



УДК 577.2 : 577.112

© 1993 М. А. Нейра Карденас,
М. Ф. Ворович, А. К. Эбралидзе, О. Ю. Чертов*,
Е. М. Луканидин

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО МЕТАСТАЗИНА И ЕГО ХАРАКТЕРИСТИКА

Институт биологии гена РАН, Москва;

* Институт биоорганической химии им. М. М. Шеллякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

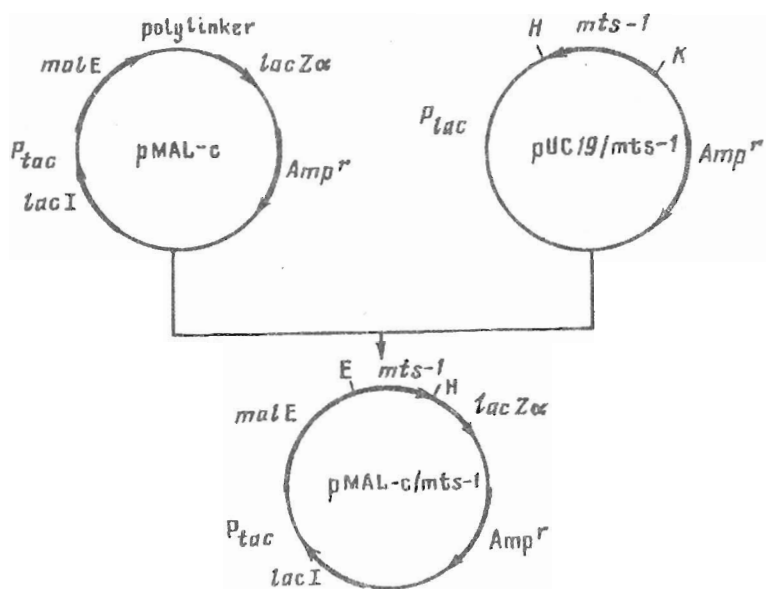
С использованием экспрессирующего вектора рMAL-с получен рекомбинантный белок метастазин (mts-1). Показано, что он связывает ионы кальция и взаимодействует с мелиттином — биологически активным полипептидом пчелиного яда.

Взаимодействие ионов Ca^{2+} с Ca^{2+} -связывающими белками — один из механизмов, с помощью которых осуществляется регуляция многих клеточных реакций. Наиболее представительной группой Ca^{2+} -связывающих белков является семейство белков S-100, которое включает в себя S-100 α , S-100 β , S-100L, кальциклин, MRP-8, MRP-14, 42C, Ca^{2+} -связывающий белок кишечника (ICBP) [1—6], а также белок, кодируемый геном, экспрессия которого в различных клетках обнаружена в нескольких лабораториях. Существует несколько наименований этого белка: 42A, 18A2, p9Ka, pEL98 и mts-1 (метастазин) [7—11]. Недавно описанный нами ген *mts-1* специфически экспрессируется в различных метастазирующих опухолевых клетках, а также в лимфоидных тканях, клетках костного мозга и клетках крови — Т-лимфоцитах и макрофагах.

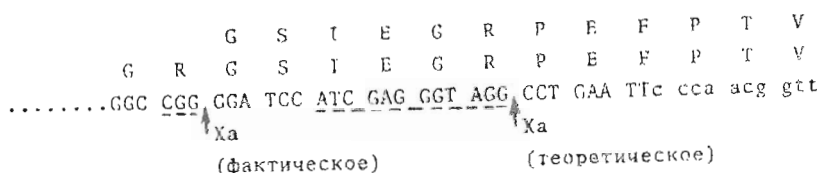
Белки семейства S-100 обладают высокой степенью гомологии и имеют два характерных Ca^{2+} -связывающих домена, так называемые EF-структуры. К настоящему времени данные о функциях этих белков ограничены. Показано, что S-100 β представлен в глиальных и шванновских клетках и количество его увеличивается во время роста нейронов [12]. Предполагается, что S-100 β — это фактор удлинения аксонов [13]. Продемонстрировано участие белков S-100 в ряде биохимических процессов: в Ca^{2+} -зависимой диссоциации микротрубочек [14], в ингибировании фосфорилирования τ -белка [15] и белка 87 кДа, являющихся субстратами протеинкиназы C [16]. Установлено также, что белок p11 этого семейства связывается с белком p36, основным субстратом тирозинкиназы вируса саркомы Рауса, и ингибирует его фосфорилирование [17]. Экспрессию ряда белков семейства S-100 связывают с различными стадиями клеточного цикла [8, 18] или с дифференцировкой клеток [7, 9]. Предполагается, что Ca^{2+} -связывающие белки семейства S-100 функционируют путем взаимодействия с клеточными белками-мишенями, модулируя их биохимическое действие, подобно тому, как это делает другой известный проводник кальциевых сигналов — кальмодулин.

До последнего времени одним из лимитирующих факторов в изучении функций Ca^{2+} -связывающих белков, в частности метастазина — белка, кодируемого геном

Сокращения: IPTG — изопропилбис- β -D-галактозид; MBP — белок, связывающий мальтозу; PMSF — фенолметилсульфонилфторид.



a



T	M	A	R	P
T	M	A	R	P
acc	atg	gct	aga	ccc...

б

Рис. 1. Схема конструирования плазмиды pMAL-c/mts-1. Указаны сайты рестриктаз: H — *Hind* III, K — *Kpn* I, E — *Eco*R I (a) и нуклеотидная последовательность места стыка вектора pMAL-c (прописные буквы) и фрагмента, содержащего ген *mts*-1 (строчные буквы); показано соответствие кодируемых аминокислот с экспериментально определенной аминокислотной последовательностью (строка сверху), а также места фактического и теоретического расщепления фактором Xa (б)

mts-1, является отсутствие достаточных количеств белкового продукта гена. Наиболее подходящий источник для выделения метастазина — линия метастазирующих клеток, в которых наблюдается высокий уровень экспрессии гена *mts*-1. Однако даже в этом случае выход чистого белка оказывается недостаточным для изучения его биохимических свойств.

Поэтому в настоящей работе была разработана система экспрессии метастазина в бактериальных клетках. Рекомбинантный белок был очищен, и показано, что он способен связывать *in vitro* ионы Ca²⁺, а также мелиттин — пептид, взаимодействующий с S-100β и кальмодулином.

Получение и очистка рекомбинантного метастазина

В качестве вектора в работе была использована плаزمида pMAL-c, содержащая ген *mal* E, кодирующий белок, связывающий мальтозу (МВР), с сильным промотором P_{tac}, а также ген *lac* I, экспрессирующий *lac*-репрессор [19]. Схема

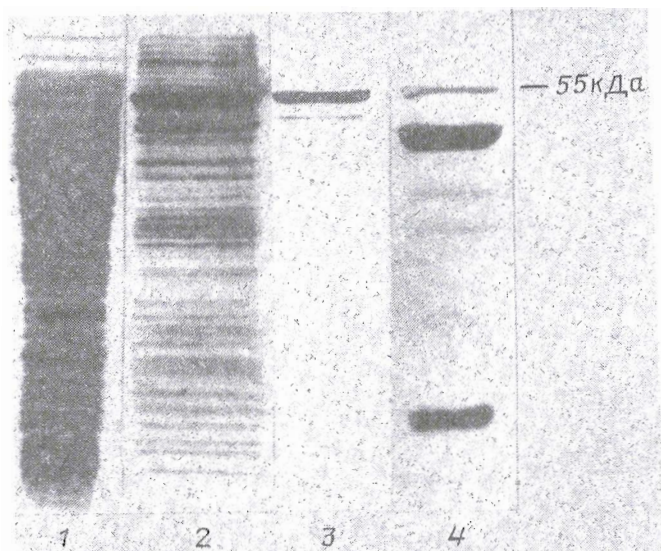


Рис. 2. Электрофорез в 15% SDS-ПААГ лизата клеток продуцента до индукции (1), через 2 ч после индукции IPTG (2), очищенного с помощью аффинной хроматографии гибридного белка MBP/*mts-1* (3) и этого же белка после расщепления фактором Ха (4). Окраска кумасси R-250

получения экспрессирующего вектора pMAL-c/*mts-1* показана на рис. 1а. Плазмиду pMAL-c обрабатывали рестриктазой *EcoR* I, 3'-концы ДНК достраивали с помощью фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli* (polIK), затем вектор обрабатывали рестриктазой *Hind* III. Для получения фрагмента, содержащего кодирующую последовательность гена *mts-1*; плазмиду pUC19/*mts-1* [11] обрабатывали рестриктазой *Kpn* I, выступающие нуклеотиды на 3'-концах ДНК удаляли с помощью ДНК-полимеразы фага T4, затем плазмиду обрабатывали рестриктазой *Hind* III. Полученный фрагмент выделяли электрофорезом в агарозе с последующей электроозольцией и лигировали с подготовленным вектором pMAL-c. Рекомбинантные клоны *E. coli* с pMAL-c/*mts-1* анализировали с помощью электрофореза в SDS-ПААГ. После индукции IPTG появляется полоса, по размерам соответствующая гибриднему белку MBP/*mts-1* (55 кДа, см. рис. 2, 1; 2).

Очистку гибридного белка проводили с помощью аффинной хроматографии, используя свойство MBP связывать мальтозу [20]. При прохождении через колонку с амилозой гибридный белок связывается, затем его элюируют 10 мМ мальтозой (рис. 2, 3). Метод позволяет в один этап получить практически чистый белок с хорошим выходом, без больших потерь. Расчет показывает, что в стандартном опыте из 5 г сырого осадка клеток (1 л культуры) можно получить ~40 мг гибридного белка, что составляет ~8% тотального белка клеток.

Особенность вектора pMAL-c — наличие в полилинкерном участке последовательности, кодирующей тетрапептид Ile-Glu-Gly-Arg, узнаваемый фактором Ха. Фактор коагуляции крови Ха является специфической протеиназой, которая переводит протромбин в тромбин путем разрыва пептидной связи в положении Arg²⁷⁴—Thr²⁷⁵ и Arg³²³—Ile³²⁴. В обоих случаях месту разрыва предшествует тетрапептид Ile-Glu-Gly-Arg [21, 22]. При использовании фактора Ха для расщепления гибридного белка MBP/*mts-1* были получены два полипептида с электрофоретическими подвижностями, соответствующими подвижности MBP и рекомбинантного метастазина (рис. 2, 4).

Высокая специфичность фактора Ха была использована для выделения и очистки целого ряда генно-инженерных белков, таких, как миоглобин [23],

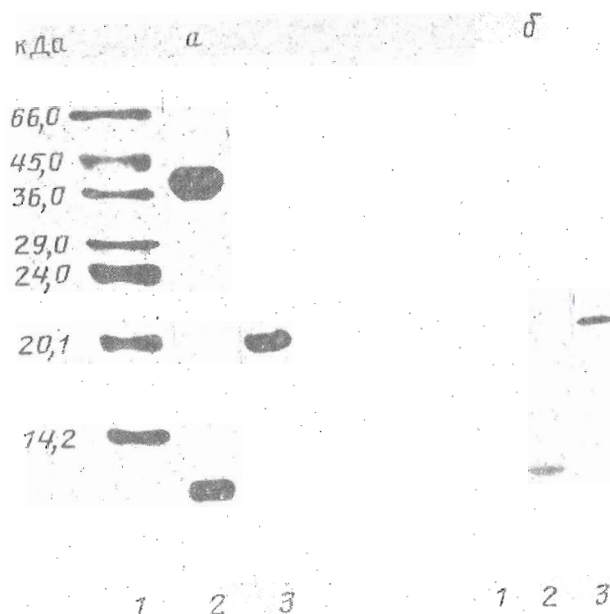


Рис. 3. Электрофоретический анализ продуктов расщепления гибридного белка фактором Ха (2): окрашивание амидо черным 10В (а) и радиоавтограф нитроцеллюлозного фильтра после инкубации с $^{45}\text{Ca}^{2+}$ (б). 1 — маркеры молекулярной массы (Sigma, MW-SDS-70), 3 — кальмодулин

РНКаза А [24] и α -глобин [25]. Во всех случаях фактор Ха узнавал тетрапептид и разрывал пептидную связь сразу после аргинина. Последовательность, кодирующая тетрапептид, узнаваемый фактором Ха, расположена на расстоянии 21 нуклеотида от иницирующего АТГ-кодона метастазина. Поэтому в отличие от природного белка рекомбинантный метастазин должен был бы иметь семь дополнительных аминокислот на N-конце. Три первые кодируются вектором рМАЛ-с, а четыре последующие — нетранслируемой *in vivo* последовательностью гена *mts-1*, непосредственно прилегающей к иницирующему АТГ-кодону. Однако, как показало прямое определение N-концевой аминокислотной последовательности рекомбинантного метастазина, разрыв пептидной связи в белке МВР/*mts-1* происходит не в ожидаемом месте, сразу за Arg тетрапептида, а на две аминокислоты левее тетрапептида, между Arg и Gly (рис. 1б). Эти данные указывают на то, что фактор Ха не обладает абсолютной специфичностью. Возможность неканонического гидролиза фактором Ха продемонстрирована также для гибридного β -глобина [26]. По-видимому, в случае рекомбинантного метастазина фактор Ха узнает тетрапептид, но вследствие специфической третичной структуры гибридного белка разрыв пептидной связи происходит не по каноническому, а по другому Arg, расположенному рядом.

Таким образом, полученный рекомбинантный метастазин оказывается на 13 аминокислотных остатков длиннее своего природного аналога.

Связывание $^{45}\text{Ca}^{2+}$ с рекомбинантным метастазином

Характерная особенность Ca^{2+} -связывающих белков — наличие в их составе консервативных полипептидов, образующих петлевые Ca^{2+} -связывающие домены, или так называемые ЕF-структуры. На основании анализа нуклеотидной последовательности гена *mts-1* можно предположить, что метастазин должен иметь два таких домена. Недавно было показано [27], что природный аналог метастазина, белок р9Ка, способен связывать ионы Ca^{2+} *in vitro*. Полученный в настоящей

14. Baudier J., Briving C., Deinum J., Haglid K., Sorskog L., Wallin M.//FEBS Lett. 1982. V. 147. № 2. P. 165—167.
15. Baudier J., Cole R.//J. Biol. Chem. 1988. V. 263. № 12. P. 5876—5883.
16. Kligman D., Patel J.//J. Neurochem. 1985. V. 47. № 2. P. 298—303.
17. Glenney J., Glenney P.//J. Cell. Biol. 1985. V. 100. № 3. P. 754—763.
18. Calabretta B., Battini R., Kaczmarek L., de Riel J. K., Baserga R.//J. Biol. Chem. 1986. V. 261. № 27. P. 12628—12632.
19. Maina C. V., Riggs P. D., Grandea A. G. III., Slatko B. E., Moran L. S., Tagliamonte J. A., McReynolds L. A., Guan C.//Gene. 1988. V. 74. № 2. P. 365—373.
20. Killerman O. K., Feremei T.//Meth. Enzymol. 1982. V. 90. P. 459—463.
21. Walz D. A., Hewett-Emmett D., Seegers W. H.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. № 5. P. 1969—1972.
22. Butkowski R. J., Elion J., Downing M. R., Mann K. G.//J. Biol. Chem. 1977. V. 252. № 14. P. 4942—4957.
23. Varadarajan R., Szabo A., Boxer S. G.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. № 17. P. 5681—5684.
24. Nambiar K. P., Stackhouse J., Presnell S. R., Benner S. A.//Eur. J. Biochem. 1987. V. 163. № 1. P. 67—71.
25. Nagai K., Thogersen H. C.//Nature. 1984. V. 309. № 5971. P. 810—812.
26. Nagai K., Perutz M. F., Poyart C.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. № 21. P. 7252—7255.
27. Barraclough R., Gibbs F., Smith J. A., Haynes G. A., Rudland P. S.//Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1990. V. 169. № 2. P. 660—666.
28. Kincaid R. L., Coulson C. C.//Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1985. V. 133. № 1. P. 256—264.
29. Jarret H. W., Madhavan R.//J. Biol. Chem. 1991. V. 266. № 1. P. 362—371.
30. Kaetzel M. A., Dedman J. R.//J. Biol. Chem. 1987. V. 262. № 8. P. 3726—3729.
31. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J.//Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd. ed./N. Y.: Cold Spring Harbor Lab., 1989.
32. Laemmli U. K.//Nature. 1970. V. 227. № 5254. P. 680—685.
33. Matsudaira P.//J. Biol. Chem. 1987. V. 262. № 21. P. 10035—10038.

Поступила в редакцию
15.X.1992

*M. A. Neira Cardenas, M. F. Vorovitch, A. K. Ebralidze,
O. Y. Chertov*, E. M. Lukanidin*

EXPRESSION AND CHARACTERIZATION OF RECOMBINANT mts-1 PROTEIN

Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow;

** M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of
Sciences, Moscow*

The recombinant mts-1 protein has been obtained with the use of the pMAL-c expression vector. This protein was shown to bind calcium ions and interact with melittin, a polypeptide from bee venom.