

## **ВЛИЯНИЕ РАСПОЛОЖЕНИЯ ПОЛИГИСТИДИНОВЫХ ТЭГОВ НА ЭКСПРЕССИЮ В *E. coli* ОРФАННОГО БЕЛКА ЧЕЛОВЕКА PBOV1**

**Мешечко М. И.**

**Научный руководитель – к. б. н. Аль-Шехадат Р. И.**

<sup>1</sup>Университет ИТМО

336825@edu.itmo.ru

### **Введение**

PBOV1 (prostate breast overexpressed protein) — белок, экспрессируемый с РНК, полученной трансляцией с интрона, подвергнувшегося генным мутациям — несколькими сдвигам рамки считывания и мутации стоп-кодона. Помимо описанных в первых исследованиях локализациях гена PBOV1, его экспрессия была отмечена во многих опухолях, представленных в панелях кДНК.

Высокий уровень экспрессии белка PBOV1 в тканях онкологических опухолей, согласно исследованиям [1, 2], коррелирует с позитивным исходом заболевания, согласно работе [3] — с негативным. Отмечена также наличие корреляции между уровнем PBOV1 и уровнем гормонов: в присутствии эстрадиола экспрессия гена снижается [4].

PBOV1 может быть использован как один из маркеров для диагностики онкологических заболеваний по причине высокой специфичности для опухолей, а также по причине наличия корреляции с факторами течения заболеваний. Рекомбинантный PBOV1 и полученное к нему антитело способны найти применение в диагностике онкологических заболеваний наряду с другими маркерами.

Расположение нуклеотидов, кодирующих полигистидиновый тэг, предназначенный для очистки получаемого рекомбинантного белка методом металл-аффинной хроматографии, с N- или C-конца получаемого белка влияет свойства нарабатываемого белка, такие как стабильность, растворимость и правильность образования третичной структуры, обуславливающую пригодность к очистке методом металл-аффинной хроматографии. Помимо качественных характеристик, расположение полигистидинового тэга влияет на уровень экспрессии белка в клетке вследствие возникновения альтернативного сплайсинга [5]. Появление различных вариантов мРНК также может влиять рост и развитие бактериальных клеток, число копий рекомбинантной плазмиды [6].

Цель исследования — оценка влияния расположения полигистидинового тэга на выход рекомбинантного PBOV1 в различных штаммах кишечной палочки.

### **Основная часть**

В ходе работы были созданы два варианта плазмиды, различающиеся расположением полигистидинового тэга: в варианте плазмиды pET-28a-6×His-PBOV1 расположен с C-конца, в pET-28a-PBOV1-6×His тэг — с N-конца. При культивировании на агаризованной среде было отмечено, что одиночные колонии были получены при трансформации плазмидой pET-28a-PBOV1-6×His всех указанных выше штаммов, трансформации pET-28a-6×His-PBOV1 — только штаммов BL21(DE3)pLysS и C41. При культивировании в жидкой среде оптическая плотность культуры штамма BL21(DE3)pLysS, трансформированного плазмидой pET-28a-PBOV1-6×His, превысила оптическую плотность культуры штамма, трансформированного плазмидой pET-28a-6×His-PBOV1 более чем в 2 раза: 13,1 против 6,2. При культивировании клеток, полученных трансформацией штамма C41, оптическая плотность составила 8,7 для штамма, трансформированного плазмидой pET-28a-PBOV1-6×His, и 8,1 для штамма pET-28a-6×His-PBOV1. Растворимость белка, полученного в штаммах BL21(DE3)pLysS,

трансформированных плазмидой рЕТ-28а-РВОВ1-6×His, составила 55,6 %, уровень экспрессии целевого белка в указанно штамме составил 29,1 %; растворимость белка в штаммах, полученных трансформацией компетентных клеток плазмидой рЕТ-28а-6×His-РВОВ1, не превышала 4 %.

### **Вывод**

Наиболее пригодным для дальнейшей работы как с точки зрения ростовых характеристик, так и с точки зрения свойств белка (уровня экспрессии и уровня растворимости) является штамм, полученный путем трансформации клеток BL21(DE3)pLysS плазмидой рЕТ-28а-РВОВ1-6×His, имеющей расположение полигистидинового тэга с С-конца. Полученный штамм может быть применен для препаративного получения рекомбинантного белка РВОВ1.

### **Литература**

1. Wang L., Niu C.-H., Wu S. PBOV1 correlates with progression of ovarian cancer and inhibits proliferation of ovarian cancer cells // *Oncology Reports*. 2016. Vol. 35, no. 1. P. 488-496.
2. Samusik N. Krukovskaya L., Meln I. PBOV1 Is a Human De Novo Gene with Tumor-Specific Expression That Is Associated with a Positive Clinical Outcome of Cancer // *PLOS ONE*. 2013. Vol. 8, no. 2. P. e56162.
3. Xue C. Zhong Z., Ye S. Association between the overexpression of PBOV1 and the prognosis of patients with hepatocellular carcinoma // *Oncology Letters*. 2018. Vol. 16, no. 3. P. 3401-3407.
4. Kamagata C. Tsuji N., Kondoh K. Enhanced expression of the UROC28 gene in human breast cancer: relationship to ERBB2 gene expression // *Anticancer Research*. 2002. – Vol. 22, no. 6C. P. 4087-4091.
5. Booth W. T., Schlachter C. R., Pote S. Impact of an N-terminal Polyhistidine Tag on Protein Thermal Stability // *ACS Omega*. 2018. Vol. 3, no. 1. P. 760-768.
6. Kutysenko V. P., Mikoulinskaia G. V., Chernyshov S. V. Effect of C-terminal His-tag and purification routine on the activity and structure of the metalloenzyme, l-alanyl-d-glutamate peptidase of the bacteriophage T5 // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019. Vol. 124. P. 810-818.