



УДК 577.152.34.088.3

© 1991 г.

Е. П. Саблина, В. Б. Антонов

**ВЫДЕЛЕНИЕ И ОЧИСТКА ЗС-ПРОТЕИНАЗЫ ВИРУСА
ПОЛИОМИЕЛИТА.
ИДЕНТИФИКАЦИЯ АКТИВНОЙ ФОРМЫ ФЕРМЕНТА***Институт биоорганической химии им М. М. Шелыгина АН СССР, Москва*

Выделены и очищены все обнаруженные ранее формы ЗС-протеиназы. Показано, что наличие фрагмента ЗД-полимераза, ковалентно связанного с белком ЗС, не лишает фермент специфической протеолитической активности. Напротив, отсутствие 26 N-концевых аминокислот в ЗС-протеиназе приводит к ее инактивации.

В предыдущей работе [1] было показано, что ген ЗС-протеиназы эффективно экспрессируется (3% от суммарного клеточного белка) в клетках *E. coli*, трансформированных векторами рТТQ8-PV1 и рТТQ8-PV2 (рис. 2а, г из [1]). Синтезирующаяся в составе рекомбинантных белков ЗС-протеиназа аутокаталитически выщепляла себя из их последовательности по N-концевой аминокислотной паре Gln—Gly, что приводило к образованию продуктов P1 и P3 (рис. 5 из [1]). Кроме них среди вирусспецифических белков были обнаружены полипептиды P2 и P4 (рис. 5 из [1]), образующиеся при трансляции с альтернативного метионина (нуклеотиды 5516—5518 кДНК полиовируса [2]) (рис. 6 из [1]), в которых отсутствовали 26 N-концевых аминокислот белка ЗС. Все обнаруженные вирусные полипептиды находились во фракции нерастворимых белков (в телах включения) (рис. 5 из [1]) и содержали непроцессированный C-конец.

Согласно высказанному в работе [1] предположению, полученные полипептиды P1 и P3 в функциональном отношении должны быть аналогичны ЗС-протеиназе. Чтобы убедиться в этом, а также выяснить, насколько существенно для проявления ферментативной активности отсутствие 26N-концевых аминокислот в полипептидах P2 и P4, был разработан метод выделения и очистки полипептидов P1—P4 и предпринято клонирование фрагмента *HindII/BglII* (нуклеотиды 5240—5601 [2]) кДНК полиовируса, кодирующего естественный субстрат для полученных полипептидов. Фрагмент *HindII/BglII* (рис. 1 из [1]) кодирует 65 аминокислот, примыкающих к N-концу ЗС-протеиназы, и 56 аминокислот самого фермента. Образующийся при трансляции фрагмента *HindII/BglII* полипептид не обладает протеолитической активностью и содержит в своем составе два Gln—Gly-сайта, фланкирующих полипептид VP_g и узнаваемых ЗС-протеиназой.

Клонирование фрагмента *HindII/BglII* было осуществлено в векторе рЕК1 [3] (рис. 1) по сайту *KpnI*. Выбор вектора рЕК1 был обусловлен тем, что полипептид, кодируемый фрагментом *HindII/BglII*, относительно невелик (~12 кДа) и с точки зрения увеличения его стабильности в бактериальной клетке β-галактозидаза, синтезирующаяся с высоким выходом с β-галактозидазного гена вектора рЕК1, являлась хорошим носителем. Кроме того, нуклеотидная последовательность полилинкерного участка вектора рЕК1 [3], кодирующая пентапептид (Asp)₄Lys, специфический для энтеропептидазы из двенадцатиперстной кишки бы-

Сокращения: Ap — ампициллин, IPTG — изопропилтиогалактозид, SDS — додецилсульфат натрия, PMSF — фенолметилсульфонилфторид, DMSO — диметилсульфоксид, BAEE — этиловый эфир N-бензоил-L-аргинина.

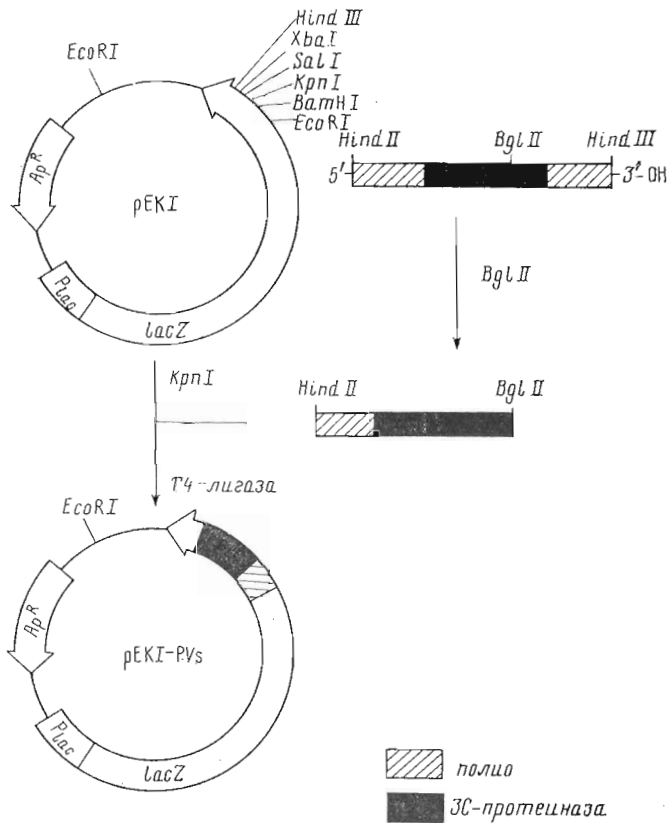


Рис. 1. Схема конструирования вектора pEKI-PVs. 3'-Выступающие концы KpnI-рестрикта вектора pEKI и 3'-укороченные концы BglII-рестрикта были затуплены с помощью фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I [4]. 5'-Концы модифицированного KpnI-рестрикта вектора pEKI перед лигированием были дефосфорилированы с помощью щелочной фосфатазы *E. coli* [4]

ка, позволила бы в случае необходимости выщепить фрагмент полиовирусного полипептида из состава рекомбинантного бемка с помощью энтеропептидазы и получить естественный субстрат для тестирования активности полипептидов P1—P4, который не содержал бы чужеродной аминокислотной последовательности.

Как показали результаты электрофореза в ПААГ с SDS, после трансформации полученным рекомбинантным вектором pEKI-PVs (рис. 1) клеток *E. coli* штамма XL-1 Blue и индукции IPTG среди белков клеточных лизатов появлялся белок, отсутствовавший в клетках, трансформированных нерекомбинантным вектором pEKI, и по молекулярной массе (~ 128 кДа) соответствовавший рекомбинантному белку β-галактозидаза—полио (β-гал—полио).

Как и полипептиды P1—P4, рекомбинантный белок β-гал—полио был обнаружен среди нерастворимых клеточных белков в телах включения (рис. 2). Необходимо отметить высокую эффективность очистки белка β-гал—полио в результате всего одной хроматографии на CL-сефарозе 4B. Несмотря на близость молекулярных масс рекомбинантного и бактериальных белков, β-гал—полио выделялся в электрофоретически чистом виде, выходя в свободном объеме колонки (рис. 3, 2), тогда как остальные белки удерживались на ней (рис. 3, 1). Это обстоятельство может быть объяснено либо склонностью молекул рекомбинантного белка к агрегации в условиях хроматографии, либо высокой степенью его гидрофобности по сравнению с бактериальными белками, которые при небольшой ионной силе элюирующего буфера лучше удерживались на сорбенте за счет электростатических сил. В результате хроматографии на CL-сефарозе 4B и последующей ренатурации белка был получен электрофоретически чистый

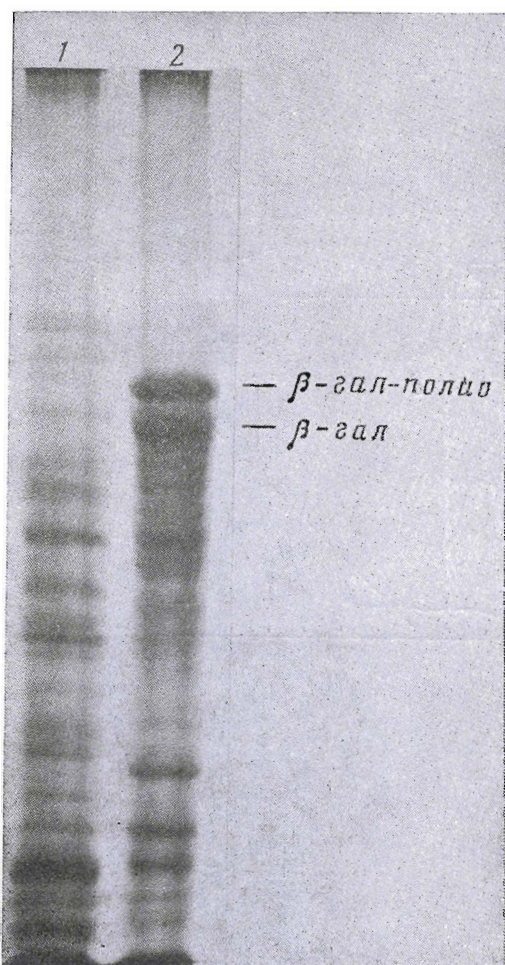


Рис. 2

Рис. 2. Распределение белков в клетках XL-1 Blue, трансформированных вектором рЕК1-PVs после индукции IPTG (электрофорез в 7% ПААГ с SDS). 1 — фракция растворимых белков; 2 — тела включения, обогащенные белком β -гал—полио

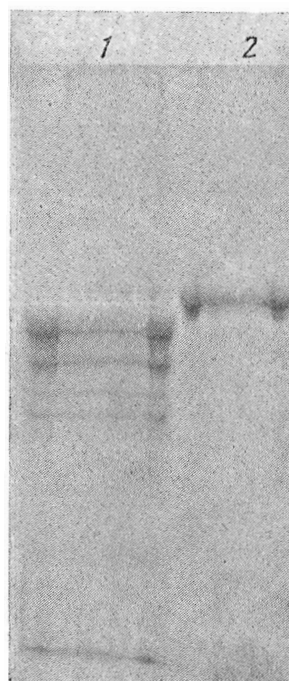


Рис. 3

Рис. 3. Электрофоретический анализ (7% ПААГ с SDS) белков тел включения, содержащих рекомбинантный белок β -гал—полио, после гель-фильтрации на CL-сефарозе 4В в буфере Б с 8 М мочевиной. 1 — клеточные белки, 2 — β -гал—полио

препарат гибридного белка β -гал—полио (рис. 3, 2), который не содержал примесей протеолитических ферментов, что было доказано длительной инкубацией его при 37° С (рекомбинантный белок в условиях эксперимента оставался неизменным в течение 3 сут).

Выделение и очистка пептидов P1—P4 из тел включения проводились по сходным схемам. Первая стадия включала в себя перевод белков тел включения в растворимое состояние. На второй стадии была применена ионообменная хроматография белков тел включения, растворенных в буфере с 8 М мочевиной, на DEAE-сефацэле. Хроматография в присутствии 8 М мочевины позволяла поддерживать белки в растворимом состоянии и минимизировать потери, связанные с их агрегацией. На этой стадии полипептиды P1 и P2 были обнаружены во фракциях градиента концентрации NaCl (рис. 4а). Пара полипептидов, P3 и P4, при хроматографии на DEAE-сефацэле в аналогичных условиях оказалась во фракциях белков, не связавшихся с ионообменником (рис. 4б). Контроль осуществлялся с помощью электрофореза белков из соответствующих фракций.

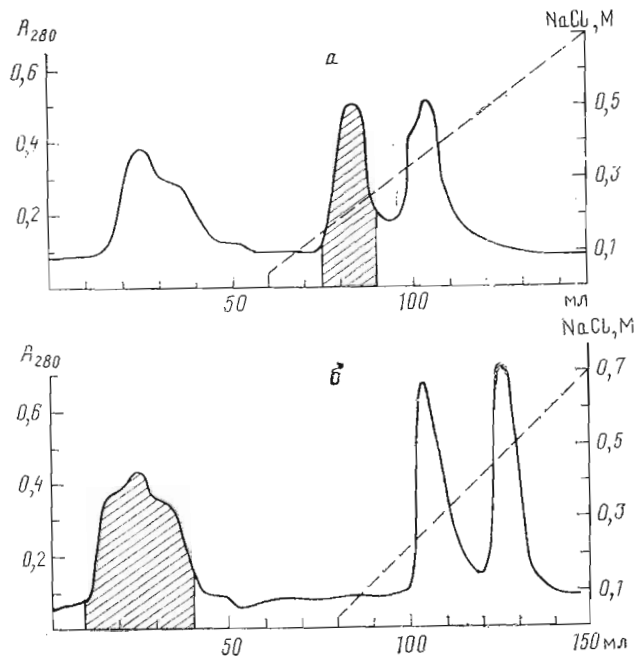


Рис. 4. Хроматография белков тел включения, содержащих полипептиды Р1, Р2 (а) и Р3, Р4 (б) на DEAE-сефацэле в буфере В, содержащем 8 М мочевины. Заштрихованы фракции, содержащие вирусспецифические полипептиды

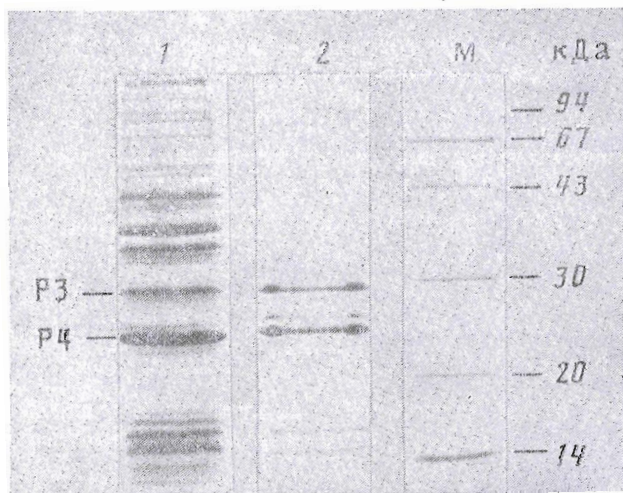


Рис. 5. Электрофорграмма белков из фракций, содержащих полипептиды Р3, Р4, после окрашивания 12% ПААГ кумасси G-250. 1 — белки тел включения до хроматографии на DEAE-сефацэле, 2 — частично очищенный препарат, содержащий полипептиды Р3, Р4 из фракций, не связавшихся с ионообменником. М — маркерные белки

Стадия хроматографии на DEAE-сефацэле позволила добиться значительной очистки пар полипептидов Р1—Р2 и Р3—Р4 и освободиться от основной массы бактериальных белков (на рис. 5 приведена электрофорграмма белков для пары Р3—Р4 из фракции, не связавшейся с ионообменником). Однако эти результаты показали, что для разделения полипептидов Р1 и Р2, Р3 и Р4 внутри соответствующих пар дальнейшее применение ионообменной хроматографии нецелесообразно. Неэффективным казалось нам также использование в данном случае гель-фильтрации,

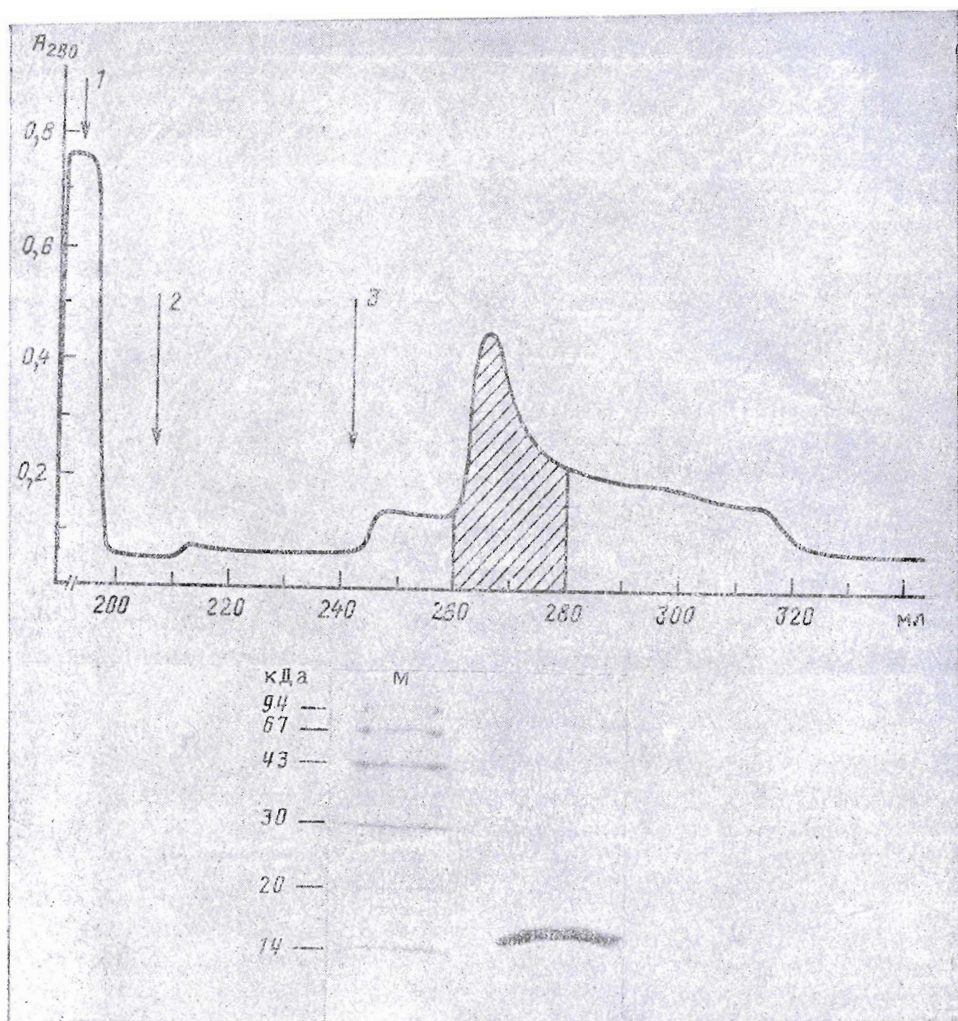


Рис. 6. Хроматография на папаин-сефарозе препарата из белка куриных яиц. Элюирование: 1 — 0,1 М фосфатным буфером, pH 7,0; 2 — 0,1 М фосфатным буфером, содержащим 0,5 М NaCl, pH 7,0; 3 — 0,01 М NaOH, содержащим 0,1 М NaCl. Отмечена выделенная фракция и показан ее анализ в 15% ПААГ с SDS. М — маркерные белки.

поскольку молекулярные массы полипептидов внутри пар различались не более чем на 3 кДа (разница, приходящаяся на 26 N-концевых аминокислот).

Согласно мнению авторов работы [5], N-концевая область ЗС-протеиназы существенна для проявления ферментом специфической активности, так как эта область участвует в поддержании активной двухдоменной конформации белка. Поскольку полипептиды P1 и P2, P3 и P4 отличались друг от друга соответственно наличием или отсутствием 26 N-концевых аминокислот, мы предположили, что именно это обстоятельство может быть положено в основу разделения этих белков. Различия в конформациях P1 и P2, P3 и P4 могут обуславливать различия не только в их ферментативной активности, но и в способности связывать ингибиторы. Так как низкомолекулярные ингибиторы тиоловых протеиназ связываются непосредственно с сульфгидрильной группой цистеина активного центра, их использование для разделения полипептидов было нецелесообразно. Это предположение было подтверждено в эксперименте по связыванию иод^[14C]ацетамида с частично очищенными полипептидами P1—P2 и P3—P4 из соответствующих фракций после ионообменной хроматографии на DEAE-сефацелле. Для этого белки были предварительно ренатурированы и проинкубированы с иод^[14C]ацети-

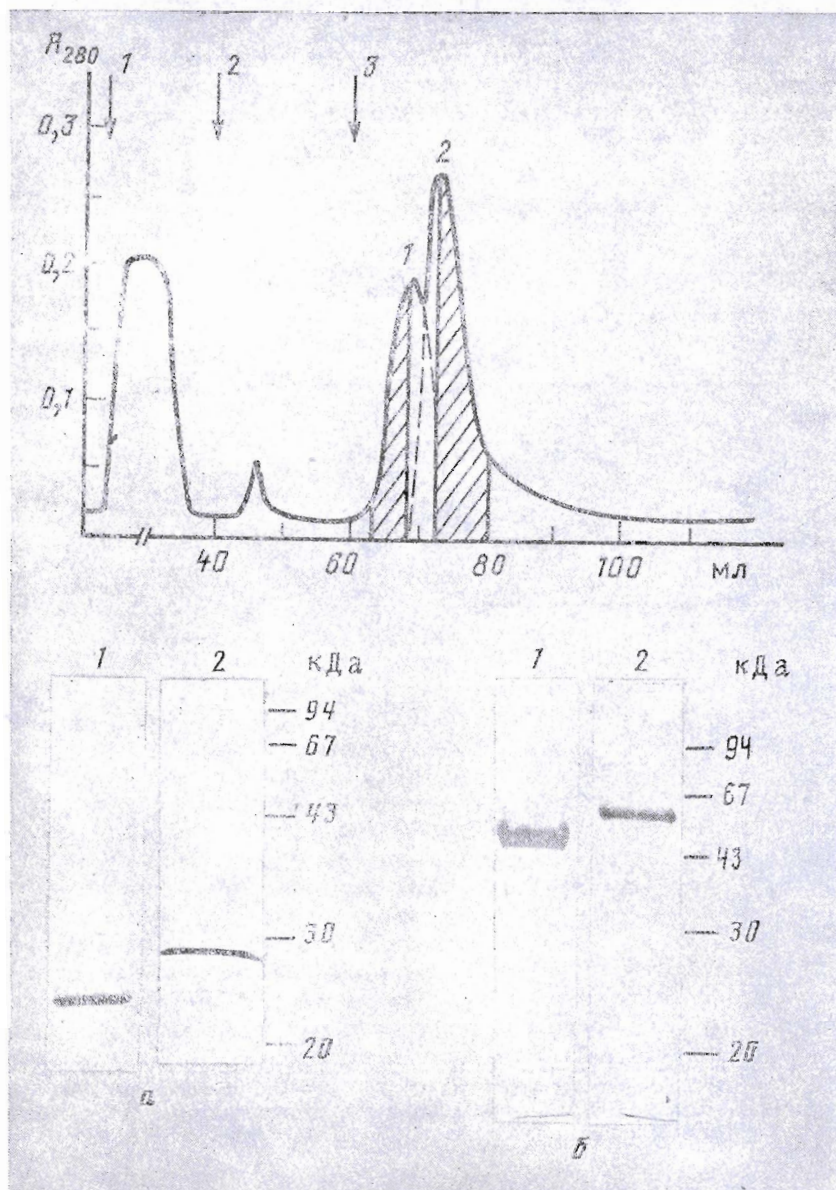


Рис. 7. Хроматография на цистатин-сефарозе ренатурированных белков из фракций, не связавшихся с DEAE-сефацелом и содержащих полипептиды P3, P4. Элюирование: 1 — буфером В; 2 — буфером В, содержащим 0,5 М NaCl; 3 — 0,01 М NaOH, содержащим 0,1 М NaCl, рН 12,0. Приведены электрофореграммы белков в 12% ПААГ с SDS: а — из пиков 1 (1) и 2 (2), отмеченных на хроматограмме штриховкой, б — из аналогичных пиков для полипептидов P2 (1) и P1 (2).

дом. Электрофорез белков показал, что полипептиды P1—P4 одинаково эффективно связывают иодацетамид. Более того, его связывали также многие из содержащихся во фракциях примесных белков (данные не приведены).

Из работы [6] следовало, что цистатин (биологический ингибитор цистеиновых протеиназ) эффективно связывается со многими тиоловыми ферментами и, кроме того, ингибирует процессинг полиовирусного полипротеина в зараженной вирусом полиомиелита культуре HeLa-клеток. Последнее обстоятельство говорило в пользу связывания цистатина с ЭС-протеиназой вируса полиомиелита. Существовала вероятность того, что конформационные различия в полипептидах P1—P4 будут влиять на эффективность связывания их с относительно большой молекулой циста-

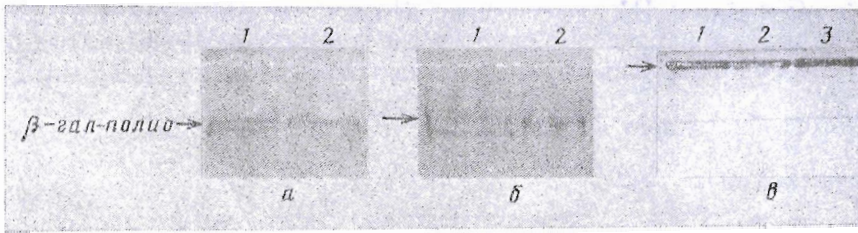


Рис. 8. Определение специфической протеолитической активности полипептидов P1—P4 по отношению к фрагменту вирусного полипротеина. β -гал—полио, инкубированный с P1 (a) и P3 (б) без (1) и в присутствии 10 мМ иодацетамида (2), а также с P2 (в, 1) и P4 (в, 2). 3 — контроль β -гал—полио на стабильность в условиях эксперимента

тина и это позволит использовать иммобилизованный цистатин в качестве аффинного сорбента для их разделения.

С этой целью был выделен и очищен цистатин из белка куриных яиц, как описано в работе [7], причем использование наряду с фицин-сефарозой папаин-сефарозы позволило увеличить эффективную емкость и долговечность аффинного сорбента (емкость сорбента не уменьшалась в течение 12 циклов). Выделенный цистатин (рис. 6) был иммобилизован на эпоксисефарозе и использовался для очистки полипептидов P1—P4.

Хроматография на цистатин-сефарозе предварительно ренатурированных белковых фракций, содержащих полипептиды P1—P2 и P3—P4, показала идентичную картину. В обоих случаях полипептиды связывались на аффинном сорбенте. Белки элюировались с цистатин-сефарозы лишь при pH 12 (на рис. 7 приведена хроматограмма для полипептидов P3—P4). При этом полипептиды, содержащие 26 N-концевых аминокислот (P1 и P3), связывались с цистатином несколько лучше, чем их аналоги без N-концевых аминокислот — P2 и P4 (рис. 7). Пик 1 содержал практически чистый полипептид P4 (P2). В пике 2 содержались фракции, обогащенные полипептидом P3 (P1) (рис. 7a (б)). Идентичные картины хроматографии для пар полипептидов P1—P2 и P3—P4 свидетельствовали о том, что фрагмент 3D-полимеразы, примыкающий к 3C-протеиназе с C-конца, не влияет на связывание цистатина с полипептидами. С другой стороны, конформационные различия в полипептидах P1 и P2, P3 и P4, вызванные наличием (P1 и P3) или отсутствием (P2 и P4) N-концевых аминокислот, обусловили различную эффективность связывания соответствующих пептидов с цистатином и, следовательно, различную степень удерживания их на аффинном сорбенте.

Степень очистки полипептидов после хроматографии на цистатин-сефарозе позволила провести определение их специфической протеолитической активности с использованием выделенного естественного субстрата в составе рекомбинантного белка β -гал—полио. Для этого образцы препаратов P1 — P4 инкубировались с субстратом в присутствии и в отсутствие иодацетамида. Результаты электрофореза показали, что специфической активностью в отношении естественного субстрата обладали полипептиды P1 (рис. 8a) и P3 (рис. 8б). Расщепление ими пептидных связей между глутамином и глицином в молекуле субстрата вызвало отщепление низкомолекулярных пептидов от рекомбинантного белка и смещение соответствующей ему полосы на электрофореграмме. Присутствие β -галактозидазы на N-конце молекулы субстрата не мешало определению активности. Ферментативный гидролиз подавлялся 10 мМ иодацетамидом (рис. 8a, б). Напротив, P2 и P4 не проявляли протеолитической активности (рис. 8в), что согласуется с предположением о существенной роли N-концевого фрагмента 3C-протеиназы в поддержании активной конформации этого фермента [5].

Необходимо отметить, что выделенные по описанной выше схеме полипептиды P1' и P3', синтезированные в клетках *E. coli* HR101, трансформированных векторами pTTQ8-PV1 и pTTQ8-PV2 до введения в них термина-

тора трансляции [1], и содержащие на С-концах последовательности чужеродных аминокислот (19 для P1', 9 для P3'), по отношению к белку β -гал—полио оказались столь же активными (данные не приведены).

Авторы благодарят Е. Д. Шибанову за помощь в работе.

Экспериментальная часть

Кроме материалов, описанных ранее [1], в работе использованы DEAE-сефацель, CL-сефароза 4В, BrCN-активированная сефароза, эпоксиактивированная сефароза (Pharmacia, Швеция); папаин (Serva, ФРГ); фицин (Calbiochem, США); этиловый эфир *N*-бензоил-*L*-аргинина (BAEE) (Reanal, Венгрия).

Конструирование рекомбинантных ДНК, приготовление компетентных клеток *E. coli* и их трансформацию, селекцию клонов, выделение и анализ плазмидной ДНК проводили как описано в работе [4]. Секвенирование нуклеотидных последовательностей осуществляли по методу Максама — Гилберта в модификации Чувпило — Кравченко [8]. Выделение тел включения, электроблоттинг, иммуоферментный анализ проводили как описано ранее [1]. Анализ белков из тел включения осуществляли с помощью электрофореза по методу Лэммли [9].

Выделение рекомбинантного белка β -гал—полио из тел включения. Белки тел включения, выделенные из 1 л клеточной культуры и содержащие рекомбинантный белок β -гал—полио, растворяли в 3 мл буфера Б (10 мМ трис, рН 7,5, 1 мМ EDTA, 0,1% тритон X-100) с 8 М мочевиной и 10 мМ дитиотрептоном и после прогревания в течение 30 мин при 30° С наносили на колонку с CL-сефарозой 4В (2 × 70 см), уравновешенной буфером Б с 8 М мочевиной. Элюирование проводили тем же буфером при скорости 5 мл/ч, объем фракций 5 мл. Фракции, содержащие белок β -гал—полио (контроль осуществляли с помощью электрофореза в 7% ПААГ с SDS), объединяли (*V* ~ 40 мл), диализовали при 4° С против буфера Б (2 × 1 л) и концентрировали на концентраторе Speed-Vac с охлаждением. Скоцентрированный раствор белка (*V* ~ 2 мл, концентрация 1 мг/мл) еще раз диализовали против буфера Б, разливали по 100 мкл и хранили при —70° С.

Выделение цистатина из белка куриных яиц осуществляли как описано в работе [7]. Модификацией метода явилось использование наряду с фицин-сефарозой (фицин был иммобилизован на BrCN-активированной сефарозе) папаин-сефарозы (папаин был иммобилизован на эпоксиактивированной сефарозе (оксиран-сефарозе) [10]). Для иммобилизации на оксиран-сефарозе папаин (30 мг) растворяли в 15 мл 0,1 М боратного буфера, рН 8,5, и добавляли к 15 мл оксиран-сефарозы, промытой водой и 0,1 М боратным буфером. После 24 ч инкубации при 20° С и осторожном встряхивании смолу из реакционной смеси собирали центрифугированием (2 мин, 1000 об./мин), промывали последовательно 0,1 М боратным буфером, тем же буфером, содержащим 0,5 М NaCl, и снова 0,1 М боратным буфером. Для инактивации не связавшихся с папаином эпоксигрупи смолу в течение 3 ч при 20° С и осторожном встряхивании инкубировали с равным объемом 0,1 М боратного буфера, содержащего 1 М глицин, рН 8,5. После центрифугирования (2 мин, 1000 об./мин) смолу несколько раз промывали 0,1 М фосфатным буфером (рН 7,0) и использовали далее для выделения цистатина как описано в работе [7]. Связывание папаина с оксиран-сефарозой составило более 90%, активность иммобилизованного папаина — около 30% активности папаина в растворе до иммобилизации. Активность папаина и фицина в растворенном и иммобилизованном виде определяли по методу [11] с использованием в качестве субстрата BAEE.

Выделенный цистатин (*V* ~ 20 мл, концентрация 0,3 мг/мл) диализовали при 4° С против 0,1 М боратного буфера, рН 8,5, концентрировали (*V* ~ 3 мл, концентрация 2 мг/мл), еще раз диализовали против 0,1 М боратного буфера и хранили при —70° С. Цистатин после трех циклов вы-

деления ($V \sim 9$ мл, концентрация 2 мг/мл) использовали для иммобилизации на оксиран-сефарозе аналогично тому, как иммобилизовали папаин. Связывание цистатина составило 90%, активность иммобилизованного цистатина — около 40% его активности в растворе до иммобилизации. Активность цистатина определяли по методу [11] с использованием папаина и ВАЕЕ. Цистатин-сефарозу (9 мл, 1,8 мг цистатина/мл), уравновешенную буфером В (10 мМ трис, рН 7,0, 1 мМ EDTA, 1 мМ дитиотреит, 1 мМ PMSF), использовали для очистки полипептидов P1—P4.

Выделение и очистка полипептидов P1 — P4 из тел включения. Белки тел включения, выделенные из 3 л бактериальной культуры и содержащие полипептиды P1, P2 (P3, P4), растворяли в 20 мл буфера В с 8 М мочевиной и после прогревания в течение 30 мин при 30° С наносили на колонку с DEAE-сефацелем (2×10 см), уравновешенную буфером В с 8 М мочевиной. Элюирование проводили тем же буфером при скорости 10 мл/ч, объем фракций 5 мл. После того как были собраны фракции белков, не связавшихся с ионообменником, элюирование связавшихся белков проводили буфером В с 8 М мочевиной и возрастающей концентрацией NaCl (от 0,05 до 0,7 М). Фракции, содержащие полипептиды P1 и P2 (P3 и P4) (анализ электрофорезом в 12% ПААГ с SDS), объединяли и диализовали (2×1 л) в течение 24 ч против буфера В при 4° С. Ренатурированные таким образом белки наносили со скоростью 3 мл/ч на колонку с цистатин-сефарозой (2×3 см), уравновешенную буфером В. После промывки аффинного сорбента буфером В с 0,5 М NaCl белки, связавшиеся с цистатин-сефарозой, элюировали 0,01 М раствором NaOH, рН 12,0, содержащим 0,1 М NaCl; рН во фракциях немедленно доводили до 7,0 0,2 М раствором KH_2PO_4 . Фракции с элюированными полипептидами P1 и P2 (P3 и P4) диализовали против буфера В при 4° С, концентрировали (до $V \sim 1$ мл, концентрация 1 мг/мл), еще раз диализовали против буфера В, разливали по 100 мкл и хранили при -70° С.

Определение специфической протеолитической активности полипептидов P1 — P4. К 2 мкл (2 мкг) фермента (полипептиды P1 — P4) добавляли 2 мкл 40% DMSO в буфере В (или 2 мкл 0,1 М иодацетамида в буфере В, содержащем 40% DMSO), прогревали в течение 1 ч при 30° С, добавляли 2 мкл 0,1 М дитиотреита, выдерживали 10 мин при 30° С, добавляли 15 мкл субстрата β-гал—полио (15 мкг) и инкубировали 24 ч при 30° С. Затем реакционные смеси высушивали на концентраторе Speed-Vac, добавляли по 40 мкл буфера для нанесения образцов [9] и после прогревания в течение 2 мин при 100° С аликвоты (20 мкл) наносили на 7% ПААГ с SDS.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Саблина Е. П., Америк А. Ю., Антонов В. К. // Биоорган. химия. 1991. Т. 17. № 9. С. 1201—1212.
2. Rasaniello V. R., Baltimore D. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. № 8. P. 4887—4891.
3. Добрынин В. Н., Болдырева Е. Ф., Филиппов С. А., Чувпило С. А., Коробко В. Г., Воротынцева Т. И., Бессмертная Л. Я., Михайлова А. Г., Америк А. Ю., Антонов В. К. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 1. С. 119—121.
4. Манниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984.
5. Gorbalenya A. E., Donchenko A. P., Blinov V. M., Koonin E. V. // FEBS Lett. 1989. V. 243. № 2. P. 103—114.
6. Kay J., Dunn B. M. // Biochem. Biophys. Abstr. 1990. V. 1048. № 1. P. 1—18.
7. Иселева Е. В., Зимачева А. В., Мосолов В. В. // Прикл. биохимия и микробиология. 1983. Т. 19. № 4. С. 521—527.
8. Chuvpilo S. A., Kravchenko V. V. // FEBS Lett. 1985. V. 179. № 1. P. 34—36.
9. Laemmli U. K. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680—685.
10. Остерман Л. А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот. М.: Наука. 1985. С. 379—380.
11. Arnon R. // Meth. Enzymol. 1970. V. 19. P. 226—244.

Поступила в редакцию
25.1.1991

E. P. SABLINA, V. K. ANTONOV

ISOLATION AND PURIFICATION OF POLIOVIRUS 3C PROTEASE.
IDENTIFICATION OF THE ENZYME'S ACTIVE FORM

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR,
Moscow*

All the forms of 3C protease previously found were isolated and purified. A 3D polymerase's fragment covalently bound with 3C protein does not affect the specific proteolytic activity of the enzyme, whereas the elimination of 26 N-terminal amino acid residues of 3C protease leads to its inactivation.