



ПОЛУЧЕНИЕ СЕКРЕТИРУЕМЫХ БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА NOGGIN И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ИХ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

© 2013 г. Ф. М. Ерошкин, А. В. Байрамов, О. В. Аверьянова, Е. А. Соловьева, М. В. Серебрякова, А. Г. Зарайский, Н. Ю. Мартынова[#]

Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 02.11.2012 г. Принята к печати 07.11.2012 г.

Разработаны методики получения рекомбинантных физиологически активных белков семейства Noggin (Noggin1 и Noggin2) шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*, способных взаимодействовать с факторами BMP суперсемейства TGF-beta. Для экспрессии белков Noggin1 и Noggin2 были созданы конструкции, позволяющие нарабатывать их с микроинъектированными синтетическими мРНК непосредственно в клетках развивающихся зародышей шпорцевой лягушки, а также в прокариотической системе экспрессии. Целевые белки содержали на N-конце по три олигопептидных Мус-эпитопа. Введение таких “меток” позволило сравнить уровень экспрессии белков Noggin1 и Noggin2, выделить их на аффинном иммуносорбенте и показать биологическую активность выделенных Noggin-белков путем анализа их способности связывать фактор BMP4 суперсемейства TGF-beta методом коиммунопреципитации.

Ключевые слова: *Noggin1, Noggin2, сигнальный каскад, люциферазный репортер, эмбриогенез.*

DOI: 10.7868/S0132342313020048

Регуляция активности внутриклеточных сигнальных каскадов осуществляется при помощи секреторных белков, активирующих или подавляющих тот или иной каскад. Для гибкого управления сигнальными каскадами важно иметь в распоряжении широкий спектр подобных белков-регуляторов.

По данным, полученным в нашей лаборатории, секретлируемые белки-регуляторы Noggin1 и Noggin2 могут участвовать в ингибировании сразу трех сигнальных каскадов – BMP, Nodal/Activin и Wnt [1, 2], одновременное подавление активности которых необходимо для формирования переднеголовных структур эмбрионов позвоночных.

В перспективе это открывает возможности использования этих белков в качестве индукторов для превращения эмбриональных стволовых клеток в клетки больших полушарий мозга [3, 4].

Сокращения: BMP – bone morphogenetic protein; TGF – трансформирующий ростовой фактор (transforming growth factor); Xnr2 – *xenopus nodal-related*.

[#]Автор для связи (тел: (495)-336-86-11; эл. почта: martnat61@yahoo.com).

Выделение эндогенных белков семейства Noggin из развивающихся зародышей практически невозможно, поскольку они экспрессируются в пиколярных концентрациях на определенных стадиях эмбриогенеза в локальных группах клеток зародыша и быстро подвергаются деградации [5]. В связи с этим, мы попытались получить рекомбинантные белки Noggin, первоначально используя бактериальную экспрессирующую систему.

С этой целью нами были получены экспрессионные конструкции, содержащие кДНК *Noggin1* и *Noggin2* в одной рамке считывания с последовательностью, кодирующей антигенную детерминанту из 6 остатков гистидина. Для этого фрагменты кДНК *Noggin1* и *Noggin2*, содержащие полные рамки считывания, получали с помощью ПЦР с праймерами (5'-3'):

для *Noggin1*: ATA AGA TCT CAA CAT TAT
CTG CAC ATC AGA (прямой)

ATT CTC GAG CTC CAG CAT GAG CAT TTG
CA (обратный);

для *Noggin2*: ATA GGA TCC CAG CCT TAT
CTC AGG CTT AG (прямой)

ATT CTC GAG TTA GCA TGA ACA CTT ACA
CTC TG (обратный).

Полученные кДНК клонировали по сайтам рестрикции BamHI Sall/XhoI в векторе pQE-80 (QIAGEN) и экспрессировали в *E. coli*, штамм DH-5 α . Корректность полученных кДНК была оценена путем секвенирования. Уровень экспрессии рекомбинантных белков с 1 л культуры составил 200–250 мкг белка для Noggin1 и менее 100 мкг для Noggin2. Поскольку оба белка экспрессировались с образованием телец включения, они были выделены по стандартному протоколу для выделения белков в денатурирующих условиях с 8 М мочевиной QIAexpressionist (QIAGEN) и ренатурированы в буфере следующего состава: 1.5 М гуанидин-HCl; 50 мМ Трис-HCl, pH 8.0; 1 мМ EDTA, содержащем 2 мМ восстановленный и 0.2 мМ окисленный глутатион, в течении 72 ч при 4°C. После ренатурации белки были переведены при помощи диализа в Noggin-буфер, содержащий 5 мМ цитрат натрия, pH 6.8; 150 мМ NaCl, 1 мМ ацетат магния; 20% глицерина и 0.02% CHAPS.

Полученные белки имели чистоту 80% по данным электрофореза в ПААГ (рис. 1а, слева).

Поскольку основной физиологической функцией белков Noggin является их способность к связыванию с ростовыми факторами TGF- β семейства BMP, активность полученных белков контролировали по их взаимодействию с фактором этого семейства – BMP4. Данный фактор был получен по разработанной ранее методике [2, 6] в виде белка, меченного олигопептидной антигенной детерминантой (FLAG-пептидом) по N-концу, в составе лизата зародышей *Xenopus laevis*, микроинъецированных кодирующей этот белок FLAG-BMP4-мРНК.

Проведенный методом коиммунопреципитации анализ биологической активности показал, что только рекомбинантный 6His-Noggin1 обла-

дает способностью связывать молекулы FLAG-BMP4 (рис. 1а, правый). При этом полученный в прокариотической системе экспрессии рекомбинантный белок 6His-Noggin2 после ренатурации не восстановил своей активности.

В связи с этим, нами была разработана эукариотическая система экспрессии в развивающихся зародышах шпорцевой лягушки, использующая синтетические мРНК, кодирующие белки Noggin с присоединенными к ним олигопептидными антигенными детерминантами Мус, к которым доступны коммерческие моноклональные антитела (Sigma). Преимуществом этой экспрессирующей системы является ее высокая способность к посттрансляционным модификациям целевых белков, таким как гликозилирование, фосфорилирование, протеолитическое удаление сигнальных пептидов [7].

Сложность поставленной задачи состояла в том, что секретлируемые факторы Noggin синтезируются в эукариотических клетках в форме про-белка (рис. 2) и в дальнейшем подвергаются процессингу, в ходе которого происходит отщепление сигнальной последовательности на N-конце. Этот факт не позволяет вводить полипептидную метку в N-конец белка (5'-область мРНК).

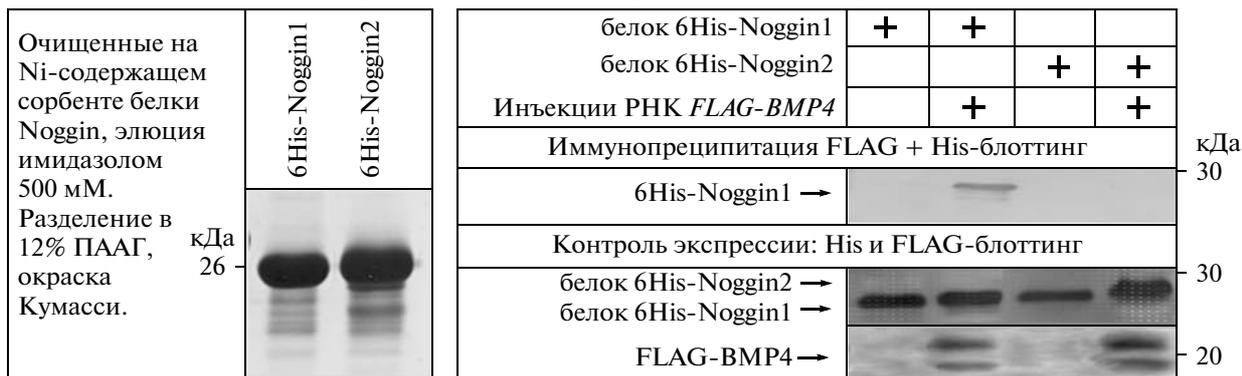
С другой стороны, по данным кристаллографических исследований [8], введение метки в C-концевую область может влиять на способность белков димеризоваться, либо метка будет маскироваться при димеризации белка.

Поэтому нами были созданы такие кДНК-конструкции, которые позволили получать синтетические мРНК, кодирующие Noggin1 и Noggin2 в виде гибридов с тремя Мус-эпитопами, расположенными непосредственно за N-концевыми сигнальными последовательностями белков Noggin.

Рис. 1. Анализ чистоты выделенных белков Noggin в бактериальной и эукариотической системе экспрессии (ПААГ-электрофорез) и определение их активности методами коиммунопреципитации и люциферазных репортерных систем. (а). Слева: электрофорез очищенных белков 6His-Noggin1 и 6His-Noggin2. Белки получали в бактериальной системе *E. coli* и очищали с использованием металлохелатной аффинной хроматографии на Ni-агарозе (Sigma); справа: коиммунопреципитация 6His-Noggin1 с белком FLAG-BMP4. Очищенные белки 6His-Noggin1 и 6His-Noggin2 смешивали с лизатом зародышей *X. laevis*, микроинъецированных FLAG-BMP4-мРНК, осаждали иммобилизованными FLAG-антителами и детектировали при помощи анти-6His-антител. Нижний рисунок: электрофорез с блоттингом белков, использованных для коиммунопреципитации, детекцию очищенных белков проводили при помощи анти-Мус-антител. (б). Слева: электрофорез очищенных белков Мус-Noggin1 и Мус-Noggin2. Белки получали трансляцией синтетических мРНК в развивающихся эмбрионах *X. laevis* и очищали на иммуносорбенте с ковалентно пришитыми анти-Мус-антителами; справа: коиммунопреципитация белков Мус-Noggin1 и Мус-Noggin2 с FLAG-BMP4. Очищенные белки смешивали с лизатом зародышей *X. laevis*, микроинъецированных FLAG-BMP4-мРНК, осаждали иммобилизованными на носителе FLAG-антителами и детектировали при помощи анти-Мус-антител. Нижний рисунок: электрофорез с блоттингом белков, использованных для коиммунопреципитации, детекцию очищенных белков проводили при помощи анти-Мус-антител. (в). Сравнение ингибиторной активности белков Мус-Noggin1 и Мус-Noggin2, с активностью нативных белков Noggin1 и Noggin2. Первая диаграмма приведена для активинового сигнального каскада. Репортер pARE-Luc был активирован фактором Xnr2. Вторая диаграмма – для канонического Wnt-каскада. Репортер pTOPFlash был активирован фактором xWnt8. По оси ординат обозначена люциферазная активность, нормализованная по активности β -галактозидазы, экспрессированной с коинъецированной плазмиды. По оси абсцисс – микроинъецированные мРНК. Черточками показано стандартное отклонение.

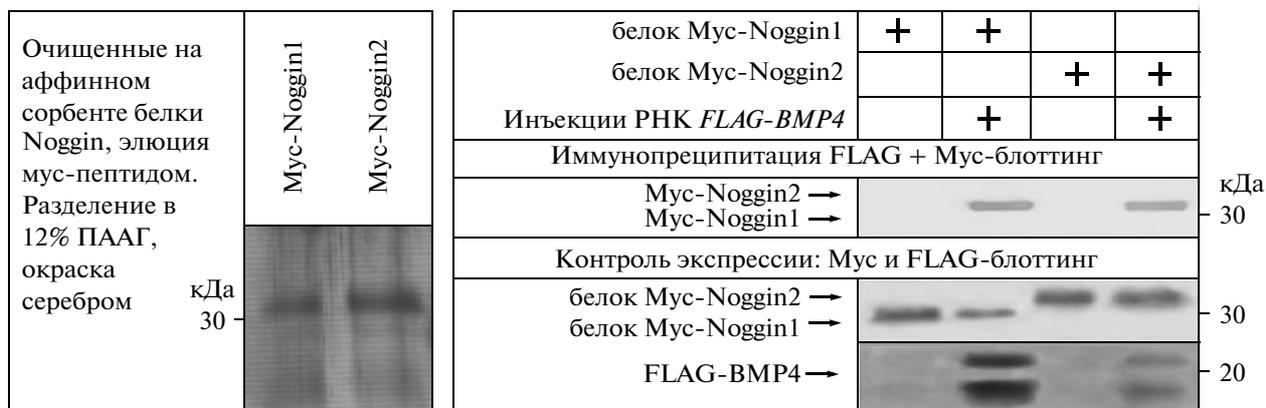
(а)

Бактериальная система экспрессии белков Noggin



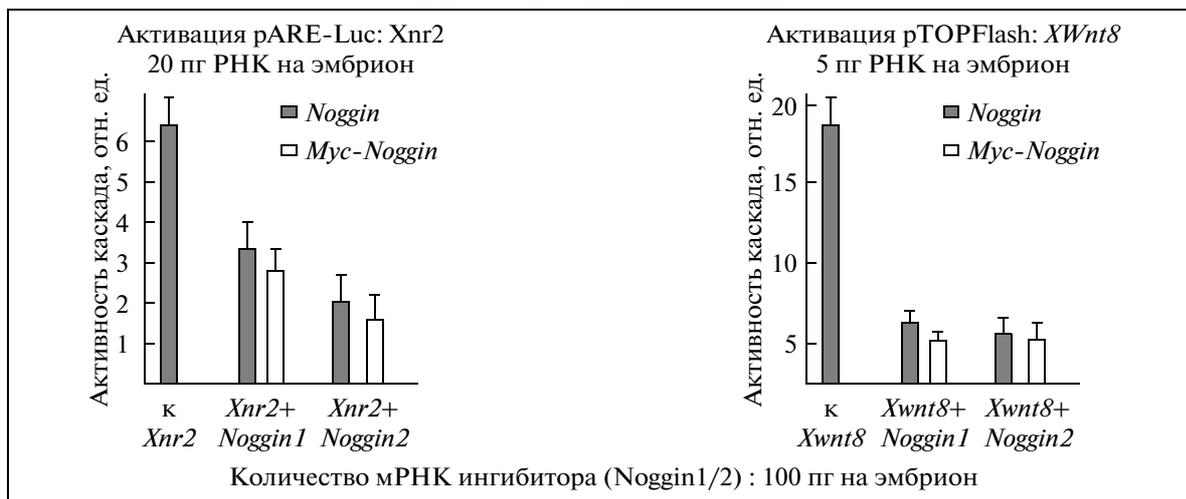
(б)

Белки Мус-Noggin, экспрессированные в зародышах *X. laevis*



(в)

Сравнение физиологической активности нативных и гибридных, содержащих мус-эпитопы, белков Noggin с использованием люциферазных репортерных конструкций.



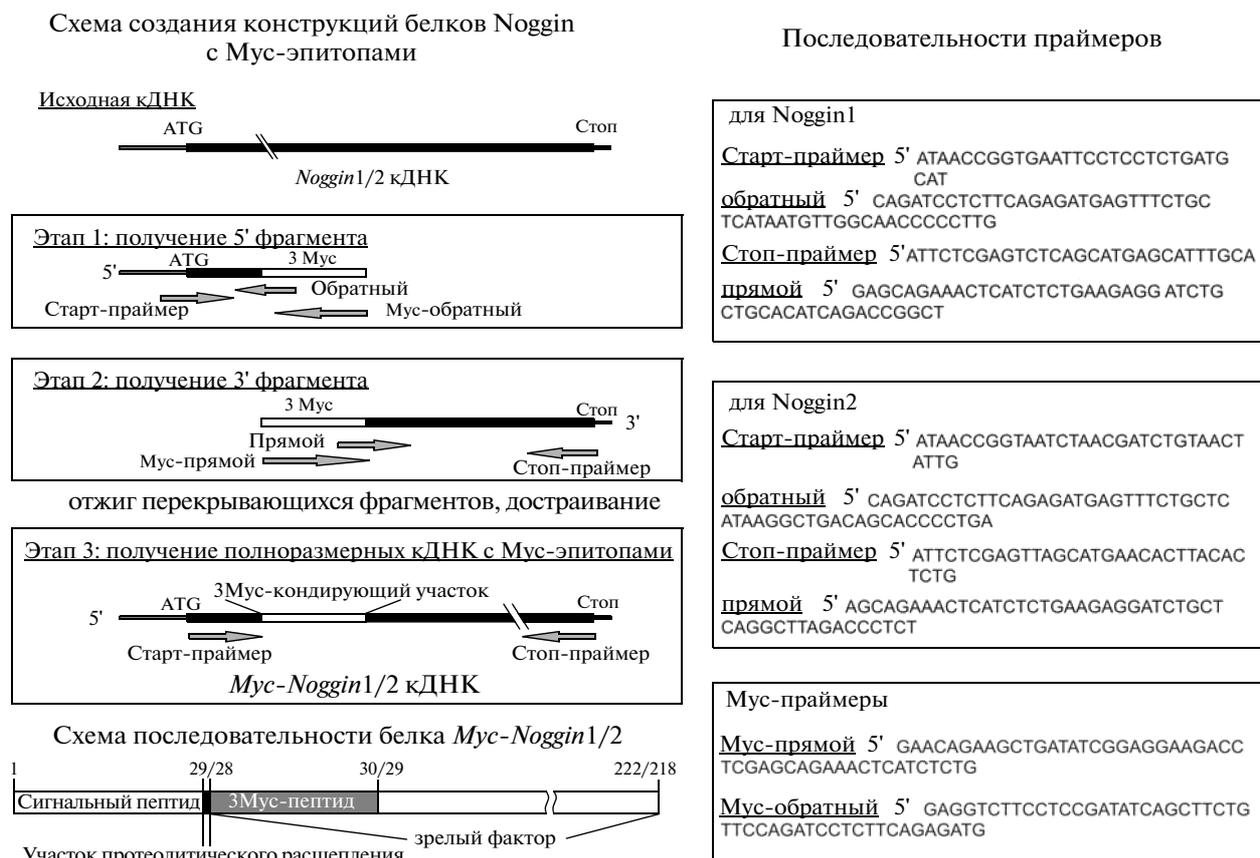


Рис. 2. Схема создания конструкций для получения синтетических мРНК, кодирующих белки Мус-Noggin1 и Мус-Noggin2, которые содержат три тандемно расположенных Мус-эпитопа на N-конце зрелого белка. Справа представлены последовательности праймеров, использованных для введения Мус-эпитопов.

На первом этапе были получены 5'-концевые фрагменты кДНК, кодирующие сигнальные последовательности в одной рамке считывания с последовательностями, соответствующими Мус-эпитопам на 3'-конце (здесь и далее см. рис. 2). На втором этапе были получены 3'-концевые фрагменты, кодирующие зрелые белки с последовательностями, соответствующими Мус-эпитопам на 5'-конце. На третьем этапе были получены полные кДНК-последовательности, кодирующие факторы Мус-Noggin1 и Мус-Noggin2 (на рис. 2 обозначены как Мус-Noggin1/2), имеющие последовательности, соответствующие трем Мус-эпитопам, сразу за сайтом протеолитического отщепления сигнального пептида. Полученные фрагменты были смешаны, денатурированы при 95°C, отождены снижением температуры до 60°C и достроены с помощью высокоточной полимеразы Tersus (Evrogen) при 72°C. Полученная смесь рекомбинированных фрагментов использовалась в качестве матрицы для ПЦР с праймеров, соот-

ветствующих областям 5'-старт- и 3'-стоп-кодонов в кДНК-последовательностях *Noggin*-белков.

ПЦР-фрагменты, кодирующие полноразмерные *Noggin*-белки с Мус-эпитопами, были лигированы по сайтам рестрикции AgeI/XhoI (сайт AgeI достроен фрагментом Кленова) в плазмиду pCS2 по сайтам BamHI/XhoI (сайт BamHI достроена фрагментом Кленова). Правильность последовательностей кДНК *Мус-Noggin1* и *Мус-Noggin2* была подтверждена методом секвенирования.

Полученные конструкции линейаризовали рестриктазой NotI и использовали в качестве матрицы для синтеза экзипированных синтетических мРНК при помощи коммерческой системы mMESSAGE NASINE (Ambion) для SP6-РНК-полимеразы. Для доставки конструкций, кодирующих исследуемые белки в зародыши, использовали метод микроинъекций. Синтетические мРНК (100 нг РНК в 1 мкл) в смеси с флуоресцентным красителем FLD (Fluorescein lysine dextran) микроинъекцировали в развивающиеся зароды-

дыши шпорцевой лягушки в соответствии с разработанной нами ранее методикой [2, 6].

По достижении зародышами стадии гастрюлы (15–17 ч) получали лизат из зародышей при помощи гомогенизации в лизис-буфере (137 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, 1.5 мМ KH_2PO_4 , 8.1 мМ Na_2HPO_4 , 0.1% Triton X-100, смесь ингибиторов протеиназ (Sigma) 1 : 50), который добавляли в расчете 500 мкл на 50 зародышей, и последующего центрифугирования 30 мин при 12 тыс. об/мин. Из полученного супернатанта белки выделяли при помощи коммерчески доступного иммуносорбента – EZview™ Red Anti-c-Myc Affinity Gel (Sigma) с иммобилизованными на агарозном носителе моноклональными анти-Myc-антителами. Уравновешенную лизис-буфером аффинную смолу (100 мкл) инкубировали с лизатом зародышей (1 мл) в течение 12 ч при 4°C.

После инкубации несвязавшиеся белки удаляли 5-кратным отмыванием смолы лизис-буфером (5 × 1 мл). Специфическую элюцию проводили при помощи инкубации смолы с раствором Мус-пептида (100 мкг/мл) в течение 30 мин при комнатной температуре. Кроме этого, применяли менее специфическую элюцию путем нарушения взаимодействия антиген-антитело в условиях высоких значений pH (0.1 М аммонийный буфер, pH 10). Чистота полученных белков (ПААГ-электрофорез) составила не менее 70% (рис 1б, слева).

Биологическая активность выделенных белков была подтверждена методом коиммунопреципитации. Было показано, что полученные в эукариотической системе экспрессии и выделенные на аффинном иммуносорбенте белки Мус-Noggin1 и Мус-Noggin2 обладают способностью к взаимодействию с фактором FLAG-BMP4, который получен указанным ранее методом (рис 1б, справа). Влияние на формирование нервной системы белков, содержащих Мус-эпитопы, после микроинъекций соответствующих мРНК в зародыши можно наблюдать по специфическим фенотипическим эффектам, которые подробно описаны в работе [2]. Количественная оценка уровня физиологической активности полученных рекомбинантных Мус-Noggin-белков была проведена согласно разработанной нами ранее методике, основанной на способности Noggin связывать регуляторные факторы и подавлять активацию люциферазных репортерных конструкций, специфичных для определённого сигнального каскада [1].

В данном эксперименте для активации *Activin/Nodal*-каскада мы использовали фактор *Xnr2*, уровень активности меченых Мус-Noggin1/2 определяли по подавлению активности специфического для этого каскада репортера

pARE-Luc (рис 1в, левая диаграмма). Также было проверено влияние полученных белков на сигнальный каскад *Wnt* с использованием репортера pTOPFlash, активированного фактором *xWnt8* (рис 1в, правая диаграмма). Проведенный анализ показал снижение на 10–15% уровня физиологической активности рекомбинантных белков.

По совокупности полученных данных можно сделать вывод о том, что введение трех tandemно расположенных Мус-эпитопов в N-концевую последовательность зрелого белка несколько снижает физиологическую активность как Мус-Noggin1, так и Мус-Noggin2.

Поскольку получение активных белковых регуляторов, способных влиять на сигнальные каскады, отвечающие за процессы клеточной дифференцировки, является важной задачей как для фундаментальных научных исследований, так и для медицинских технологий, дальнейшая работа будет направлена на получение нативных белков Noggin в наиболее естественной системе экспрессии – клетках развивающихся эмбрионов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (в рамках научного проекта № 12-04-01206, 11-04-00682 и № 12-04-33111), Совета по грантам Президента РФ (МК-3760.2012.4), программы Президиума РАН МКБ и Министерства образования и науки Российской Федерации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ерошкин Ф.М., Байрамов А.В., Мартынова Н.Ю., Зарайский А.Г. // Биоорг. химия. 2012. Т. 38. С. 385–388. [Eroshkin F.M., Bayramov A.V., Martynova N.Y., Zaryaisky A.G. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2012. V. 38. P. 338–340].
2. Bayramov A.V., Eroshkin F.M., Martynova N.Y., Ermakova G.V., Solovieva E.A., Zaryaisky A.G. // Development. 2011. V.138 (24). P. 5345–5356.
3. Watanabe K., Kamiya D., Nishiyama A., Katayama T., Nozaki S., Kawasaki H., Watanabe Y., Mizuseki K., Sasai Y. // Nature Neuroscience. 2005. V. 8. P. 288–296.
4. Dreesen O., Brivanlow A.H. // Stem Cell Rev. 2007. V. 3. P. 7–17.
5. Smith, W.C., Harland, R.M. // Cell. 1992. V. 70. P. 829–840.
6. Martynova N.Y., Eroshkin F.M., Ermolina L.V., Ermakova G.V., Korotaeva A.L., Smurova K.M., Gyoeva F.K., Zaryaisky A.G. // Developmental Dynamics. 2008. V. 237. P. 736–749.
7. Matthews G.M., Colman A. // Method Mol. Biol. 1998. V. 86. P. 235–247.
8. Groppe J., Greenwald J., Wiater E., Rodriguez-Leon J., Economides A.N. // Nature. 2002. V. 420. P. 636–642.

The Obtaining and Analysis of Physiological Activity of Secreted Proteins of Noggin Family

F. M. Eroshkin, A. V. Bayramov, O. V. Averianova, E. A. Solovieva,
M. V. Serebriakova, A. G. Zarskiy, and N. Y. Martynova[#]

[#] e-mail: martnat61@yahoo.com; phone/fax: (495)-336-86-11

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997, Russia

We have developed methods for producing recombinant proteins of Noggin family (Noggin1 and Noggin2 of the *Xenopus laevis* frog) that can interact with BMP factors of TGF-beta superfamily. The genetic constructs which allow one to effectively obtain Noggin1 and Noggin2 from synthetic mRNA microinjected into *Xenopus laevis* early embryos, as well as in the prokaryotic expression system, were generated. The obtained proteins contain three Myc-tag epitopes on their N-terminus. This allow one to compare the expression levels of Noggin1 and Noggin 2 constructs, to purify them on the affine immunosorbent and to show the activity of Noggin proteins by analyzing their ability to bind BMP4 factor TGF-beta surperfamily by co-immunoprecipitation.

Keywords: Noggin1, Noggin2, signaling cascade, luciferase reporter