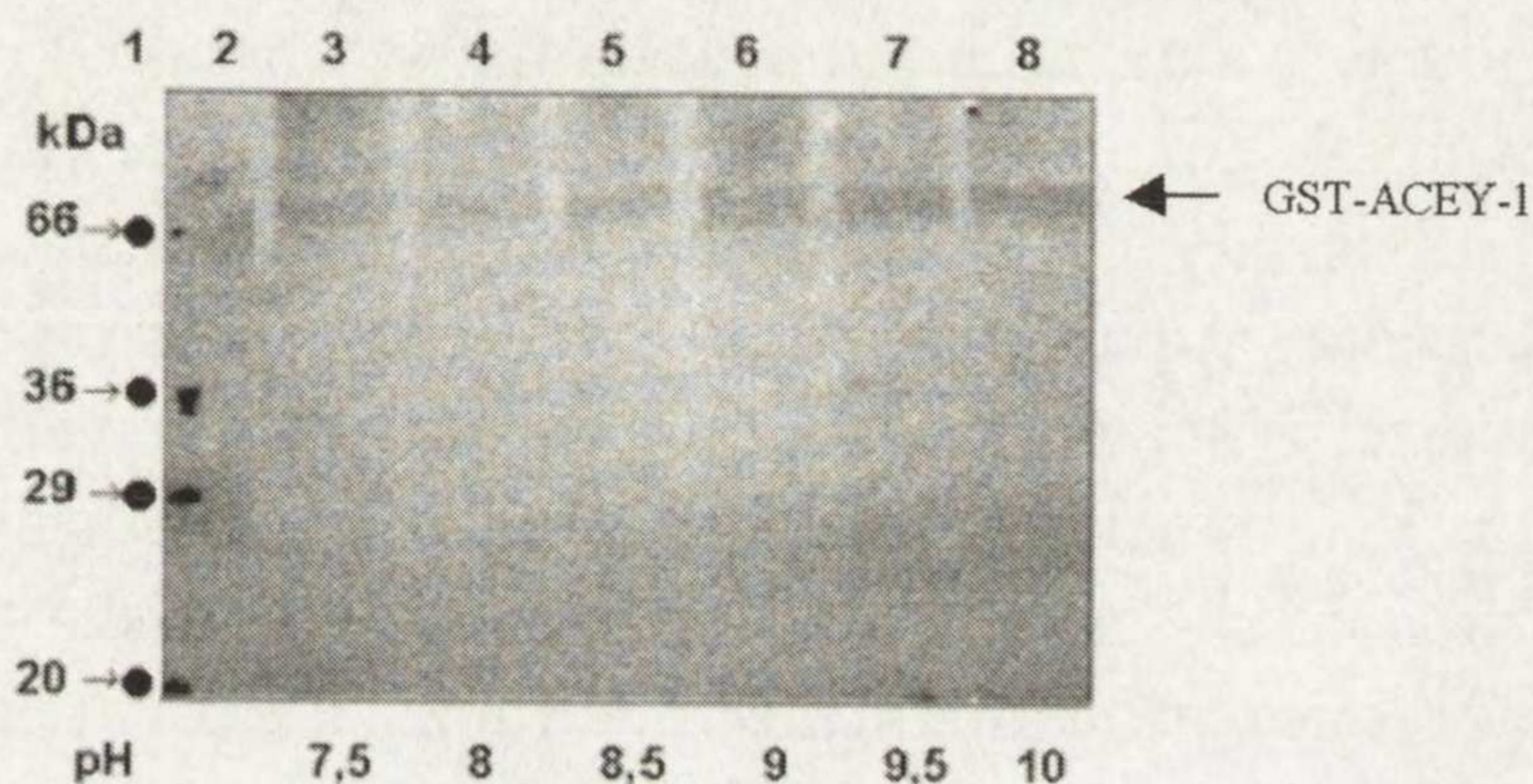
Bakterie hodowano do gęstości $OD_{600}=0,6$ (37°C, 180 rpm). Ekspresję *acey-1*cDNA pobudzo no poprzez dodanie do pożywki IPTG (100 (M)). Hodowlę kontynuowano w temp. pokojowej przez kolejne 3 godziny. Osad bakteryjny odwirowano (5000 x g, 10 min) i przepłukano dwukrotnie zimnym buforem PBS. Lizę bakterii prowadzono w 20 ml PBS z dodatkiem DTT (5 mM), lizozymu (0,1 mg/ml), DNAzy I (0,01 mg/ml), PMSF (5 μM) w 37°C przez 2 godziny.

Określenie rozpuszczalności rekombinowanego białka

Poprzez dodanie 2M NaOH do lizatu przygotowano 7 próbek o różnym pH: 7; 7,5; 8; 8,5; 9; 9,5; 10. Lizat inkubowano przez 2 h w 37°C, a następnie odwirowano (15 000 x g, 15 min, 4°C). 40 μl supernatantu z poszczególnych próbek rozdzielono metodą SDS-PAGE w 12,5% żelu poliakrylamidowym (100 V, 1,5 h). Rozdzielone w żelu białka przeniesiono na nitrocelulozę. Transfer przeprowadzono w buforze do transferu (14,4 g glicyna, 3,32 g Tris, 50 ml metanol na 1 litr buforu)



Rys. 1. Analiza restrykcyjna rekombinowanego plazmidu pGEX-4T niosącego cDNA kodujące proteazę cysteinową *A. ceylanicum*. Ścieżka 1- wzorzec mas molekularnych 1 kb; ścieżka 2 – pGEX-4T- PC nietrawiony enzymami; ścieżka 3 – pGEX-4T-PC trawiony enzymami *Bam*HI i *Hind*III.



Rys. 2. Analiza rozpuszczalności białka fuzyjnego GST-ACEY-1 metodą Western - blot. Ścieżka 1 - wzorzec mas cząsteczkowych; ścieżki 2-10 - białka inkubowane w buforze o pH odpowiednio od 7 do 10.

pod napięciem 100 V przez 70 minut. Nitrocelulozę inkubowano w 5% odtłuszczonego mleku w buforze TBS przez 30 minut. Po tym czasie przeprowadzono w temperaturze pokojowej godzinną inkubację w 2 ml króliczej surowicy (1:3000), zawierającej przeciwciała anty-GST. Nadmiar przeciwciał pięciokrotnie odpłukano w 70 ml buforu TBS (5 x 5 minut, RT). Następnie nitrocelulozę inkubowano w 2 ml owczej anty-króliczej surowicy sprzęgniętej z peroksydazą chrzanową (1:5000). Podobnie jak poprzednio, odpłukano nadmiar przeciwciał i filtr przełożono do roztworu detekcyjnego, zawierającego 4- α -chloro-naphthol (Sigma; 20 min.).

Oczyszczanie fuzyjnego białka metodą chromatografii powinowactwa

Supernatant o pH 7,5 nałożono na kolumnę wypełnioną sefarozą związaną kowalencyjnie z glutationem. Kolumnę przepłukano 20 ml PBS. Elucję prowadzono w 2 ml buforu elucyjnego. Zebrano dziesięć frakcji o objętości 200 μ l każda, które analizowano metodą SDS-PAGE.

WYNIKI I DYSKUSJA

cDNA kodujące proteazę cysteinową *A. ceylanicum* namnożono metodą PCR i klonowano w prokariotycznym plazmidzie ekspresyjnym pGEX-4T. Obecność *acey-1* w wektorze potwierdzono analizą restrykcyjną (Rys. 1).

Poprzez inkubację GST-ACEY-1 w buforach o różnym pH wykazano, że analizowane białko hybrydowe wykazuje największą rozpuszczalność w pH zasado-

wym: 9,5-10 (Rys. 2). Na skutek nadmiernego wytrącania się białka w pH 7,5 oczyszczanie go z zanieczyszczeń białkami bakteryjnymi metodą chromatografii powinowactwa na kolumnie z glutation-sefarozą było bardzo mało wydajne i w analizowanych frakcjach elucyjnych stwierdzano jedynie śladowe jego ilości.

Niestety, różnice w modyfikacjach potranslacyjnych pomiędzy Procaryota i Eucaryota sprawiają, że większość białek eukariotycznych, szczególnie wykazujących właściwości enzymatyczne, uzyskiwanych w bakteryjnych układach ekspresyjnych, jest nierozpuszczalna. Z tego też powodu system ekspresji i oczyszczania sfuzgowanych z GST białek, ze względu na niską tolerancję na białka rozpuszczalne w środowisku innym niż neutralne, nie zawsze jest możliwy do wykorzystania. Podobne obserwacje zostały poczynione w przypadku oczyszczania proteazy cysteinowej *F. hepatica*, gdzie w analogiczny sposób otrzymane białko wykazywało rozpuszczalność tylko w pH wyższym niż 9, dlatego też w dalszych badaniach do oczyszczania badanego enzymu zastosowano metodę elektroelucji (Wędrychowicz i wsp. 2003).

LITERATURA

- Hotez P.J., Pritchard D.I. 1995. Hookworm infection. *Scientific American* 272: 68-74.
- Kofta W., Mieszczanek J., Płucienniczak G., Wędrychowicz H. 2000. Successful DNA immunisation of rats against fasciolosis. *Vaccine* 18: 2985-2990.
- Kumar S., Pritchard D.I. 1992. The partial characterization of proteases present in the excretory/secretory products and exsheathing fluid of the infective (L3) larva *Necator americanus*. *International Journal for Parasitology* 22: 563-572.
- Mieszczanek J., Kofta W., Wędrychowicz H. 2000a. Vaccination against *Ancylostoma ceylanicum* using cDNA or protein form of adult nematode proteinase. *Acta Parasitologica* 45: 253.
- Mieszczanek J., Kofta W., Wędrychowicz H. 2000b. Molecular cloning of a cysteine proteinase cDNA from adult *Ancylostoma ceylanicum* by the method of rapid amplification of cDNA ends using polymerase chain reaction. *Parasitology Research* 86: 993-998.
- Pritchard D.I., McKean P.G., Schad G.A. 1990. An immunological and biochemical comparison of hookworm species. *Parasitology Today* 6: 154-156.
- Wędrychowicz H., Lamparska M., Kęsik M., Kotomski G., Mieszczanek J., Jedlina-Panasiuk L., Płucienniczak A. 2003. The immune response of rats to vaccination with the cDNA or protein forms of the cysteine proteinase of *Fasciola hepatica*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 94: 83-93.
- Williamson A.L., Brindley P.J., Knox D.P., Hotez P.J., Loukas A. 2003. Digestive proteases of blood-feeding nematodes. *Trends in Parasitology* 9: 417-423.

Zaakceptowano do druku 26.05.2004