



УДК 577.152.461*2.01

ДЕЛЕЦИОННЫЕ МУТАНТЫ НАТРИУРЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДНОГО РЕЦЕПТОРА ТИПА В: ЭКСПРЕССИЯ КДНК, ОЧИСТКА И ХАРАКТЕРИСТИКА БЕЛКОВ

© 2000 г. О. В. Соловьева[#], Д. Л. Какуев, Н. В. Гибанова, В. М. ЛипкинИнститут биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 01.12.99 г. Принята к печати 27.12.99 г.

Натриуретический пептид типа С (СНР) – пептидный гормон, стимулирующий понижение тонуса сосудов и ингибирующий пролиферацию клеток. СНР активирует натриуретический пептидный рецептор типа В (NPR-B), известный как мембранный фермент гуанилатциклаза В, с последующим высвобождением cGMP. С целью изучения функциональных свойств NPR-B фрагменты его гена были экспрессированы в метилотрофных дрожжах *Pichia pastoris*. Подобраны условия, обеспечивающие секрецию функционально активных рекомбинантных белков NPR-Bs и NPR-B1 в культуральную среду с выходом около 25 мг/л культуры. Их удельная активность составила 0.97 и 0.93 $\mu\text{моль cGMP мин}^{-1} \text{мг}^{-1}$ белка соответственно. Показано, что NPR-B относится к семейству Ser/Thr-протеинкиназ и обладает способностью к аутофосфорилированию по остаткам серина.

Ключевые слова: натриуретический пептидный рецептор; гетерологичная экспрессия; дрожжи; сетчатка глаза быка.

ВВЕДЕНИЕ

Семейство натриуретических пептидных гормонов включает три пептида: ANP – atrial natriuretic peptide, BNP – brain natriuretic peptide и CNP – C-type natriuretic peptide. ANP секретируется клетками сердечной мышцы – миоцитами в ответ на повышение артериального давления и противодействует увеличению эффективного объема крови, стимулируя натриурез и диурез [1, 2]. BNP впервые был выделен из мозга, но продуцируется главным образом в сердце. Он вызывает такие же физиологические ответы, как и ANP, но при определенных патологических условиях, например при закупорке сосудов сердца, он высвобождается в значительно более высоких концентрациях, чем в норме [2]. В 1990 г. был открыт третий пептид с натриуретическими свойствами – CNP. Этот пептид имеет высокую межвидовую консервативность [3] и также был впервые обнаружен в мозге [4], хотя в большем количестве присутствует в эндотелиальных клетках сосудов [5] и семенной жидкости [6]. Уровень транскрипции CNP регулируется различными цитокинами, в частности фактором β трансформации роста (TGF- β) [6].

Физиологические ответы, вызываемые натриуретическими пептидами схожи, но не идентичны. Например, все три пептида оказывают антигипертензивный эффект на гладкую мускулатуру сосудов. С другой стороны, ANP и BNP вызывают натриурез и диурез, тогда как роль CNP в этих процессах сомнительна. Более того, ANP и CNP ингибируют пролиферацию различных типов клеток [7], но только CNP – сильнодействующий ингибитор процесса утолщения внутренней оболочки сосуда после его повреждения [8].

Рецептор ANP и BNP – мембранный фермент гуанилатциклаза А, известный как натриуретический пептидный рецептор типа А (NPR-A) [9, 10]. Основным же рецептором CNP – это гуанилатциклаза В, или натриуретический пептидный рецептор типа В (NPR-B) [11, 12]. Показано, что NPR-A активируется ANP не только в нативных препаратах [13, 14], но и его экспрессированная форма *in vitro* также связывает пептид с последующим повышением уровня cGMP [9]. Однако на воздействие CNP в физиологических концентрациях NPR-A не отвечает. ANP и BNP не являются специфическими лигандами для NPR-B. При этом BNP более эффективно взаимодействует с этим ферментом, чем ANP, хотя оба эти лиганда проявляют свою активность лишь в концентрациях более 10^{-7} М [12]. CNP активирует NPR-B при более низких концентрациях, чем ANP и BNP, что и позволяет предположить, что именно CNP – истинный лиганд для этого типа ферментов [15]. Поскольку

Сокращения: PMSF – фенолметилсульфонилфторид; YNB – дрожжевое азотистое основание.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 330-63-47; факс: 310-70-10; e-mail: solov@ibch.siobc.ras.ru).

большинство эффектов натриуретических пептидов подобны действиям проникающих в клетку аналогов cGMP, можно сделать вывод, что NPR-A и NPR-B являются сигнальными рецепторами этих гормонов [1].

Анализ аминокислотной последовательности NPR-A и NPR-B показал для их внеклеточных и внутриклеточных участков степень подобия 43 и 78% соответственно [12].

NPR-B, как и другие гуанилатциклазы, состоит из пяти функциональных доменов: внеклеточный лигандсвязывающий домен; гидрофобный трансмембранный участок; внутриклеточный участок, включающий протеинкиназоподобный домен; фрагмент, вовлеченный в димеризацию; и С-концевой каталитический домен [16]. Механизм, с помощью которого активируется NPR-B до конца не изучен.

NPR-B как в присутствии, так и в отсутствие лиганда организован в высокоупорядоченную гомодимерную структуру, что необходимо для проявления его каталитической активности [17]. В процессе передачи сигнала связывание лиганда с внеклеточным доменом рецептора индуцирует конформационные изменения в его внутриклеточном домене, ведущие к активации каталитического домена.

Анализ структуры протеинкиназоподобного домена NPR-B показал, что этот участок содержит последовательность, состоящую из высококонсервативных и инвариантных аминокислотных остатков, сходную с АТР-связывающими доменами протеинкиназ. Поэтому можно предположить, что протеинкиназоподобный домен NPR-B является участком связывания АТР. Цель настоящей работы – получение функционально активных рекомбинантных белков – делеционных мутантов NPR-B по протеинкиназоподобному домену, и изучение их структурно-функциональных свойств.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для изучения роли протеинкиназоподобного домена было получено два делеционных мутанта NPR-B. Первый мутант включал каталитический, димеризующий и часть протеинкиназоподобного домена, и был назван нами NPR-Bs (small). Второй, в отличие от первого, включал полноразмерный протеинкиназоподобный домен и был назван NPR-B1 (large).

Для получения рекомбинантных белков и изучения их свойств была выбрана эукариотическая система экспрессии чужеродных генов – дрожжи *Pichia pastoris*. Эта система – уникальна для синтеза значительных количеств функционально активного рекомбинантного белка [18]. Она сочетает в себе преимущества экспрессии генов в *E. coli* (высокий уровень экспрессии, низкую стоимость

работ) с преимуществами экспрессии в эукариотической системе (фолдинг и посттрансляционная модификация белков).

P. pastoris – вид метилотрофных дрожжей. Метаболизм метанола происходит в пероксисомах, где его окисление кислородом до формальдегида катализируется алкогольоксидазой I (АОХI). Алкогольоксидаза I имеет очень низкое сродство к кислороду, но этот недостаток компенсируется синтезом больших количеств данного фермента. Высокий уровень синтеза обусловлен силой промотора гена *АОХI* этого белка. Поэтому промотор гена алкогольоксидазы I используют для обеспечения высокого уровня экспрессии чужеродных генов в *P. pastoris* [18].

Для экспрессии фрагментов гена *NPRB* в *P. pastoris* был выбран челночный вектор pHIL-S1, включающий фрагмент, кодирующий сигнальный пептид РНОI кислой фосфатазы *P. pastoris*, обеспечивающий секрецию продукта синтеза в культуральную среду.

В качестве гена, кодирующего первый из мутантных белков NPR-Bs, был использован *EcoRI* – *SmaI*-фрагмент *NPRB₁* (1493 п. о.), выделенный из ранее полученной конструкции рТН1(ΔGC-30) [19]. Второй фрагмент кДНК *NPRB₁* размером 1710 п. о. был реконструирован сложением двух фрагментов – ранее полученного *NPRB₁* и *NPRB₂₆*. Фрагмент кДНК *NPRB₂₆*, кодирующий недостающую часть последовательности протеинкиназоподобного домена, был получен ПЦР с использованием специфических праймеров $D1(5') \frac{AGAATTC-}{EcoRI}$ CGAAAАCTGATGCTGGAG и $R2(5') AACATCTCTCATATGTTTTCAGTTCAAA$.

В качестве матрицы для ПЦР была использована первая цепь кДНК, синтезированная на основе мРНК, выделенной из сетчатки глаза быка. Для клонирования в вектор pHIL-S1 фрагмент *NPRB₁* реамплифицировали с использованием праймеров *D1* и *R1* ((5')TGAATTCTTTATAGGAGCCCAGCAGGTCC), ограничивающих соответствующий участок гена *NPRB*. Продукт реакции обрабатывали фрагментом Кленова и Т4-полинуклеотидкиназой, гидролизировали эндонуклеазой рестрикции *EcoRI*, последовательность участка узнавания которой была включена в структуру праймера *D1*. Оба полученных фрагмента, *NPRB₁* и *NPRB₂₆*, лигировали с вектором pHIL-S1, предварительно обработанным эндонуклеазами рестрикции *EcoRI* и *SmaI*. Очистку линейаризованного вектора и вставок проводили элюцией из агарозного геля. Для трансформации использовали клетки *E. coli* МН-1.

Наличие вставки фрагментов гена *NPRB* в полученных рекомбинантных клонах определяли методом ПЦР с использованием праймера

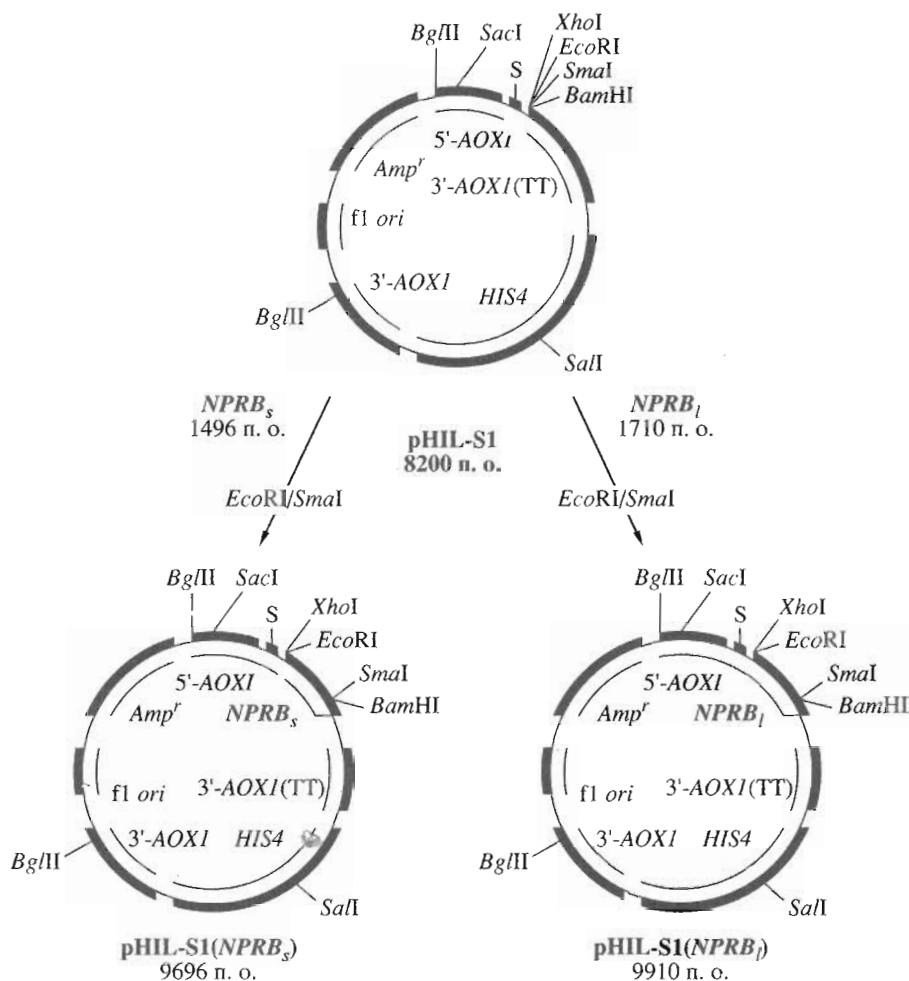


Рис. 1. Схема конструирования векторов для экспрессии делеционных мутантов NPR-B. Исходная плазмида pHIL-S1 и рекомбинантные плазмиды, содержащие фрагменты кДНК гена NPR-B ($NPRB_s$) и ($NPRB_l$). 5'-AOXI – промотор гена алкогольоксидазы I *P. pastoris*; S – фрагмент кДНК, кодирующий сигнальный пептид кислой фосфатазы PHO1 *P. pastoris*; 3'-AOXI(TT) – сигнал терминации транскрипции и полиаденилирования гена алкогольоксидазы I *P. pastoris*; HIS4 – ген, кодирующий гистидинолдегидрогеназу *P. pastoris*; 3'-AOXI – 3'-последовательность гена алкогольоксидазы I *P. pastoris*; f1 ori – участок начала репликации бактериофага f1; Amp^r – ген устойчивости к ампициллину.

5'-AOXI ((5')GACTGGTCCAAATTGACAAG), кодирующей 5'-концевую область гена AOX1 в векторе pHIL-S1, и специфического праймера R1, соответствующего 3'-концевой области клонируемых фрагментов гена NPRB. Для контроля за сохранением рамки считывания рекомбинантные клоны секвенировали по методу Сэнгера с использованием праймеров 5'-AOXI и 3'-AOXI (5')GCAAATGGCATTCTGACATCC.

В результате для дальнейшей работы были получены конструкции pHIL-S1($NPRB_s$) и pHIL-S1($NPRB_l$). Общая схема клонирования представлена на рис. 1.

Для экспрессии делеционных мутантов в *P. pastoris* использовали штамм клеток GS115(*his4*), несущий мутантный аллель гистидинолдегидрогеназы (*his4*), вследствие чего клетки не способны расти на среде, лишенной гистидина.

При трансформации в результате гомологичной рекомбинации происходит встраивание конструкций плазмидной ДНК на основе вектора pHIL-S1 в геномную ДНК *P. pastoris*. При этом мутантный аллель дрожжей замещается полноценным геном гистидинолдегидрогеназы HIS4, встроенным в 3'-концевую область гена AOX1 в векторе pHIL-S1 (рис. 1). Вследствие этого, трансформанты приобретают способность расти на селективной среде без гистидина.

Для достижения наиболее эффективной трансформации клеток полученные рекомбинантные плазмиды pHIL-S1($NPRB_s$), pHIL-S1($NPRB_l$) и вектор pHIL-S1 (в качестве отрицательного контроля) предварительно были линейаризованы эндонуклеазой рестрикции SacI, участок узнавания которой отсутствует в последовательностях клонированных фрагментов гена NPRB. Линейаризо-

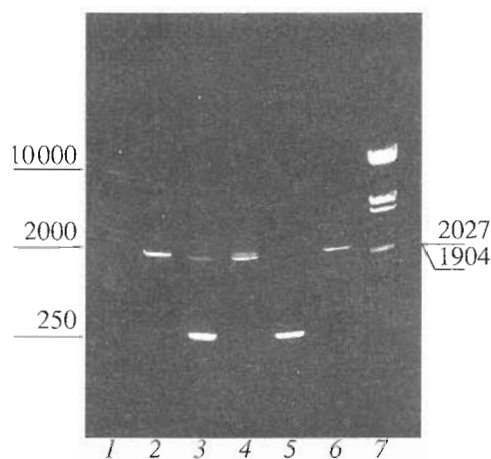


Рис. 2. Анализ в 0.7% агарозном геле продуктов ПЦР, полученных при амплификации с праймерами 5'- и 3'-*AOX1*: геномной ДНК клеток *P. pastoris* GS115(*his4*), 2200 п. о. (2); геномной ДНК рекомбинантного клона клеток *P. pastoris* GS115, трансформированных плазмидой рНIL-S1, 2200 п. о. и 262 п. о. (3); геномной ДНК рекомбинантного клона клеток *P. pastoris* GS115, трансформированных плазмидой рНIL-S1(*NPRB_s*), 2200 п. о. и 1967 п. о. (4); плазмидной ДНК рНIL-S1, 262 п. о. (5); плазмидной ДНК рНIL-S1(*NPRB_s*), 1967 п. о. (6); стандарты молекулярных масс (п. о.): продукты ПЦР известной массы (1), ДНК фага λ (*EcoRI/HindIII*) (7).

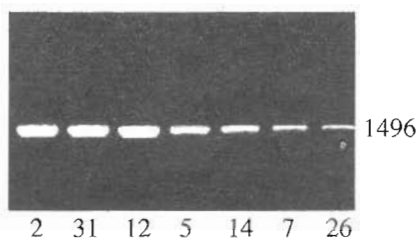


Рис. 3. Анализ продуктов ПЦР, полученных после 14 циклов амплификации с праймерами *D2* и *R1* геномной ДНК рекомбинантных клонов *P. pastoris* GS115, содержащей вставку *NPRB_s*. Числа соответствуют номерам клонов.

клеток отобранных трансформантов с *Mut⁺*-фенотипом выделяли геномную ДНК, которую анализировали с помощью ПЦР, используя праймеры 5'-*AOX1* и 3'-*AOX1*.

В качестве положительного контроля ПЦР использовали рекомбинантную плазмиду рНIL-S1(*NPRB_s*), при амплификации которой наблюдали образование фрагмента длиной 1967 п. о., а в качестве отрицательного контроля – исходную плазмиду рНIL-S1 без вставки (фрагмент 262 п. о.) и геномную ДНК клеток *P. pastoris* GS115(*his4*) (фрагмент 2200 п. о.). Продукты амплификации анализировали в агарозном геле (рис. 2). Для *Mut⁺*-интегрантов наблюдались два продукта ПЦР: один соответствовал фрагменту гена *NPRB_s* (1967 п. о.), встроенному в вектор, другой – гену *AOX1* (2200 п. о.). Аналогичный анализ проводили для *His⁺Mut⁺*-трансформантов, полученных в эксперименте с конструкцией, содержащей фрагмент *NPRB_t*.

В результате анализа было отобрано 36 клонов, содержащих вставку *NPRB_s* и 26 клонов, содержащих вставку *NPRB_t*, а также контрольные клоны, содержащие вектор без вставки, в которых прошла рекомбинация.

Известно, что высокий уровень экспрессии наблюдается в клонах, несущих в геноме *P. pastoris* мультикопийную вставку встраиваемого гена [20]. Геномную ДНК отобранных трансформантов *His⁺Mut⁺*-фенотипа анализировали с помощью ПЦР с использованием пары внутренних праймеров: *D2* ((5')AAGCATGTGAATAAGAAGCGC), *R1* для вставки *NPRB_s* и *D1*, *R1* для вставки *NPRB_t*. Концентрацию геномной ДНК *P. pastoris* анализируемых клонов, определяли флуорометрически. После 12 циклов амплификации наблюдалось появление продуктов ПЦР разной интенсивности в трех клонах, после 14 циклов еще в четырех клонах (рис. 3) и после 16 циклов во всех остальных клонах, отобранных для анализа. Для дальнейшей работы отобрали по 7 клонов для первого и второго мутанта, в которых амплификация фрагментов гена *NPRB* происходила за меньшее число циклов ПЦР, что соответствовало наибольшему числу копий встроенных фрагментов гена *NPRB* в геном *P. pastoris*.

Подтверждением процесса транскрипции может служить наличие мРНК, кодирующей рекомбинантный белок. Идентификацию специфической мРНК проводили путем обнаружения целевых генов *NPRB* в образцах кДНК, полученных на основе суммарной РНК дрожжей *P. pastoris*, несущих встроенную плазмиду рНIL-S1(*NPRB_s*) или рНIL-S1(*NPRB_t*). Для определения временных параметров экспрессии гена *NPRB* суммарная РНК была выделена через 24, 36 и 72 ч после индукции метанолом. В качестве отрицательного контроля использовали суммарную РНК клеток,

ванными ДНК трансформировали клетки методом электропорации. Предварительная линейаризация обеспечивала интеграцию фрагментов гена *NPRB* в 5'-область гена *AOX1* и преобладание трансформантов *His⁺Mut⁺*-фенотипа. Клетки инкубировали при 30°C до появления одиночных колоний на селективной среде RD.

Для подтверждения фенотипа (*Mut⁺*) единичные колонии *His⁺*-трансформантов пересеивали на чашки со средой, содержащей либо глюкозу, либо метанол. В результате постоянного визуального контроля были отобраны клоны, растущие одинаково эффективно на обеих средах.

Для подтверждения встраивания плазмидной ДНК конструкций рНIL-S1(*NPRB_s*) и рНIL-S1(*NPRB_t*) в геном *P. pastoris* GS115(*his4*) из

трансформированных плазмидой без вставки. Синтез первой цепи кДНК, являющейся матрицей для последующей ПЦР, проводили с использованием обратной транскриптазы вируса лейкоза мышей Молони (MMLV) и специфического праймера *R1*, соответствующего 3'-концевой области каждого из фрагментов гена *NPRB*. В результате последующей ПЦР с использованием специфических праймеров *D2*, *R1* для вставки *NPRB_s* и *D1*, *R1* для вставки *NPRB_l* были получены продукты реакции ожидаемой длины во всех препаратах, кроме отрицательного контроля. Было показано, что как через 24 ч, так и через 36 и 72 ч после индукции экспрессии генов метанолом, во всех исследуемых клонах наблюдается присутствие мРНК, соответствующей фрагментам гена *NPRB*.

Отобранные рекомбинантные клоны с His⁺Mut⁺-фенотипом использовали в ряде экспериментов по подбору оптимальных условий экспрессии фрагментов гена *NPRB*. При этом варьировали температуру культивирования, состав и pH среды, значение оптической плотности клеток до индукции экспрессии генов метанолом. Наилучшие результаты и максимальный выход продуктов были получены при использовании богатой среды BMMY, pH 6.5 и температуре культивирования 29.5°C. Для наработки рекомбинантного белка клетки выращивали в среде BMGY до оптического поглощения 3 OE₆₀₀. Далее культуральную среду меняли на метанолсодержащую BMMY, при этом объем среды уменьшали в четыре раза. Анализ суммарных белков клеток *P. pastoris* GS115, трансформированных контрольной плазмидой rHIL-S1, плазмидой rHIL-S1(*NPRB_s*) и плазмидой rHIL-S1(*NPRB_l*) в 12% SDS-ПААГ, показал, что во всех случаях после индукции метанолом наблюдается экспрессия гена *AOX1* (рис. 4). Образующиеся после индукции метанолом секретлируемые продукты экспрессии идентифицировали электрофоретическим разделением в 12% SDS-ПААГ, при этом было обнаружено, что максимальное накопление продукта наблюдалось через 48 ч после индукции метанолом, а через 72 ч происходила его деградация. Электрофоретический анализ показал, что белок NPR-Bs с *M* ~ 56 кДа и белок NPR-Bl с *M* ~ 67 кДа секретируются в культуральную среду, где содержание других белков незначительно (рис. 5, дорожки 3, 4).

Рекомбинантный белок NPR-Bs был обнаружен только в 2 клонах из 7 отобранных для экспрессии фрагмента гена *NPRB_s*, а рекомбинантный белок NPR-Bl в 1 клоне из 7 для фрагмента гена *NPRB_l*.

Для выделения рекомбинантных белков в одну стадию культуральную жидкость диализовали и наносили на колонку с GTP-агарозой. Фракции, содержащие белок, идентифицировали с помощью

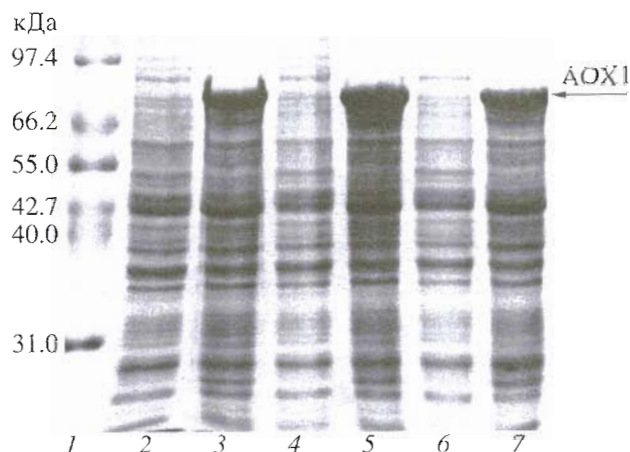


Рис. 4. Электрофореграмма в 12% SDS-ПААГ суммарных белков клеток *P. pastoris* GS115, трансформированных плазмидой rHIL-S1 (2, 3); плазмидой rHIL-S1(*NPRB_s*) (4, 5); плазмидой rHIL-S1(*NPRB_l*) (6, 7); до (2, 4, 6) и после (3, 5, 7) индукции экспрессии генов метанолом; стандарты молекулярных масс (1).

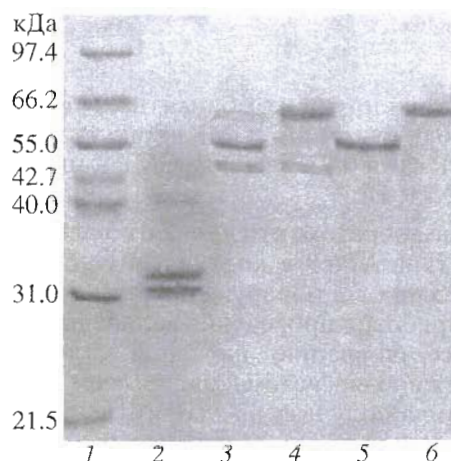


Рис. 5. Анализ продуктов экспрессии фрагментов кДНК NPR-B. Электрофорез в 12% SDS-ПААГ белков, секретлируемых клетками *P. pastoris* GS115, трансформированными плазмидой rHIL-S1 (2), плазмидой rHIL-S1(*NPRB_s*) (3), плазмидой rHIL-S1(*NPRB_l*) (4); фракции очищенных хроматографией препаратов белков NPR-Bs (5) и NPR-Bl (6) на GTP-агарозе; стандарты молекулярных масс (1).

SDS-ПААГ-электрофореза (рис. 5, дорожки 5, 6). Средний выход рекомбинантных продуктов составил около 25 мг из 1 л культуры.

Анализ N-концевой аминокислотной последовательности рекомбинантных белков показал, что она соответствует структурам, выведенным из кДНК соответствующих фрагментов гена *NPRB*.

Измерение ферментативной активности рекомбинантных белков в реакции превращения GTP в cGMP проводили методом, описанным в работе [19]. Максимальное значение специфичес-

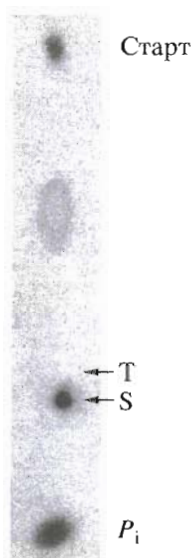


Рис. 6. Авторадиограмма пластинки ТСХ продуктов кислотного гидролиза NPR-B фосфорилированной $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. Стрелками показано положение стандартов фосфоаминокислот: S – фосфосерина, T – фосфотрезина.

кой активности рекомбинантных продуктов составило 0.97 мкмоль *cGMP* в минуту на 1 мг белка для NPR-Bs и 0.93 мкмоль *cGMP* в минуту на 1 мг белка NPR-BI.

Таким образом, в отличие от экспрессии фрагмента гена *NPRB* в клетках *E. coli*, где продукт экспрессии был обнаружен в виде телец включения и требовал проведения дальнейших операций по восстановлению нативной структуры [19], предложенная система экспрессии в *P. pastoris* позволила получить растворимые, функционально активные рекомбинантные белки, делеционные мутанты NPR-B в количествах, достаточных для использования их в функциональных тестах.

Натриуретический пептидный рецептор типа В, подобно другим представителям семейства мембранных гуанилатциклаз имеет цитоплазматический протеинкиназоподобный домен (~300 а. о.), который связан с циклазным каталитическим доменом. В свою очередь полипептидная цепь протеинкиназ условно разделена на субдомены I–XI, содержащие 33 высококонсервативных аминокислотных остатка [21]. Сравнение по аминокислотной последовательности протеинкиназоподобного домена NPR-B с рядом Ser/Thr- и Tyr-киназ показало, что в этом домене присутствует 21 из 33 высококонсервативных аминокислотных остатков, существенных для формирования правильной структуры и функционирования киназ [21], хотя истинного участка связывания ATP и переноса фосфата (GXGXXG) в последовательности нет. Компьютерный анализ показал, что сходная последовательность KGAGSRLTSLRGSSYSGLMT

содержится в N-концевой части протеинкиназоподобного домена NPR-B.

Для выявления участка связывания ATP была проверена способность обоих делеционных мутантов рецептора к аутофосфорилированию. С этой целью рекомбинантные белки NPR-Bs и NPR-BI, полученные при экспрессии фрагментов гена *NPRB* в *P. pastoris*, инкубировали с $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ и MgCl_2 и анализировали в 12% SDS-ПААГ. Полученные гели подвергали авторадиографии. Однако было обнаружено, что происходит включение ^{32}P как в рекомбинантный белок NPR-BI с $M \sim 67$ кДа, содержащий полноразмерный протеинкиназоподобный домен NPR-B, так и в рекомбинантный белок NPR-Bs с $M \sim 56$ кДа, включающий только C-концевую часть этого домена (субдомены VI–XI). Недавно идентифицирован участок фосфорилирования NPR-B в N-концевой части протеинкиназоподобного домена, в субдомене I (24 а. о.) [22]. Наши же данные свидетельствуют в пользу того, что участок фосфорилирования локализован не только в N-концевой, но и в C-концевой области протеинкиназоподобного домена (субдомены VI–XI, состоящие из 199 а. о.).

Известно, что фосфоэфирная связь в O-фосфопроизводных тирозина Tyr(P) устойчива как в кислых, так и в щелочных условиях, тогда как фосфоэфирная связь серина Ser(P) и треонина Thr(P) стабильна лишь в кислых условиях. Предварительно фосфорилированный и перенесенный на мембрану Hybond-N рекомбинантный белок NPR-BI инкубировали либо в кислом (pH 1), либо в щелочном (pH 14) буфере, после чего вновь подвергали радиоавтографии. Рекомбинантный белок оставался фосфорилированным только после обработки буфером с pH 1.

Для определения фосфорилированного аминокислотного остатка, мембрану Immobilon-P, содержащую ^{32}P -меченый белок NPR-BI, подвергали исчерпывающему гидролизу в 6 н. HCl. Гидролизат смешивали со стандартами фосфоаминокислот (фосфосерином и фосфотреонином), анализировали методом ТСХ и радиоавтографировали. Положение радиоактивной метки совпало с положением фосфосерина (рис. 6), следовательно NPR-B фосфорилируется по остаткам серина. Полученные результаты позволяют отнести NPR-B к семейству Ser/Thr-протеинкиназ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали N, N'-метиленабисакриламид, акриламид, персульфат аммония, N, N, N', N'-тетраметилэтилендиамин (TEMED), додецилсульфат натрия (SDS), дитиотреитол, агарозу (Bio-Rad, США); Трис, N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N'-2-этансульфоновую кислоту (HEPES), хлорид маг-

ния, ацетат натрия, хлорид кальция, уксусную кислоту, метанол, β -меркаптоэтанол (Merck, ФРГ); ампициллин, борную кислоту, бромистый этидий, мочевины, глицерин, БСА, PMSF, кумасси R-250, G-250, нуклеозиддифосфаты (NDP), нуклеозидтрифосфаты (NTP), *D*-сорбитол, *L*-аминокислоты, GTP-агарозу (Sigma, США); набор белков-маркеров для электрофореза (Promega, США); этилендиаминтетрауксусную кислоту (EDTA) (Serva, ФРГ); бромфеноловый синий, ксилолцианоловый голубой, Ponceau S (Koch Light, Англия); триптон, дрожжевой экстракт, бактоагар, дрожжевое азотистое основание (YNB), пептон (Difco, США); 2'-дезоксирибонуклеозиддифосфаты (Boehringer Mannheim, ФРГ); DEAE-целлюлозу DE-52, ватман 3 MM (Whatman, Англия); мембрану Hybond-NTM, [γ -³²P]ATP с удельной активностью 5000 Ки/ммоль (Amersham, Англия); мембрану BiodyneTM (Pall, США); Mono-Q HR5/5 (Pharmacia, Швеция).

Эндонуклеазы рестрикции, ДНК-лигазу фага T4, полинуклеотидкиназу фага T4 (Promega, США), РНКазу А, щелочную фосфатазу (*E. coli* A19) (Amersham, Англия), *Taq*-ДНК-полимеразу, *Klen-Taq*-PFU-ДНК-полимеразу, фрагмент Кленова (ДНК-полимераза) (Boehringer Mannheim, ФРГ); обратную транскриптазу вируса лейкоза мышей Молони (MMLV) (Amersham, Англия).

Реактивы отечественного производства, использовавшиеся для приготовления буферных растворов, имели квалификацию "ос. ч." или "х. ч."

В работе использовали: штамм *E. coli*: МН-1; штамм *P. pastoris*: GS115 (*his4*) (Invitrogen, США); плазмидные векторы: рТН1(AGC-30) [19]; рНIL-S1 (Invitrogen, США).

Тотальную РНК из сетчатки глаза быка выделяли по описанной ранее методике [23].

Клонирование фрагментов кДНК гена *NPRB* в экспрессирующий вектор рНIL-S1. Работу с рекомбинантными ДНК осуществляли стандартными методами [24]. Полученные фрагменты ДНК *NPRB₃* и *NPRB₁* клонировали в вектор рНIL-S1 по сайтам рестрикции *EcoRI* и *SmaI*. Вектор рНIL-S1 был предварительно линейаризован по этим же сайтам рестрикции. Структуры всех полученных экспрессирующих плазмид были подтверждены секвенированием по методу Сэнгера с использованием набора Sequenase T7, Version 3 (Pharmacia, Швеция).

Все генно-инженерные манипуляции, электрофорез ДНК и белков в ПААГ, выращивание рекомбинантных штаммов проводили по стандартным методикам [24].

Для выделения геномной ДНК и тотальной РНК *P. pastoris* использовали общепринятые методики [25].

Анализ рекомбинантных клонов *P. pastoris* методом ПЦР. Для выделения геномной ДНК дрож-

жей *P. pastoris* отобранные клоны с *Mut⁺*-фенотипом выращивали ночь в среде YPD (1% дрожжевой экстракт, 2% пептон, 2% глюкоза) при 30°C. Для проведения реакции амплификации использовали праймеры, кодирующие 5'- и 3'-концевые области гена *AOX1* в векторе рНIL-S1 5'-*AOX1* и 3'-*AOX1*. Для контроля ПЦР использовали 100 нг рекомбинантной плазмиды рНIL-S1(*NPRB₃*) ("+" – контроль), 100 нг исходной плазмиды рНIL-S1 без вставки ("–" – контроль) и 100 нг геномной ДНК дрожжей *P. pastoris* штамма GS115(*his4*). Для амплификации фрагментов кДНК проводили 28 циклов ПЦР при следующих параметрах температурного цикла: денатурация – 40 с при 94°C, отжиг с праймерами – 30 с при 57°C, амплификация – 2 мин при 72°C.

Экспрессия фрагментов кДНК *NPRB* в *P. pastoris* и очистка рекомбинантных белков. Для экспрессии генов делеционных мутантов *NPRB* в *P. pastoris* был выбран штамм клеток GS115(*his4*), несущий мутантный аллель гистидиндегидрогеназы (*his4*). Производные рНIL-S1 экспрессирующего вектора были линейаризованы по сайту рестрикции *SacI*. Полноту прохождения рестрикции проверяли электрофоретически в агарозном геле. Приготовление компетентных клеток и их трансформацию линейаризованной ДНК методом электропорации проводили согласно методикам работы [25]. Дрожжевые колонии *His⁺/Mut⁺*-фенотипа отбирали на селективной среде RD (1 М сорбитол, 1% глюкоза, 1.34% YNB, 4×10^{-5} % биотин, 0.003% *L*-аминокислоты), лишенной гистидина, а фенотип полученных клонов подтверждали ПЦР с использованием 5'-*AOX1*- и 3'-*AOX1*-праймеров.

Для наработки рекомбинантного белка дрожжевую единичную колонию выращивали до оптического поглощения 3 ОЕ₆₀₀ в течение 24 ч в среде BMGY (1% дрожжевой экстракт, 2% пептон, 1.34% YNB, 4×10^{-5} % биотин, 1% глюкоза, 100 мМ фосфат Na, pH 6.5) при интенсивной аэрации. Затем среду обменивали на содержащую метанол – BMMY (1% дрожжевой экстракт, 2% пептон, 1.34% YNB, 4×10^{-5} % биотин, 1% метанол, 100 мМ фосфат Na, pH 6.5). Экспрессию генов индуцировали каждые 24 ч. Клетки осаждали центрифугированием при 5000g. Супернатант, содержащий растворимый белок, диализовали 12 ч против буфера (50 мМ Трис-НСl, pH 7.5, 10 мМ EDTA, 0.2 мМ PMSF) и наносили на колонку с GTP-агарозой (Sigma, США). Работу с носителем осуществляли согласно рекомендациям изготовителя. Белок элюировали 300 мМ NaCl. Фракции, содержащие белок идентифицировали с помощью SDS-ПААГ-электрофореза по Лэммли [26].

Ферментативную активность определяли методом, описанным ранее [19].

Реакцию фосфорилирования проводили добавлением 2 мкг фермента в реакционную смесь, содержащую 10 мкКи [γ - ^{32}P]АТФ (5000 Ки/ммоль), 10 мМ Трис-НСl, рН 7.7, 1 мМ MgCl₂, 1 мМ РМСF в 25 мкл и инкубировали при комнатной температуре 40 мин. Реакцию останавливали добавлением трехкратного инкубационного буфера и проводили электрофорез белка в 12% SDS-ПААГ. Включение ^{32}P в белок контролировали радиоавтографией.

Обработка мембраны. Белок предварительно был фосфорилирован, разделен в 12% SDS-ПААГ и перенесен на мембрану Hybon-N (Amersham, Англия). После радиоавтографии мембрану, содержащую фосфорилированный белок, инкубировали в течение 2 ч при 45°C в 50 мМ KCl-НСl (рН 1) или в 1 М КОН (рН 14) и вновь радиоавтографировали.

Фосфоаминокислотный анализ. Очищенный рекомбинантный белок (2 мкг) был фосфорилирован инкубацией с 10 мкКи [γ - ^{32}P]АТФ (5000 Ки/ммоль) в присутствии 1 мМ MgCl₂ в киназной реакции (см. выше) и после разделения в 12% SDS-ПААГ перенесен на Immobilon-P (Millipore, США) в течение 1 ч (0.4 мА/см² мембраны) при полусухом переносе в буфере, содержащем 10% метанол, 48 мМ Трис, 39 мМ глицин, 0.0875% SDS. Для детекции включения ^{32}P в NPRB использовали радиоавтографию. Мембрану, содержащую меченый белок, подвергали исчерпывающему кислотному гидролизу в б.н. HCl в течение 1 ч при 110°C [27]. Гидролизат смешивали с фосфотреонином (15 : 1; 5 мкг каждого) и анализировали методом ТСХ (тип 100 целлюлоза) с использованием растворителя (абсолютный этанол-25% раствор аммония; 3.5 : 1.6) в 2 этапа [28]. Положение фосфоаминокислот детектировали с использованием нингидрина (0.25% раствор в 95% ацетоне) с добавлением ледяной уксусной кислоты. После одрыскивания сушили хроматограмму в темноте 24 ч при комнатной температуре, поскольку перегрев вызывает образование темного фона.

Авторы выражают благодарность сотрудникам ИБХ РАН Н.С. Быстрову за синтез олигонуклеотидных зондов и Ю.В. Корольковой за постоянную поддержку в работе. Данная работа выполнена при частичной финансовой помощи Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 99-04-48788).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Brenner B.M., Ballermann B.J., Gunning M.E., Zeidel M.L. // *Physiol. Rev.* 1990. V. 70. P. 665–699.
2. Ruskoaho H. // *Pharmacol. Rev.* 1992. V. 44. P. 479–602.

3. Arimura J.J., Minamino N., Kangawa K., Matsuo H. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991. V. 174. P. 142–148.
4. Sudoh T., Minamino N., Kangawa K., Matsuo H. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1990. V. 168. P. 863–870.
5. Suga S., Nakao K., Itoh H., Komatsu Y., Ogawa Y., Hama N., Imura H. // *J. Clin. Invest.* 1992. V. 90. P. 1145–1149.
6. Crisman T.D., Schultz S., Potter L.R., Garbers D.L. // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. P. 3698–3703.
7. Hagiwara H., Sakaguchi H., Itakura M., Yoshimoto T., Furuya M., Tanaka S., Hirose S. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. P. 10729–10733.
8. Ueno H., Haruno A., Morisaki N., Furuya M., Kangawa K., Takeshita A., Saito Y. // *Circulation.* 1997. V. 96. P. 2272–2279.
9. Chinkers M., Garbers D.L., Chang M.S., Lowe D.G., Chin H. // *Nature.* 1989. V. 338. P. 78–83.
10. Lowe D.G., Chang M.S., Hellmiss R., Chen E., Singh S., Garbers D.L., Goeddel D.V. // *EMBO J.* 1989. V. 8. P. 1377–1384.
11. Chang M.S., Lowe D.G., Lewis M., Hellmiss R., Chen E., Goeddel D.V. // *Nature.* 1989. V. 341. P. 68–72.
12. Schultz S., Singh S., Bellet R.A., Singh G., Tubb D.J., Garbers D.L. // *Cell.* 1989. V. 58. P. 1155–1162.
13. Kuno T., Andresen J.W., Kamisaki Y., Waldman S.A., Chang L.Y. // *J. Biol. Chem.* 1986. V. 261. P. 5817–5823.
14. Meloche S., McNicoll N., Lui B., Ong H., De Lean A. // *Biochemistry.* 1988. V. 27. P. 8151–8158.
15. Koller K.J., Lowe D.J., Bennett G.L., Minamino N., Kangawa K., Matsuo H., Goeddel D.V. // *Science.* 1991. V. 252. P. 120–123.
16. Wilson E., Chinkers M. // *Biochemistry.* 1995. V. 34. P. 4696–4701.
17. Chinkers M., Wilson E.M. // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. P. 18589–18597.
18. Cregg J.M., Tschopp J.F., Stillman C., Siegel R., Akong M., Craig W.S., Buckholtz R.G., Madden K.R., Kellaris P.A., Davis G.R., Smiley B.L., Cruze J. // *Bio/Technology.* 1987. V. 5. P. 479–485.
19. Соловьева О.В., Абдулаев Н.Г. // *Биоорганическая химия.* 1997. Т. 23. С. 630–634.
20. Romanos M.A., Scorer C.A., Clare J.J. // *Yeast.* 1992. V. 8. P. 423–488.
21. Hanks S.K., Quinn A.M., Hunter T. // *Science.* 1988. V. 241. P. 42–52.
22. Potter L.R., Hunter T. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 15533–15539.
23. Chirgwin J.M., Przybyla A.E., MacDonald R.J., Rutter W.J. // *Biochemistry.* 1979. V. 18. P. 5294–5299.
24. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* 2Ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989.
25. Guthrie C., Fink G.R. // *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology.* San Diego, California: Academic Press, Inc., 1991. V. 194. P. 182–187.
26. Laemmli U.K. // *Nature.* 1970. V. 227. P. 680–685.

27. Kamps M.P., Sefton B.M. // *Anal. Biochem.* 1989. V. 176. P. 22–27.
28. Boyle W.J., van der Greer P., Hunter T. // *Methods Enzymol.* 1991. V. 201. P. 110–149.

Deletion Mutants of the B Type Natriuretic Peptide Receptor: cDNA Expression and Protein Purification and Characterization

O. V. Solov'eva[#], D. L. Kakuev, N. V. Gibanova, and V. M. Lipkin

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

The C type natriuretic peptide (CNP) is a peptide hormone stimulating vasorelaxation and inhibiting cell proliferation. CNP activates the type B natriuretic peptide receptor (NPR-B), known as the guanylate cyclase B membrane enzyme, which results in the cGMP release. To study functional properties of NPR-B, its gene fragments were expressed in methylotrophic yeasts *Pichia pastoris*. Conditions were found providing for secretion of functionally active recombinant proteins NPR-Bs and NPR-BI into the cultural medium in a yield of 25 mg/ml culture. Their specific activity was 0.97 and 0.93 $\mu\text{mol cGMP min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ protein, respectively. It was shown that NPR-B belongs to the family of Ser/Thr protein kinases and can be autophosphorylated at the serine residues.

Key words: bovine retina, heterologous expression, natriuretic peptide receptor, yeasts

[#] To whom correspondence should be addressed; fax: +7 (095) 310-7010; phone: +7 (095) 330-6347;
e-mail: solov@ibch.siobc.ras.ru.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2000, vol. 26, no. 6. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.