



УДК 577.152.461*2:577.214.622

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ЭКСПРЕССИЯ ФРАГМЕНТА κДНК ГУАНИЛАТЦИКЛАЗЫ В СЕТЧАТКИ БЫКА В КЛЕТКАХ *Escherichia coli*

© 1997 г. О. В. Соловьева[#], Н. Г. АбдулаевИнститут биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 31.10.96 г. Принята к печати 21.03.97 г.

В клетках *Escherichia coli* экспрессирован фрагмент гена гуанилатциклазы В сетчатки быка длиной 1488 п. о., кодирующий каталитический и димеризующий домены, а также часть протеинкиназного домена. Продукт экспрессии получен в виде телец включения и переведен в растворимую форму с помощью солиubilизации в 6 М гуанидингидрохлориде. Полученный фрагмент гуанилатциклазы В имеет димерную структуру и обладает каталитической активностью, близкой к активности нативного фермента.

Ключевые слова: сетчатка глаз быка, гуанилатциклаза, экспрессия в *E. coli*.

Гуанилатциклазы (КФ 4.6.1.2) составляют семейство белков, катализирующих образование сGMP и органического пирофосфата из GTP в металлозависимой реакции [1]. В клетках гуанилатциклазы существуют как в растворимой, так и мембраносвязанной формах, которые различаются по структуре и функциям. В клетках сетчатки быка содержатся мембраносвязанные гуанилатциклазы GC-A и GC-B, которые являются рецепторами натрийуретических пептидов [2], и фоторецепторные ферменты retGC-1 и retGC-2, ответственные за ресинтез сGMP [3].

Сравнительный структурный анализ первичной структуры данных белков показал [4], что они не только высокогомологичны, но и имеют сходную структурную организацию (рис. 1). Внеклеточная лигандсвязывающая область включается в себя сигнальный пептид и N-концевую последовательность белка. Следующий за ней трансмембранный участок из 20–24 гидрофобных аминокислотных остатков связывает ее с внутриклеточной областью, которая содержит протеинкиназоподобный домен (названный так из-за высокой гомологии каталитическому участку протеинкиназы), междоменный димеризующий участок и каталитический домен, отвечающий за ферментативную функцию белка.

Сложность выделения мембраносвязанных гуанилатциклаз для структурных исследований обусловлена трудностью солиubilизации этих ферментов и их высокой нестабильностью. К тому же низ-

кое содержание гуанилатциклаз в сетчатке глаза не позволяет обеспечить выход, достаточный для структурных исследований (из 100 сетчаток выход белка составляет всего 100–140 мкг) [5]. Получение гуанилатциклаз сетчатки путем клонирования и экспрессии κДНК позволило бы преодолеть эту трудность и дало бы возможность более детального изучения механизмов световой адаптации, происходящих в зрительных клетках позвоночных.

Задача настоящей работы состояла в изучении принципиальной возможности получения функционально активного внутриклеточного домена гуанилатциклазы В сетчатки быка в гетерологической экспрессирующей системе. Внутриклеточные домены различных гуанилатциклаз обладают

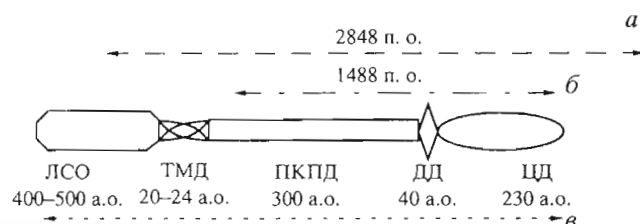


Рис. 1. Структурная организация гуанилатциклазы В [1]. ЛСО – внеклеточная лигандсвязывающая область, ТМД – трансмембранный домен, ПКПД – протеинкиназоподобный, ДД – димеризующий и ЦД – циклазный домены, составляющие внутриклеточную область. Отрезок *a* показывает положение фрагмента белка, соответствующего κДНК гуанилатциклазы, секвенированной ранее [6]; *b* – последовательности, соответствующей фрагменту κДНК гуанилатциклазы, клонированной и экспрессированной в настоящей работе, относительно полипептидной цепи гуанилатциклазы (отрезок *в*).

Сокращения: PMSF – фенилметилсульфонилфторид, GuHCl – гуанидингидрохлорид, IPTG – изопропил-β-D-тио-галактопиранозид, GC – гуанилатциклаза, сGMP – циклический гуанозинмонофосфат.

[#] Автор для переписки.

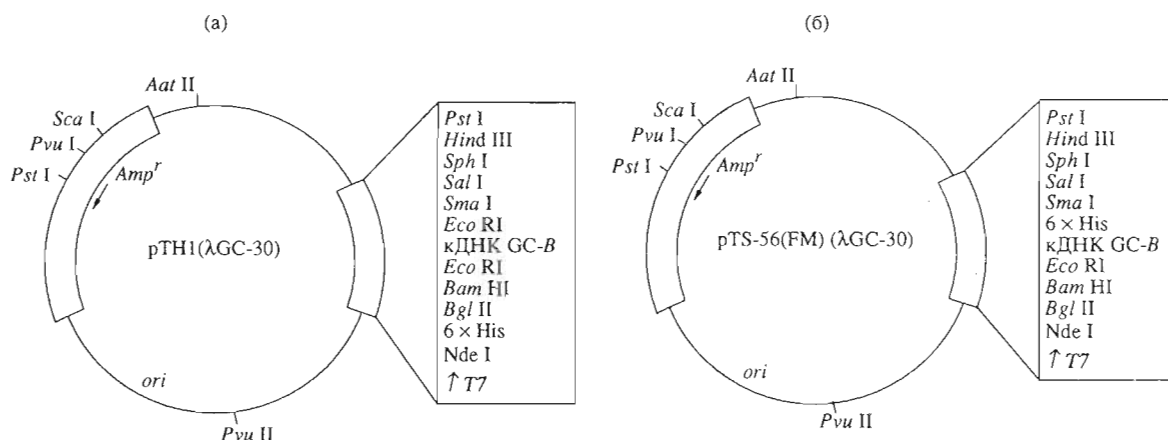


Рис. 2. Экспрессирующие векторы: (а) – pTH1 (λGC-30), (б) – pTS-56 (FM) (λGC-30).

высокой степенью гомологии [4], поэтому структурно-функциональные исследования этого домена GC-B могут дать ценную информацию о функционировании других гуанилатциклаз сетчатки.

Ранее [6] нами была определена нуклеотидная последовательность фрагмента κДНК гуанилатциклазы B из сетчатки быка длиной 2848 п. о. (который включал в себя также нетранслируемую область), на основании которой была выведена соответствующая аминокислотная последовательность участка GC-B длиной 869 а. о. (рис. 1). В данной работе для экспрессии в *E. coli* был выбран субфрагмент этой области κДНК гуанилатциклазы длиной 1488 п. о., который кодирует димеризующий и каталитический домены, а также часть протеинкиназного домена, которая, по литературным данным [7], необходима для проявления гуанилатциклазной активности (рис. 1). Этот фрагмент κДНК был снабжен концевыми линкерами для клонирования по *EcoRI*-сайту в экспрессирующем векторе pTH1 [8]. В плазмидной конструкции pTH1 предусмотрено наличие последовательности, включающей 6 гистидиновых остатков в N-конец кодируемой полипептидной цепи. Гексагистидиновый участок обеспечивает возможность выделения рекомбинантного продукта с использованием аффинной хроматографии на Ni²⁺-NTA-агарозе. Для трансформации был использован штамм *E. coli* МН-1.

Наличие вставки и ее ориентацию в выделенных плаزمиде проверяли рестриктивным анализом с использованием эндонуклеаз рестрикции *PstI* и *KpnI*, присутствующей в 3'-концевой части клонируемого фрагмента (рис. 2а). Для контроля за сохранением рамки считывания рекомбинантные плазмиды анализировали путем секвенирования по методу Сэнгера. В результате для экспрессии была отобрана плаزمида pTH1 (λCG-30), содержащая под контролем T7-промотора открытую рамку считывания, включающую в себя инициаторный ATG-кодон, последовательность, кодиру-

ющую 6xHis, фрагмент гена гуанилатциклазы и стоп-кодон TAA.

Для экспрессии фрагмента κДНК GC-B был выбран штамм *E. coli* BL-21(DE-3), несущий в хромосоме ген РНК-полимеразы фага T7 под контролем индуцибельного *lac*-промотора [9]. Для обработки рекомбинантного белка клетки выращивали до достижения в культуре значения оптического поглощения A₆₀₀, равного 0,5. Затем индуцировали экспрессию T7-РНК-полимеразы и соответственно рекомбинантного белка добавлением в культуральную жидкость IPTG до концентрации 1 мМ. Согласно анализу суммарного белка в лизате клеток (рис. 3а), накопление рекомбинантного продукта происходило за последующие 3–5 ч при 37°C. Анализ фракции растворимых белков, полученной после лизирования клеток с помощью ультразвука, показал отсутствие в ней GC-B. Это свидетельствовало о том, что искомым фрагмент GC-B находится в водонерастворимом состоянии в составе телец включения. Для обеспечения выхода целевого продукта в водорастворимом состоянии часто применяется уменьшение температуры инкубации культуры клеток до 30°C [10], однако в нашем случае это не привело к желаемым результатам. Для выделения рекомбинантного белка мы применили денатурирующий агент (6 М GuHCl), что позволило провести очистку продукта методом аффинной хроматографии на Ni²⁺-NTA-агарозе.

Анализ очищенного рекомбинантного белка в SDS-ПААГ показал наличие полос, соответствующих как полноразмерному продукту с M ~ 55 кДа, так и более коротким белковым фрагментам (рис. 3а). Данные иммуноблоттинга и N-концевого аминокислотного анализа (не приведены) показали, что эти минорные белки – N-концевые фрагменты полноразмерного рекомбинантного белка.

Получение гомогенного продукта из такой смеси представляет собой сложную задачу, и при этом трудно ожидать высокого выхода целевого

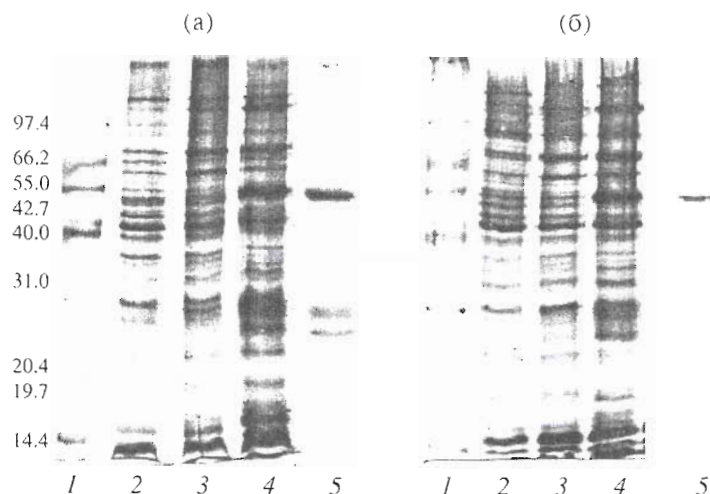
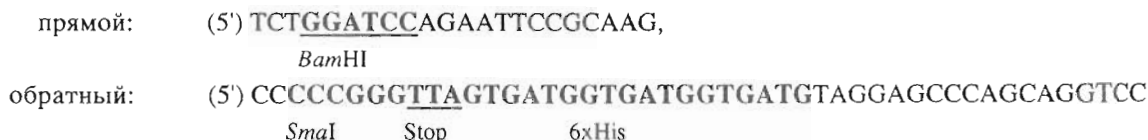


Рис. 3. Анализ экспрессии фрагмента кДНК гена гуанилатциклазы *B*. Электрофорез в 12.5% SDS-ПААГ суммарных клеточных белков клеток *E. coli* BL-21 (DE-3), содержащих плазмиды рТН1 (а) и рТS-56 (б) с фрагментом кДНК гена гуанилатциклазы *B* λ GC-30; приведены электрофореграммы клеток с плазмидой без вставки (2), с плазмидой до индукции IPTG (3), через 5 ч после индукции IPTG (4) и очищенного препарата белка после хроматографии на Ni²⁺-NTA-агарозе (5); 1 – стандарты молекулярных масс (кДа).

белка. Для выделения гомогенного продукта в одну стадию нами был сконструирован новый вектор, в котором фрагмент, соответствующий 6xHis, находится в 3'-концевой области кодирующей последовательности. В качестве исходного материала для новой экспрессирующей конструкции был использован вектор рТS-56 (FM) [7],

аналогичный рТН1, но не содержащий последовательности, кодирующей гексагистидиновый участок. Для создания новой конструкции были синтезированы олигонуклеотидные праймеры, обеспечивающие включение нужных сайтов рестрикции для клонирования с сохранением рамки считывания в экспрессирующем векторе:



Полученный в результате ПЦР фрагмент кДНК обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *Bam*HI и *Sma*I. В результате клонирования нового фрагмента ДНК в векторе рТS-56 (FM)/*Bam*HI-*Sma*I была получена экспрессирующая плаزمида рТS-56 (FM) (λ GC-30) (рис. 26). Последовательность клонированного фрагмента ДНК проверили секвенированием. Условия экспрессии кДНК и очистки рекомбинантного белка, описанные выше, были сохранены и для этой конструкции. Электрофоретический анализ продуктов экспрессии после очистки на Ni²⁺-NTA-агарозе показал наличие индивидуального белка с *M* ~ 55 кДа (рис. 3б). Очищенный рекомбинантный белок изучали в функциональных тестах.

Для проявления активности белка необходимо правильное формирование его вторичной и третичной структур. Данный процесс для белка, имеющего в составе 9 остатков цистеина [6], затруднен. Для получения рекомбинантного белка в нативной конформации избыток денатурирующего агента удаляли разбавлением в процессе ступен-

чатого диализа. При подборе условий ренатурации (время, температура, концентрация восстанавливающих агентов) оптимальными оказались следующие параметры: 30 ч, 4°C, 3 мМ восстановленный и 0.3 мМ окисленный глутатион.

Для измерения ферментативной активности полученного фрагмента GC-B в катализируемой гуанилатциклазой реакции превращения GTP в cGMP был использован метод, основанный на разделении смеси продуктов реакции на колонке Mono-Q HR 5/5 (Pharmacia) [11, 12]. Максимальное значение специфической активности рекомбинантного продукта составило 0.9 ед./мг (суммарная фракция) для первой конструкции и 0.775 ед./мг для второй, что близко к значению активности нативного белка, измеренной другим методом [5].

Методом гель-фильтрации в неденатурирующих условиях на колонке TSK-G3000 SW было показано, что рекомбинантный фрагмент GC-B после ренатурации представляет собой димер с *M* ~ 110 кДа (рис. 4). Ранее димерная форма была установлена лишь для GC-A [13].

Предложенная нами система экспрессии кДНК, очистки и ренатурации продукта демонстрирует возможность получения рекомбинантного фрагмента GC-B, обладающего гуанилатциклазной активностью, с выходом 9.5 мг белка из 1 л культуры. Разработка такой системы значительно расширяет возможности для дальнейших структурно-функциональных исследований гуанилатциклазы B.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали: акриламид, N,N'-метиленбисакриламид, персульфат аммония, додецилсульфат натрия, N, N, N', N'-тетраметилэдиамин (Bio-Rad, США); 1,4-дителиотреит, IPTG, набор белков-маркеров для электрофореза, эндонуклеазы рестрикции *Bam*HI, *Eco*RI, *Sma*I, *Pst*I, *Kpn*I, ДНК-лигазу фага T4, dNTP, штамм *E. coli* BL21(DE-3), щелочную фосфатазу *E. coli* из кишечника теленка (Promega, США); Taq-ДНК-полимеразу (Boehringer-Mannheim), ампициллин, глицерин, кумаси R-250, агарозу, GTP, cGMP, GMP, бромистый этидий, PMSF, пирофосфатный набор (Sigma, США); триптон, дрожжевой экстракт, бакто-агар (Difco, США), трис(гидроксиметил)аминометан, гуанидингидрохлорид, диметилсульфоксид (Fluka, Швейцария); Ni²⁺-NTA-агарозу (Qiagen, США), Mono-Q HR 5/5 (Pharmacia).

Клонирование кДНК гуанилатциклазы и определение ее нуклеотидной последовательности. Работу с рекомбинантными ДНК осуществляли стандартными методами [14]. Для амплификации фрагментов кДНК, предназначенных для клонирования, проводили 30 циклов ПЦР при следующих параметрах температурного цикла: денатурация – 30 с при 94°C, отжиг с праймерами – 30 с при 66°C, амплификация – 1 мин 20 с при 72°C. Полученные фрагменты ДНК клонировали в векторных конструкциях рТН1 [8] по сайту *Eco*RI и рTS-56 (FM) [8] по сайтам *Bam*HI и *Sma*I. Секвенирование плазмид проводили по методу Сэнгера с использованием набора Sequenase T7, version 3 (Pharmacia, Швеция), руководствуясь рекомендациями изготовителя.

Экспрессия фрагмента кДНК гуанилатциклазы B в *E. coli*. Для экспрессии фрагмента кДНК гуанилатциклазы в качестве штамма хозяина был выбран штамм *E. coli* BL-21(DE-3), содержащий ген, кодирующий T7-РНК-полимеразу [9]. Рекомбинантные конструкции рТН1 (λGC-30) и рTS-56 (FM) (λGC-30), содержащие вставку, были отобраны с помощью рестриктоного анализа, и их структура подтверждена секвенированием. Трансформацию компетентных клеток *E. coli*, а также выделение плазмид осуществляли согласно методикам работы [14]. Выращивание биомассы *E. coli* BL-21(DE-3), содержащей экспрессирующие векторы, проводили в LB-среде с 50 мкг/мл ампициллина. Культуру выращивали в течение

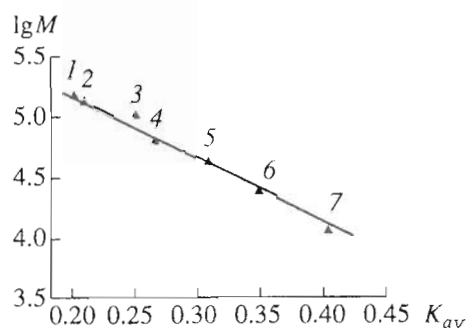


Рис. 4. Определение молекулярной массы рекомбинантного белка графическим методом в координатах $lgM-K_{av}$ (K_{av} – коэффициент распределения между жидкой фазой и фазой геля) с использованием белков-маркеров молекулярных масс (M , кДа): 1 – альдолаза (158), 2 – лактатдегидрогеназа (140), 3 – рекомбинантный фрагмент гуанилатциклазы B, полученный в векторе рTS-56 (FM) (λGC-30) (110), 4 – бычий сывороточный альбумин (68), 5 – овальбумин (44), 6 – химотрипсिनоген A (25), 7 – цитохром C (12.5).

ночи при 37°C. Ночную культуру (2 мл) перенесли в 250 мл среды LB с ампициллином (50 мкг/мл) и выращивали при 37°C с интенсивной аэрацией до значения A_{600} 0.5. Затем добавляли индуктор *lac*-промотора IPTG (конечная концентрация 1 mM) и инкубировали 3–5 ч.

Очистка рекомбинантного белка. Для выделения гуанилатциклазы из телец включения суспензию клеток продуцента подвергали серии отмывок: 250 мл культуры клеток оставляли во льду на 10 мин, затем центрифугировали (15 мин, 2500g). Осадок ресуспендировали в 12.5 мл охлажденного во льду буфера, содержащего 20 mM трис-HCl (pH 8.0), 20% сахарозы, 1 mM EDTA, 2 mM PMSF, и инкубировали во льду 10 мин. Полученную суспензию центрифугировали в тех же условиях. Осадок ресуспендировали в Milli-Q-воде, инкубировали во льду еще 10 мин и снова центрифугировали (15 мин, 2500g), после чего осадок ресуспендировали в 2.5 мл буфера, содержащего 50 mM трис-HCl (pH 8.0), 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.2 mM PMSF. Полученную суспензию обрабатывали с помощью ультразвукового дезинтегратора-MSE (8 × 20 с, интервалы 20 с, амплитуда 4, мощность средняя), разбавляли до 12.5 мл тем же буфером и центрифугировали (30 мин, 20000g). Осадок ресуспендировали в промывочном буфере (50 mM трис-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 1% Tween-80, 25% сахароза) и центрифугировали (10 мин, 30000g). Осадок после центрифугирования ресуспендировали в 10 мл буфера A (6 M GuHCl, 0.1 M (Na, H)PO₄, 0.01 M трис-HCl, pH 8.0) и солубилизировали 1 ч во льду. Суспензию центрифугировали (15 мин, 25000g). Полученный таким образом осветленный клеточный экстракт (10 мл) наносили со скоростью 250 мкл/мин на колонку (1.0 × 6 см) с Ni²⁺-NTA-агарозой, предвари-

тельно уравновешенной буфером А, согласно инструкции производителя. Колонку последовательно промывали 10 объемами (от объема колонки) буфера А и 5 объемами буфера Б (6 М GuHCl, 0.1 М (Na, H)PO₄, 0.01 М трис-HCl, pH 6.3). Элюцию белка осуществляли буфером Б, содержащим 250 мМ имидазол. Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорда [15]; фракции анализировали с помощью SDS-электрофореза по Лэммли [16].

Для получения рекомбинантного белка в нативной конформации освобождались от избытка GuHCl ступенчатым разбавлением 10 мл элюата в процессе диализа (30 ч, 4°C): I ступень – 250 мл буфера (3 М GuHCl, 0.05 М трис-HCl, pH 8.0; 0.005% Tween-80, 20 мМ KCl, 3 мМ восстановленный глутатион, 0.3 мМ окисленный глутатион); II и III ступени – 500 и 1000 мл исходного буфера соответственно, но без денатурирующего агента.

Молекулярную массу рекомбинантного белка определяли гель-хроматографией на колонке TSK G-3000 SW на хроматографе FPLG-System (Pharmacia) в буфере, содержащем 50 мМ (Na, H)PO₄ (pH 7.3), 0.1 М NaCl, 1 мМ EDTA, 2 мМ MgCl₂, 1.4 мМ меркаптоэтанол, 1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина. Скорость элюции 0.2 мл/мин.

Ферментативная активность. Образец гуанилатциклазы после диализа (10 мкг) добавляли в буфер, содержащий 20 мМ трис-HCl (pH 8.0), 5 мМ NaCl, 100 мМ KCl, 700 нМ CaCl₂, 2 мМ MgCl₂, и инкубировали 20 мин при 30°C в присутствии 1 мМ GTP (конечный объем реакционной смеси 50 мкл). Реакцию останавливали добавлением 100 мкл холодной перхлорной кислоты и 10 мкл бычьего сывороточного альбумина с концентрацией 1 мг/мл. После центрифугирования супернатант нейтрализовали добавлением KOH. Содержание cGMP и GTP анализировали на колонке Mono-Q HR 5/5, предварительно уравновешенной буфером, содержащим 10 мМ трис-HCl (pH 8.0) и 1 мМ MgCl₂ (1 мл/мин). cGMP и GTP

элюировали в линейном градиенте концентрации NaCl (0 → 0.5 М, 7 мин, 1 мл/мин) в этом буфере. За 1 ед. акт. фермента принимали количество белка, катализирующее образование 1 мкмоль cGMP в 1 мин.

Авторы выражают благодарность сотрудникам ИБХ РАН А.Ф. Фрадкову за предоставление плазмид pTH1 и pTS-56 (FM), а также Н.С. Быстрову за синтез олигонуклеотидных зондов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lagnado L., Baylor D. // *Neuron*. 1992. V. 8. P. 995–1002.
2. Schulz S., Singh S., Bellet R., Sing G., Tubb D., Chin H., Garbers D. // *Cell*. 1989. V. 58. P. 1155–1162.
3. Lowe D., Dizhoor A., Liu K., Gu Q., Spencer M., Laura R., Lu L., Hurley J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995. V. 92. P. 5535–5539.
4. Shyjan A., Sauvage F., Gillett N., Goeddel D., Lowe D. // *Neuron*. 1992. V. 9. P. 727–737.
5. Aparicio J., Applebury M. // *Protein Expr. Purif.* 1995. V. 6. P. 501–511.
6. Шмуклер Б.Е., Зубов Д.В., Абдулаев Н.Г. // *Биоорганич. химия*. 1993. Т. 19. С. 682–685.
7. Thorpe D., Morkin E. // *J. Biol. Chem.* 1990. V. 265. P. 14717–14720.
8. Ефимов В.А., Фрадков А.Ф., Калинкина А.Л., Чахмахчева О.Г. // *Биоорганич. химия*. 1995. Т. 21. С. 9–16.
9. Studier F., Moffatt B. // *J. Mol. Biol.* 1986. V. 189. P. 113–130.
10. Hockney R. // *TIBTECH*. 1994. V. 12. P. 456–463.
11. Catty P., Deterre P. // *Eur. J. Biochem.* 1991. V. 199. P. 263–269.
12. Kutuzov M., Pfister C. // *Eur. J. Biochem.* 1994. V. 220. P. 963–971.
13. Wilson E., Chinkers M. // *Biochemistry*. 1995. V. 34. P. 4696–4701.
14. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. *Molecular Cloning*. N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
15. Bradford M. // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248–254.
16. Laemmli U.K. // *Nature*. 1970. V. 227. P. 680–685.

Functional Expression of a Fragment of Bovine Retina Guanylate Cyclase B cDNA in *Escherichia coli* Cells

O. V. Solovieva and N. G. Abdulaev

*Schemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP-7 Moscow, 117871 Russia*

Abstract—A 1488-bp fragment of bovine retina guanylate cyclase B gene encoding the catalytic and dimerizing domains as well as part of the protein kinase domain was expressed in *Escherichia coli* cells. The expression product was obtained as inclusion bodies and solubilized in 6 M guanidine hydrochloride. The fragment of guanylate cyclase B is a dimer close in catalytic activity to the native enzyme.

Key words: bovine retina, guanylate cyclase, expression in *E. coli*