



СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ФОРМ ОНКОНАЗЫ

© 2001 г. И. И. Воробьев[#], Н. А. Пономаренко, О. М. Дурова*, А. В. Козырь, А. В. Демин***,
А. В. Колесников, Л. П. Сащенко***, М. Я. Карпейский**, А. Г. Габибов

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

*Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского, Москва;

**Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва;

***Институт биологии гена РАН, Москва

Поступила в редакцию 03.11.2000 г. Принята к печати 30.01.2001 г.

Разработан метод экспрессии гена онконазы, приводящий к продукции растворимой формы белка. Исследованы энзиматические и цитотоксические свойства рекомбинантных форм фермента. Показано, что по рибонуклеолитической активности рекомбинантная онконаза с дополнительным N-концевым остатком Met, выделенная в неденатурирующих условиях, не имеет существенных отличий от нативного фермента. Обнаружено, что присоединение к C-концу белка 33-членного пептида, содержащего вспомогательные элементы для облегчения выделения и детекции рекомбинантного белка, не оказывает влияния на ферментативные свойства онконазы.

Ключевые слова: онконаза; рибонуклеазы; цитотоксичность; рекомбинантные белки, экспрессия.

ВВЕДЕНИЕ

Онконаза – рибонуклеаза из ооцитов лягушки *Rana pipiens* (PID g464649) – является цитотоксическим белком и в настоящее время проходит клинические испытания в качестве противоопухолевого агента. Этот белок, называемый ранее Р-30, принадлежит к семейству циклизующих рибонуклеаз панкреатического типа [1, 2] и вместе с другими амфибийными рибонуклеазами может быть выделен в отдельную группу [3]. Исследования онконазы позволили выявить ряд структурно-функциональных особенностей данного фермента, определяющих его цитотоксические свойства:

1. Отсутствие взаимодействия с ингибиторами панкреатических рибонуклеаз [2].

2. Исключительная устойчивость к протеолизу как *in vitro* [4], так и при инкубации в культуре трансформированных клеток [3].

3. Не встречающаяся у гомологичных онконазе рибонуклеаз дополнительная дисульфидная связь, блокирующая C-конец белка [5], и, возможно, спонтанное посттрансляционное превра-

щение N-концевого остатка Glu в остаток пирролидонкарбоновой кислоты (<E>) [6].

4. Некоторая аффинность онконазы к цитоплазматической мемbrane трансформированных клеток млекопитающих [2] при одновременном отсутствии свойств лектина [3].

Первичная структура онконазы (Onc) была определена методами белковой химии на основе полного секвенирования ее пептидных фрагментов [1] и в дальнейшем подтверждена клонированием и секвенированием гена *onc* [7]. Биологическая функция как онконазы, так и других аналогичных амфибийных рибонуклеаз в настоящий момент неизвестна. Предполагается, что данные белки входят в систему неспецифического иммунитета (host defense) и токсичны для млекопитающих хищников [3].

Поскольку исчерпывающие исследования свойств онконазы требовали получения муттированных форм белка, были разработаны системы экспрессии гена *onc* в *E. coli* [6, 8, 9], обеспечивающие получение рекомбинантной онконазы в не растворимой форме в виде телец включения с последующим рефолдингом белка. В том случае, когда выделенная таким образом рекомбинантная онконаза полностью соответствовала по первичной структуре нативному белку [9], она имела и идентичные ему каталитические и цитотоксические свойства.

Сокращения: OPC – открытая рамка считывания; Onc – онконаза; IPTG – изопропил-β-D-тиогалактопиранозид; PRI – ингибитор рибонуклеаз плаценты человека; MA – моноклональное антитело.

[#]Автор для переписки (тел.: (095) 429-82-69; e-mail: ivanv@ibch.ru).

Таблица 1. Синтетические олигонуклеотиды, использованные при получении экспрессионных конструкций*

Номер	5' → 3'
(I)	CAGGA <u>CTGGCTGACTTTCCAGAAA</u>
(II)	TCATGAA <u>AGGCCAGCCGGCCATGGCCCAGGACTGGCTGACTTTC</u>
(III)	TCATGAA <u>AGGCCAGCCGGCCATGGCCGAAGACTGGCTGACTTTC</u>
(IV)	ATGC <u>GGATCCGTGCCAGAACAGAACCCATACCGCAAGAACCAACACCAAC</u>
(V)	CAG <u>CTTCCTTCGGGCT</u>
(VI)	TAATAC <u>GACTCACTATA</u> AG
(VII)	TGG <u>CATGGCCGGCTGGGCCGCGAGGAG</u>

* Подчеркнуты сайты рестрикции: *NcoI* для олигонуклеотидов (II), (III) и (VII); *BamHI* для (IV).

В то же время рекомбинантная форма белка [M(–1)M23L]Onc, содержащая дополнительный остаток Met в положении –1 и предположительно синонимичную (так называемую консервативную) замену остатка Met23 на Leu, обладала существенно пониженной ферментативной и цитотоксической активностью [6]. Последующая замена остатка Glu1 на Ser или Tug частично восстанавливала активность фермента [10]. Химическое удаление дополнительного остатка Met(–1) при сохранении замены M23L приводило к появлению формы белка с двукратно увеличенной ферментативной активностью и несколько пониженной цитотоксичностью. На основании этих данных было сделано предположение, что наличие в первом положении остатка пирролидонкарбоновой кислоты необходимо для нормального функционирования фермента.

Однако для рекомбинантных форм других рибонуклеаз панкреатического типа с дополнительным остатком Met на N-конце, в частности для ангиогенина [11], не отмечалось заметного изменения их энзиматических свойств. Таким образом, инактивация рекомбинантной онконазы при введении дополнительного остатка Met с N-конца могла быть следствием искажений в конформации белка в условиях рефолдинга.

Задача данной работы – создание системы экспрессии гена *onc*, приводящей к продукции растворимой формы рекомбинантной онконазы, и исследование влияния дополнительного N-концевого остатка Met на ее энзиматические свойства.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для получения экспрессионных конструкций были использованы созданные на основе плазмид pET22 и pCANTAB-5his6 экспрессионные векторы pETCm, pECA и pETS (рис. 1). Они позволяют направлять целевой белок в периплазматическое пространство при помощи лидерных пептидов *pelB* (pETCm, pETS) и *CAT* (pECA), а также добавлять к C-концу белка последовательность 6xHis и эпитетоп с-мус белка *rb2muc*, узнаваемый MA

9E10.2 [12]. Данные вспомогательные элементы существенно облегчают детекцию и очистку рекомбинантного белка.

Для получения конструкции А (рис. 2) использовался синтетический ген *onc* в составе плазмиды pET11d [6], любезно предоставленной д-ром Ричардом Д. Йолом (Национальный институт нейрологических заболеваний, НИЗ, Бетесда, США). Фрагмент ДНК, ОРС гена *onc*, был амплифицирован методом ПЦР с использованием олигонуклеотидов (I) и (IV) (табл. 1), комплементарных 5'- и 3'-концам ОРС гена, обработан рестриктазой *BamHI* и лигирован с подготовленным вектором pETCm. При экспрессии полученной конструкции образующаяся форма онконазы (MOnc) должна была содержать дополнительный остаток Met(–1), остаток Gln в положении 1, замену M23L и дополнительную C-концевую последовательность длиной 33 а.о., включающую в себя линкерный участок Gly-Met-Gly-Ser-Gly-Ser-Gly-Thr-Asp-Pro-His-Asp-Pro, последовательность 6xHis и эпитетоп с-мус.

Для получения конструкций В и С (рис. 2) ген *onc* в составе конструкции А был реамплифицирован с использованием олигонуклеотидов (II) или (III), соответственно, и (V) (табл. 1). Полученные фрагменты ДНК были обработаны рестриктазами *NcoI* и *NotI* и лигированы с аналогично рестрицированным вектором pECA (рис. 1). Формы онконазы, продуцируемые при экспрессии данных конструкций, не должны были содержать N-концевого остатка Met и потенциально должны содержать на N-конце зрелого белка остаток Gln (Q'Onc) или Glu (EOnc).

В случае конструкции D (рис. 2) *NcoI-NotI*-фрагмент ДНК из конструкции В был переклонирован в аналогично рестрицированный вектор pETS (рис. 1). При экспрессии данной конструкции образующаяся форма рекомбинантного белка (Q'Onc), содержащая N-концевой остаток Gln, предположительно не должна была отличаться по первичной структуре от белков Q'Onc и EOnc при условии превращения N-концевых остатков Gln или Glu в остаток пирролидонкарбоновой кис-

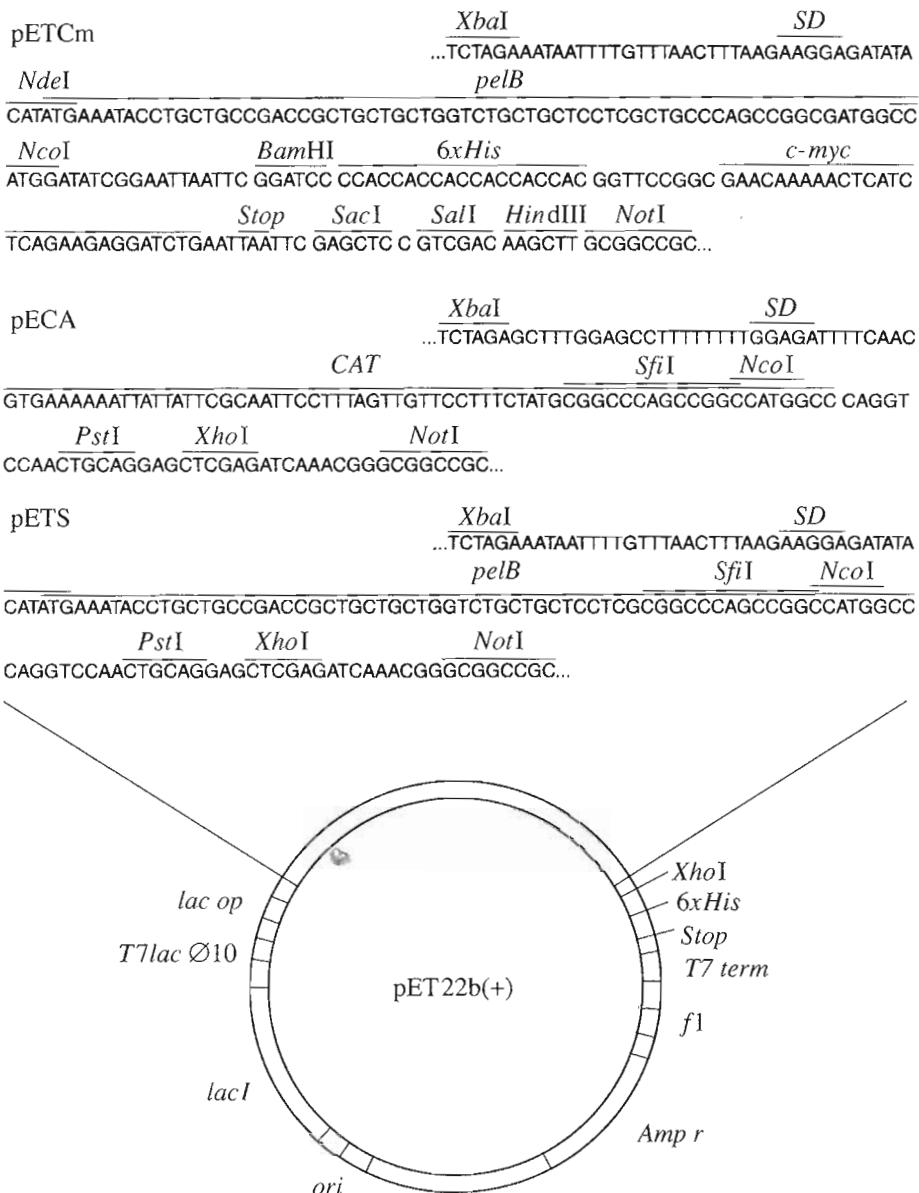


Рис. 1. Схема экспрессионных векторов. Чертой сверху обозначены: *pelB* и *CAT* – участки гена, кодирующие соответствующие сигнальные пептиды; *SD* – последовательности Шайна–Дальгарно; *c-myc* – участок гена, кодирующий эпипото *c-myc*; *6xHis* – участок гена, кодирующий последовательность *6xHis*; соответствующие сайты рестрикции.

лоты (<E>). Данное экспериментально зафиксированное посттрансляционное изменение молекулы онконазы предположительно должно происходить путем спонтанного дезамидирования с последующей циклизацией для остатка Gln [9] и циклизации для остатка Glu [6].

Таким образом, полученный набор конструкций при экспрессии должен был приводить к появлению рекомбинантных форм онконазы с последовательностью *N*-концевых аминокислотных остатков M(-1)Q1 (конструкция А) или <E1 (конструкции В–Д). Использование конструкций В–Д должно было позволить уточнить оптимальную структуру 5'-концевой части гетерологичного ге-

на *ons*, приводящую к оптимальному уровню продукции растворимой формы целевого белка. Различия в структуре конструкций В–Д состояли: а) в использовании предтрансляционного участка гена III фага M13 для конструкций В, С и стандартного предтрансляционного участка плазмиды pET22 для конструкции Д; б) части ОРС, соответствующей лидерному пептиду CAT, – для конструкций В, С и лидерному пептиду *pelB* – для конструкции Д и в) кодона аминокислоты, находящейся в первом положении зрелой онконазы, Gln для конструкций В и Д и Glu для конструкции С.

Для экспрессии полученных конструкций среди DE3-лизогенизированных штаммов *E. coli*

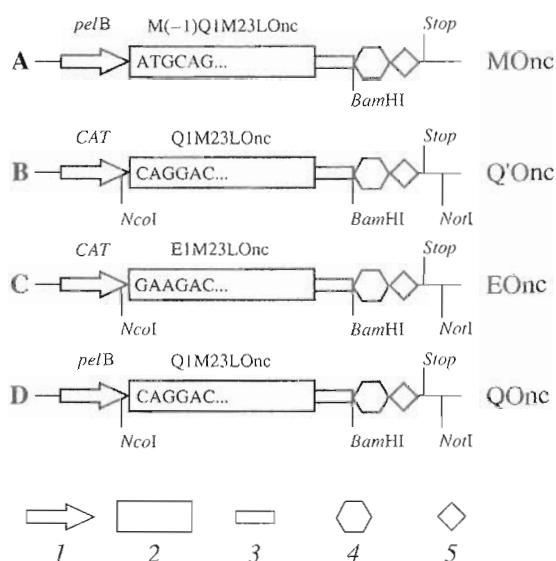


Рис. 2. Схема экспрессионных конструкций. Обозначены участки, кодирующие: лидерные пептиды (1), ген онкогена (2), линкерный пептид (3), последовательность 6xHis (4), эпипитон с-тус (5).

BL21(DE3), AD494(DE3), HMS174(DE3) был отобран штамм BL21(DE3), дававший во всех четырех случаях максимальный уровень синтеза растворимой формы целевого белка. Оптимальные условия экспрессии, одинаковые для всех конструкций, составили: подрост культуры до оптической плотности A_{600} 0.6–0.8 при 30°C, индукция 1 mM IPTG в течение 2 ч при той же температуре.

Относительный уровень продукции растворимой формы рекомбинантной онкогены, определенный методом дот-блотинга, был принят для белка MOnc за 100% и составил для Q'Onс ~25, для EOnc <10 и для QOnc ~60%. Таким образом, было показано, что оптимальной для получения

рекомбинантной онкогены с нативной структурой N-конца является конструкция D. Для дальнейших исследований использовалась пара конструкций A и D, различающихся только кодонами N-концевых остатков зрелой онкогены – M(-1)Q1 и Q1, соответственно.

При проведении пробных экспериментов по экспрессии и выделению целевых белков было установлено, что большая часть онкогены присутствует в клетках в нерастворимой форме (рис. 3а и б, дорожки 5), а фракция белков периплазмы, выделенная по [13], содержит незначительные количества целевых белков (рис. 3а и б, дорожки 3). Выход обоих белков MOnc и QOnc после очистки составлял всего 4–15 мкг на литр бактериальной культуры; данный способ получения белков был признан неэффективным.

Поскольку большая часть растворимой формы онкогены детектировалась не во фракции белков периплазмы, а в полном лизате клеток (рис. 3а и б, дорожки 4), была исследована возможность получения онкогены из тотальной фракции растворимых белков *E. coli*.

Для выделения целевого белка было опробовано несколько способов одностадийной хроматографической очистки, ни в одном из случаев не приводивших к получению электрофоретически чистого белка без значительных его потерь. Полностью очищенные (рис. 4а и б, дорожки 1, 3) продукты с удовлетворительным выходом (0.4–1 мг/л) были получены при использовании следующей процедуры двухстадийной хроматографической очистки:

1. Металлохелатная хроматография на сорбенте Talon с элюцией онкогены EDTA.
2. Ионообменная хроматография на сорбенте Mono S при рН 7.0 с элюцией продукта в линейном градиенте концентрации NaCl (0–500 мМ).

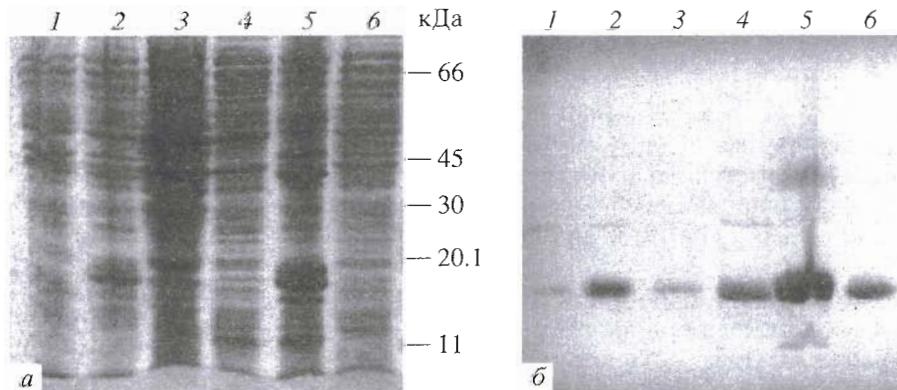


Рис. 3. Электрофоретический анализ в 12% SDS-ПААГ распределения рекомбинантной онкогены в культуре клеток *E. coli* BL21(DE3), трансформированной конструкцией D (для конструкции А аналогично) (а) и иммуноблотинг с MA 9E10.2 (б): тотальный клеточный белок до индукции (1) и после индукции (2), фракция периплазматических белков (3), растворимые белки (4), нерастворимые белки (5), супернатант клеток (6).

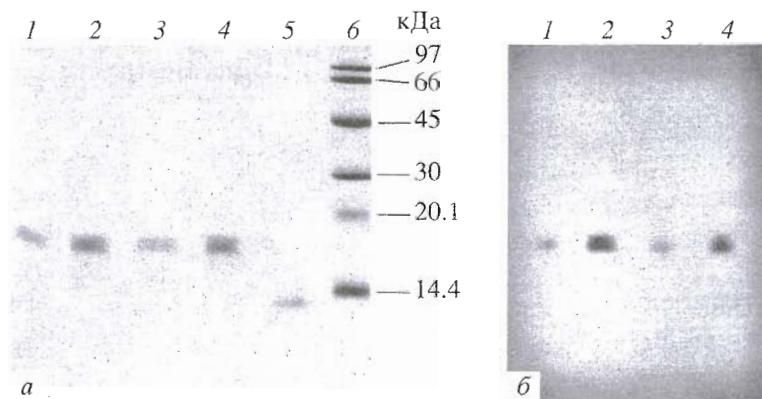


Рис. 4. Электрофоретический анализ чистоты и идентичности препаратов рекомбинантной онконазы в 12% SDS-ПААГ (а) и иммуноблотинг с MA 9E10.2 (б). Очищенные белки: MOnс, выделенный из клеточного лизата (1) и супернатанта клеток (2), и QOnс, выделенный из клеточного лизата (3) и супернатанта клеток (4), РНКаза А (5), маркер (6).

В связи с известными данными о секреции потенциально локализуемых в периплазме *E. coli* рекомбинантных белков [14] в культуральную среду была проверена возможность накопления онконазы в среде. Появление целевого белка в супернатанте клеток детектировали методом дот-блоттинга при выращивании бактериальной культуры при 30°C в течение 12 ч в отсутствие индуктора. Количество онконазы увеличивалось с течением времени и стабилизировалось после 3 сут выращивания, что вполне согласуется с данными для аналогичной системы экспрессии гомологичного онконазе RC-RNase [14].

Для выделения и очистки секретированной формы онконазы была использована приведенная выше процедура (рис. 4а и б, дорожки 2, 4), выход продуктов составлял 0.2–0.6 мг/л. Данный метод получения рекомбинантной онконазы имел очевидное преимущество по сравнению с получением целевого белка из лизата клеток, не исключающим присутствия в очищенном белке его восстановленной формы. Его недостатком являлась низкая воспроизводимость результатов. В проведенных аналитических экспериментах, в том числе и с использованием ферментера с контролем pH среды и уровня аэрации, не удалось установить условия роста, стабильно приводящие к активной секреции онконазы в культуральную среду.

Для подтверждения идентичности выделенные двумя методами белки MOnс и QOnс были охарактеризованы масс-спектрометрическим методом TOF-MALDI (десорбция-ионизация излучением лазера при помощи материала матрицы, детекция по времени полета). Измеренная молекулярная масса составила для белка MOnс 15 477.5 Да (теоретически рассчитанная – 15 469.4 Да), для продукта QOnс – 15 284.3 Да (15 321.2 Да); отклонения экспериментально найденной массы от теоретических значений не превышают погрешности метода для данного диапазона масс – 0.1% [15], что

подтверждает идентичность первичной структуры полученных рекомбинантных белков гипотетической последовательности.

Поскольку отличительным свойством онконазы является отсутствие взаимодействия с PRI, достаточным критерием отсутствия контаминации выделенных белков высокоактивными рибонуклеазами панкреатического типа может служить постоянство рибонуклеолитической активности в присутствии и в отсутствие PRI. Как видно из рис. 5, наблюдаемый уровень гидролиза рРНК белками MOnс и QOnс, выделенными из лизата клеток и культуральной среды, не изменяется при добавлении к реакционной смеси PRI в количестве, достаточном для эффективного ингибирования такого же количества РНКазы А.

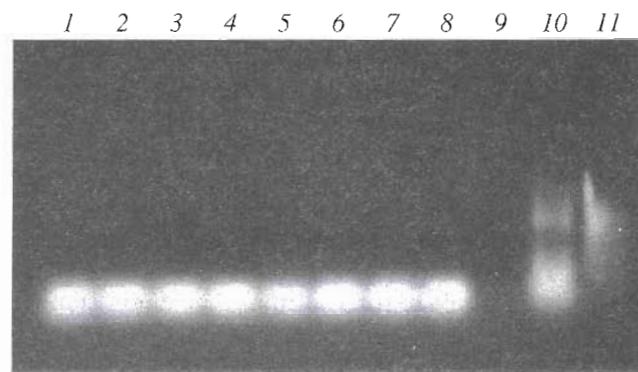


Рис. 5. Анализ в агарозном геле гидролиза рРНК рекомбинантными белками в отсутствие (1, 3, 5, 7) и в присутствии (2, 4, 6, 8) PRI: MOnс, выделенной из фракции растворимых белков (1, 2) и супернатанта клеток (3, 4); аналогично для QOnс, выделенной из фракции растворимых белков (5, 6) и супернатанта клеток (7, 8); контрольные реакции: 10 нг РНКазы А в присутствии 0 и 40 ед. ингибитора (9, 10); субстрат без добавления рибонуклеаз (11).

Таблица 2. Каталитическая активность рекомбинантных форм онконазы

Фермент	Относительная удельная активность*, %
MOnc, из растворимой фракции	3.79 ± 0.36
MOnc, из супернатанта	4.04 ± 1.04
QOnc, из растворимой фракции	3.51 ± 0.18
QOnc, из супернатанта	4.05 ± 0.17
Рибонуклеаза А	100 ± 11.3
Нативная онконаза, по данным [6]	4.41
Рекомбинантная онконаза M(-1)Q1M23L, по данным [6]	0.882
Рекомбинантная онконаза <E1M23L, по данным [6]	7.49

*Относительно РНКазы А, активность которой в данных условиях принята за 100%.

Удельную рибонуклеолитическую активность препаратов белков MOnc и QOnc, полученных как из лизата клеток, так и из культуральной среды (табл. 2), определяли по описанным в литературе [6] методикам. Найденная относительная удельная активность обоих вариантов рекомбинантной онконазы при использовании в качестве субстрата полиуридиевой кислоты не имела существенных различий, была одинакова для белков, выделенных из лизата клеток и культуральной среды, и соответствовала литературным данным для нативной онконазы.

Изучение цитотоксического действия продуктов MOnc и QOnc на трансформированные клетки линий K-562, HeLa, MCF-7 и EL-4 выявило наличие у них антипоплиферативных свойств в диапазоне концентраций белка 0.1–0.5 мкМ, что также соответствовало литературным данным [4].

Таким образом, было показано, что продукция и выделение онконазы в растворимой форме приводит к получению полностью активной формы белка. Дополнительный N-концевой остаток Met в полипептидной цепи фермента не изменяет его активность, в отличие от рекомбинантной онконазы, выделенной с использованием процедуры рефолдинга. Разработанный метод экспрессии онконазы позволяет уточнить ее структурно-функциональные свойства и может быть использован для получения иных измененных форм фермента. Кроме того, в процессе проведенных экспериментов было обнаружено, что присоединение достаточно длинного пептида к C-концу белка не оказывает влияния на ферментативные свойства онконазы. Данные наблюдения позволяют в дальнейшем использовать онконазу для создания гибридных белков с различными функционально значимыми для клетки элементами, что может значительно расширить области применения онконазы в терапии злокачественных новообразований.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали следующие реактивы и ферменты: Трис, персульфат аммония, тетраборат натрия, EDTA, реагент BCA (bicinchoninic assay) для определения белка, одно- и двузамещенный фосфаты натрия, хлорид натрия, ацетат натрия, 4-хлор-1-нафтол, глюкозу, 2,5-дигидроксибензойную кислоту, дитиотрейт, конъюгат анти-антител (IgG мыши (Fc-специфичных)) овцы с пероксидазой хрена (Sigma, США); акриламид, N,N'-метиленбисакриламид, SDS, мочевину sequence grade, набор для секвенирования плазмидной ДНК, нитроцеллюлозную мембрану Hybond C extra (Amersham, США); агар, триптон, дрожжевой экстракт (Difco, Великобритания); эндонуклеазы рестрикции, IPTG (Fermentas, Литва); рибонуклеазу А, маркеры для электрофореза белков LMW (Pharmacia, Швеция); ДНК-лигазу фага T4, термостабильные ДНК-полимеразы *Taq* и *Pfu*, щелочную фосфатазу, ДНК-полимеразу I *E. coli* (фрагмент Кленова) (USB, США); плазмиду pET22b(+), штаммы *E. coli* (Novagen, США); плазмиду pCANTAB5-his6 (Cambridge Antibody Technology, США); глицерин (Реахим, РФ). Полиуридиловая кислота любезно предоставлена Феофановым С.А. (ФИБХ РАН); пРНК *E. coli* – Петровым А.В. (химический факультет МГУ).

Экспрессионные векторы и конструкции. Вектор pETCm был получен на основе описанного нами ранее [16] вектора pETC путем рестрикции по сайту *Eco*RI, достривания одноцепочечных участков ДНК и последующего лигирования, что привело к образованию дополнительного стоп-кодона после участка последовательности, кодирующего эпитетоп с-тус. Для проведения лигирования с геном *opc* полученный вектор был обработан рестриктазой *Nco*I с достриванием одноцепочечных участков ДНК и последующей рестрикцией *Bam*H.

Вектор pECA был получен на основе вектора pET22b(+) путем последовательной инсерции *Hind*III-*No*I-фрагмента плазиды pCANTAB5his6

и делеции фрагмента *Xba*I–*Hind*III, включающей восстановление сайтов *Xba*I и *Hind*III и последующее лигирование. При этом произошла замена исходного предтрансляционного участка и фрагмента последовательности плазмида, соответствующего лидерному пептиду *peIV* на 5'-концевую область гена III бактериофага M13, содержащую аналогичные элементы.

Вектор pET5 был получен путем введения в область вектора pECA, соответствующую лидерному пептиду, сайта рестрикции *Nco*I. Для этого соответствующий участок плазмида pETC был амплифицирован методом ПЦР с использованием олигонуклеотидов (VI) и (VII). Полученный фрагмент был обработан рестриктазами *Xba*I и *Nco*I и лигирован с обработанным теми же рестриктазами вектором pECA.

Фрагменты ДНК, содержащие соответствующие нуклеотидные последовательности вариантов гена онконазы, были получены методом ПЦР с применением ДНК-полимеразы *Pfu*. Для получения экспрессионных конструкций полученные фрагменты ДНК обрабатывали соответствующими рестриктазами и лигировали с векторами по сайтам узнавания рестриктаз как описано выше. Лигазными смесями трансформировали электрокомпетентные клетки штамма TOP10.

Первичный скрининг клонов вели при помощи ПЦР колоний. Плазмидную ДНК, выделенную из позитивных клонов, дополнительно фракционировали методом рестриктного анализа. Корректность сборки экспрессионных конструкций и векторов проверяли секвенированием по методу Сэнгера.

Приготовление электрокомпетентных клеток, трансформацию, рестрикцию, лигирование, ПЦР и электрофорез ДНК осуществляли по стандартным методикам [17], выделение плазмидной ДНК по [18].

Экспрессию рекомбинантных генов проводили в DE3-лизогенизированных клетках *E. coli*. Для приготовления инокулята проводили электротрансформацию клеток соответствующей плазмида и растили колонии на чашке, содержащей 50 мкг/мл ампициллина и 2% глюкозы при 30°C. Бактериальный газон полностью сусpendировали в 3 мл среды и инокулировали культуру в соотношении 1 : 300. В случае выделения онконазы из фракции белков периплазмы или тотальных растворимых белков для экспрессии использовали среду TB или 2 × YT с добавлением 100 мкг/мл ампициллина и 0.1% глюкозы. В случае выделения секретированной формы целевого белка использовали среду TB, содержащую 100 мкг/мл ампициллина и не содержащую глюкозы.

Детекция уровня экспрессии. Пробы освещенной культуральной среды объемом 500 мкл, образцы тотального растворимого белка *E. coli*, доведенные изотоническим буфером до 300 мкл, и разведения контрольного антигена в объеме

300 мкл наносили на сухую нитроцеллюлозную мембрану при помощи аппарата "manifold", лунки 3 раза промывали изотоническим буфером, мембрану извлекали, инкубировали 1 ч в растворе для блокирования BSA [19], последовательно отмывали, проводили конъюгирование с MA 9E10.2 (титр 1 : 10000) и конъюгатом антивидовых антител с пероксидазой хрена (титр 1 : 4000). Мембрану проявляли 4-хлор-1-нафтолом, сканировали при помощи планшетного сканера и денситометрировали пятна при помощи программы Scion Image beta 3b (Scion Corp., США). Количество целевого белка в исследуемых пробах определяли по калибровочной кривой, построенной по охарактеризованному антигену.

Выделение белков. Фракцию белков периплазмы получали по методикам работы [13], фракцию тотальных растворимых белков – как описано в [19]. Кондиционированную культуральную среду осветляли центрифугированием при 14000г в течение 10 мин и концентрировали ультрафильтрацией до 1/20 первоначального объема.

Хроматографическая очистка. К белковым экстрактам добавляли 1/10 объема десятикратного буфера A (50 мМ фосфат натрия, 300 мМ NaCl, pH 8.0), доводили pH до 8.0 и наносили со скоростью 30 объемов колонки в час на колонку (0.5 × 3.5 или 1.0 × 7 см) с металлохелатным сорбентом Talon (Clontech, США), предварительно уравновешенным буфером A. Колонку промывали тем же буфером до прекращения дрейфа базовой линии. Белки элюировали буфером A, содержащим 50 мМ EDTA. Замену буфера перед вторым раундом хроматографии осуществляли диализом или ультрафильтрацией.

Для ионообменной хроматографии использовали колонку Mono S HR5/5 (Pharmacia, Швеция). Образец наносили в буфере, содержащем 10 мМ фосфат натрия, pH 7.0, белки элюировали в линейном градиенте концентрации хлорида натрия при скорости потока 0.5 мл/мин.

Масс-спектрометрию выполняли по методу TOF-MALDI на масс-спектрометре VISION 2000 (ИБХ РАН). В качестве материала матрицы использовали 2,5-дигидроксибензойную кислоту. Исследуемые белки наносили на мишень в водном 0.2% растворе трифтормускусной кислоты. Дополнительную калибровку прибора проводили при помощи РНКазы A.

Рибонуклеолитическая активность. Ингибиование активности онконазы исследовали по методике [8] с некоторыми изменениями. Гидролиз РНК проводили при 37°C в течение 30 мин в растворе 20 мМ Трис-HCl, pH 7.6, содержащем 100 мМ NaCl и 10 мМ дитиотрейт. Субстрат (pRNK) использовали в количестве 0.5 мкг/пробу, объем проб – 10 мкл. Исследуемые рибонуклеазы и РНКазу A (10 нг) предварительно инкубировали с 40 ед. PRI (Promega, США) или без него в течение 10 мин. Электрофорез гидролизатов РНК проводили в

1.5% агарозном геле, содержащем бромистый этидий в концентрации ~0.5 мкг/мл.

Кинетику гидролиза полиуридиловой кислоты измеряли по методике, приведенной в работе [6] на спектрофотометре DU-70 (Beckman, США) при 25°C.

Антипролиферативную активность измеряли при помощи МТТ-теста (аналог теста на колониеобразование) по методикам, приведенным в работе [20]. Считали, что исследуемый белок проявляет антипролиферативную активность в исследуемом разведении, если оптическая плотность образующегося при расщеплении МТТ формазана в экспериментальной серии (3 параллельных измерения) достоверно (критерий Стьюдента) меньше оптической плотности в контрольной серии (3 параллельных измерения).

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем благодарность Е. Пономареву, Н. Зеленовой, О. Кабановой и Б. Ермолинскому за ценные консультации и помощь в работе. Работа была поддержана программой "Научные школы" (грант № 00-15-97844).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ardelt W., Mikulski S.M., Shogen K. // J. Biol. Chem. 1991. V. 266(1). P. 245–251.
2. Wu Y., Mikulski S.M., Ardelt W., Rybak S.M., Youle R.J. // J. Biol. Chem. 1993. V. 268(14). P. 10686–10693.
3. Irie M., Nitta K., Nonaka T. // Cell. Mol. Life. Sci. 1998. V. 54(8). P. 775–784.
4. Notomista E., Catanzano F., Graziano G., Dal Piaz F., Barone G., D'Alessio G., Di Donato A. // Biochemistry. 2000. V. 39(30). P. 8711–8718.

5. Leland P.A., Staniszewski K.E., Kim B., Raines R.T. // FEBS Lett. 2000. V. 477(3). P. 203–207.
6. Boix E., Wu Y., Vasandani V.M., Saxena S.K., Ardelt W., Ladner J., Youle R.J. // J. Mol. Biol. 1996. V. 257(5). P. 992–1007.
7. Chen S., Le S.Y., Newton D.L., Maizel J.V., Jr., Rybak S.M. // Nucl. Acids Res. 2000. V. 28(12). P. 2375–2382.
8. Leland P.A., Schultz L.W., Kim B.M., Raines R.T. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95(18). P. 10407–10412.
9. Notomista E., Cafaro V., Fusiello R., Bracale A., D'Alessio G., Di Donato A. // FEBS Lett. 1999. V. 463(3). P. 211–215.
10. Newton D.L., Boque L., Wlodawer A., Huang C.Y., Rybak S.M. // Biochemistry. 1998. V. 37(15). P. 5173–5183.
11. Shapiro R., Harper J.W., Fox E.A., Jansen H.W., Hein F., Uhlmann E. // Anal. Biochem. 1988. V. 175(2). P. 450–461.
12. Evan G.I., Lewis G.K., Ramsay G., Bishop J.M. // Mol. Cell. Biol. 1985. V. 5(12). P. 3610–3616.
13. Chang A.C.Y., Cohen S.N. // J. Bacteriol. 1978. V. 134. P. 1141–1156.
14. Huang H.C., Wang S.C., Lee Y.J., Lu S.C., Liao Y.D. // J. Biol. Chem. 1998. V. 273(14). P. 6395–6401.
15. Jensen O.E., Shevchenko A., Mann M. // Protein Analysis by Mass Spectrometry / Ed. T.E. Creighton. London; New York: IRL Press, 1997. P. 29–58.
16. Демин А.В., Колесников А.В., Олферьев М.А., Фаворов П.В., Фегединг К.В., Габибов А.Г., Гнучев Н.В. // Докл. РАН. 1998. Т. 360(4). С. 547–549.
17. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, New York; Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989.
18. Lee S., Rasheed S. // Biotechniques. 1990. V. 9. P. 676–679.
19. Harlow E., Lane D. Antibodies. A Laboratory Manual. Gold Spring Harbor, New York; Cold Spring Harbor Lab. Press, 1988.
20. Mossman T. // J. Immunol. Methods. 1983. V. 65. P. 55–63.

Structure–Function Study of Recombinant Onconase Variants

I. I. Vorobiev*, N. A. Ponomarenko*, O. M. Durova**, A. V. Kozyr*, A. V. Demin****,
A. V. Kolesnikov*, L. P. Sashenko****, **M. Ya. Karpeisky*****, and A. G. Gabibov*

e-mail: ivanv@ibch.ru

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP Moscow, 117997 Russia

**Vladimirsky Moscow Regional Research Clinical Institute, Moscow, Russia

***Engelhardt Institute of Molecular Biology, Moscow, Russia

****Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

A method for expression of an onconase gene leading to a soluble form of the protein was developed. The enzymatic and cytotoxic properties of the protein's recombinant forms were studied. Recombinant onconase with an additional *N*-terminal Met residue isolated in nondenaturing conditions did not substantially differ from the native enzyme in ribonucleolytic activity. The addition of a 33-mer peptide containing auxiliary elements for the simplification of isolation and detection of the recombinant protein did not affect the enzyme properties of onconase. The method proposed is useful for the onconase structure–function relation studies and enables construction of onconase-based fusion proteins for anticancer therapy. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2001, vol. 27, no. 4; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: onconase, ribonucleases, cytotoxicity, recombinant proteins, protein expression