

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2002

УДК 612.73.014.1:577.112].08

О. В. Букач, А. С. Сеит Неби, О. О. Панасенко, М. В. Ким, Н. Б. Гусев

ВЫДЕЛЕНИЕ ТКАНЕВОГО И РЕКОМБИНАНТНОГО МАЛОГО БЕЛКА ТЕПЛОВОГО ШОКА С МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССОЙ 25 КД (HSP25) ИЗ ГЛАДКИХ МЫШЦ ПТИЦ*

Кафедра биохимии биологического факультета, кафедра биохимии факультета фундаментальной медицины МГУ им. М. В. Ломоносова, Институт молекулярной биологии РАН

С помощью иммунологических методов определено содержание малого белка теплового шока с мол. массой 25 кД (hsp25) в различных тканях птиц. Установлено, что мышечные ткани (мускульный желудок, скелетная мышца и сердце) содержат 500–600 мкг hsp25 на 1 г сырой ткани. Разработан модифицированный метод выделения hsp25 из мускульного желудка птиц. Установлено, что значительная часть hsp25 прочно связана с сократительным аппаратом, цитоскелетом и, по-видимому, с мембранами гладких мышц, что затрудняет полную экстракцию и существенно уменьшает выход hsp25. Предложен модифицированный метод выделения рекомбинантного hsp25 гладких мышц кур из *E. coli*. Получены мутантные формы рекомбинантного hsp25, в которых потенциально фосфорилируемые остатки серина (Ser15, Ser77 и Ser81) заменены на остатки аспарагиновой кислоты. Установлено, что точечные мутации S15D, S77,81D и S15,77,81D влияют на поведение hsp25 при ионообменной хроматографии и гель-фильтрации. Исследована шаперонная активность hsp25 и установлено, что рекомбинантный белок дикого типа предотвращает агрегацию α -лактоальбумина, индуцированную восстановлением его дисульфидных связей.

O. V. Bukach, A. S. Seit Nebi, O. O. Panasenko, M. V. Kim, N. V. Gusev. — ISOLATION OF TISSUE AND RECOMBINANT SMALL HEAT SHOCK PROTEIN WITH A MOLECULAR WEIGHT OF 25 KDA (HSP25) FROM AVIAN SMOOTH MUSCLES

Immunoassays were used to measure the content of small heat shock protein with a molecular weight of 25 kDa (hsp25) in different avian tissues. Muscle tissues, such as gizzard, skeletal muscle, and heart, were found to contain 500–600 μ g of hsp25 per 1 g of wet weight. A modified procedure for isolation of hsp25 from gizzard was developed. It was been ascertained that a large portion of hsp25 was bound to the contractile apparatus, cytoskeleton, and probably membranes. Three prevents complete extraction of tissue hsp25 and significantly reduced its yield. The modified procedure for expressing and isolation of recombinant hsp25 from *E. coli* is described. These mutants of hsp25 with replacement of potentially phosphorylatable Ser residues (Ser15, Ser77 and Ser81) by Asp were expressed and purified. The point mutations S15D, S77,81D, and S15,77,81D affected the chromatographic properties of hsp25 during ion-exchange chromatography and gel filtration. The chaperone activity of hsp25 was analyzed. Recombinant hsp25 prevents aggregation of α -lactalbumin induced by a reduction in its disulfide bonds.



Н. Б. Гусев, О. О. Панасенко, М. В. Ким, О. В. Букач, А. С. Сеит Неби

В декабре 2001 г. исполняется 100 лет со дня рождения Сергея Евгеньевича Северина, выдающегося отечественного биохимика, создателя и органи-

затора кафедры биохимии биологического факультета Московского государственного университета. В своих исследованиях С. Е. Северин уделял большое внимание изучению регуляции биохимических процессов, протекающих в живой клетке. В настоящее время внимание биохимиков привлечено к проблеме правильного сворачивания полипептидных цепей в ходе их синтеза, а также к вопросам повышения выживаемости клеток после

*Авторы благодарны профессору Akira Nakai (Department of Molecular and Cell Biology, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Japan) за предоставление кДНК hsp25 гладких мышц кур. Данное исследование было поддержано Российским фондом фундаментальных исследований, совместным грантом РФФИ-ИНТАС, а также Wellcome Trust.

различных повреждающих воздействий. В обоих этих процессах важная роль принадлежит белкам теплового шока, и в частности так называемым малым белкам теплового шока (small heat shock proteins, shsp). В этой экспериментальной работе, посвященной памяти создателя кафедры биохимии биологического факультета МГУ Сергея Евгеньевича Северина, мы сопоставляем различные способы получения малого белка теплового шока с мол. массой 25 кД из гладких мышц птиц. Это исследование является необходимым предварительным этапом в изучении возможной роли малых белков теплового шока в регуляции сократительной активности мышц.

В семейство малых белков теплового шока объединена довольно разнородная группа белков с мол. массами от 12 до 43 кД [10]. Все белки этого семейства содержат в С-концевой области своей первичной структуры так называемый кристаллиновый домен, состоящий приблизительно из 100 аминокислотных остатков. Этот домен принимает участие как в олигомеризации shsp, так и, по всей видимости, в шаперонной активности этих белков. Различают 4 основных класса малых белков теплового шока: α A и α B-кристаллины, малые белки теплового шока с мол. массами 25–27 кД (hsp25/hsp27), малые белки теплового шока с мол. массой около 20 кД (hsp20) и так называемые белки-активаторы протеинкиназы, характерной для скелетных мышц с миотонической дистрофией (MKBP, myosin dystrophy kinase binding protein) [1, 18].

Малые белки теплового шока с мол. массами 20 и 25–27 кД в больших количествах конститутивно синтезируются в различных мышцах позвоночных [5, 11]. Исследования последних лет свидетельствуют о том, что hsp25 может взаимодействовать с актином [2, 11, 19] и другими сократительными белками, а также с различными элементами цитоскелета, участвовать в регуляции сократительной активности гладких мышц и клеток, обладающих немышечной подвижностью [4, 15]. Для изучения молекулярных механизмов функционирования hsp25 необходимо иметь гомогенные препараты этого белка. В литературе есть весьма ограниченное количество публикаций, касающихся выделения hsp25 из животных тканей [5, 11] и культивируемых клеток [2]. Исследователи предпочитают работать либо на рекомбинантных белках [3], либо на очищенных экстрактах ткани [7]. В то же время в ряде публикаций отмечалось довольно существенное различие свойств тканевого и рекомбинантного hsp25 [2]. Целью данной работы была разработка модифицированных методов получения тканевого и рекомбинантного hsp25 из гладких мышц птиц для возможности дальнейшего сравнения их свойств и изучения взаимодействия с сократительными и регуляторными белками.

Материалы и методы

Определение содержания hsp25 в тканях утки. В основу процедуры, использованной для количественного определения hsp25 в тканях, была положена методика, предложенная Ларсеном и соавт. [8]. Ткани утки (по 2 г) сразу после забоя гомогенизи-

ровали в блендере Уорринга в 10-кратном объеме ацетона, содержащего 5% ТХУ и находящегося при температуре -70°C . Гомогенат переносили в пробирки объемом 20 мл и через 30 мин жидкость над осадком декантировали. Полученный осадок заливали 10-кратным объемом ацетона и вновь гомогенизировали. Полученный остаток ткани промывали еще 2 раза раствором ацетона и сушили на лиофильной сушке. Обычно из 2 г ткани получали 300–400 мг сухого порошка. Полученный порошок заливали 16-кратным объемом буфера экстракции, содержащего 60 мМ трис-НСl pH 6,8, 2% Ds-Na, 10 мМ ЭГТА, 1 мМ ЭДТА, 5 мМ NaF, 5% меркаптоэтанол, гомогенизировали в блендере Уорринга, нагревали при 100°C в течение 5 мин и центрифугировали. Супернатант собирали, а осадок повторно экстрагировали в описанных выше условиях. Полученный после центрифугирования супернатант объединяли с супернатантом, полученным после первой экстракции. Концентрацию белка в полученных пробах определяли по методу Шаффнера и Вайсмана [16], используя БСА в качестве стандарта. Проводили электрофорез аликвотных частей супернатанта в 12,5% ПААГ в присутствии Ds-Na по методу Лэммли [6]. На тот же гель наносили различные количества стандартного раствора рекомбинантного hsp25 (в интервале от 10 до 120 нг). После электрофореза переносили белки на нитроцеллюлозу и проводили иммунную детекцию hsp25. Для этого использовали первичные моноклональные антитела к hsp25, узнающие белки теплового шока из тканей кур, уток и человека (антитела были получены и любезно предоставлены А. Г. Катрухой, Московский научно-исследовательский институт медицинской экологии) и вторичные антимышинные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена. В качестве субстрата пероксидазы использовался диаминобензидин. Количественный обсчет электрофореграмм проводили с помощью компьютерной программы One-D Scan.

Выделение hsp25 из мускульного желудка кур. В основу процедуры выделения тканевого hsp25 был положен метод, предложенный Мирон и соавт. [11, 12]. Замороженные или свежие мускульные желудки кур гомогенизировали в блендере Уорринга 3 раза по 10 с при максимальной скорости в 10-кратном объеме охлажденной воды, содержащей 0,5 мМ фенилметилсульфонилфторида (ФМСФ). Гомогенат центрифугировали 10 мин при 8000 г. Супернатант отбрасывали, а осадок повторно гомогенизировали в блендере Уорринга 10 с на малой скорости в 10-кратном объеме охлажденной воды, содержащей 0,5 мМ ФМСФ. Гомогенат повторно центрифугировали и осадок мышечной ткани суперцентрифугировали в 10-кратном объеме буфера А (2 мМ трис-ацетат, 1 мМ ЭГТА, 0,5 мМ ФМСФ pH 9,0) и инкубировали в течение 30 мин при 37°C , аккуратно перемешивая. Супернатант, полученный после центрифугирования, титровали уксусной кислотой до pH 7,2 и добавляли 1 М MgCl_2 до конечной концентрации 10 мМ. После инкубации при комнатной температуре в течение 15 мин осадок, содержащий в основном актин и десмин, удаляли центрифугированием (10 мин, 8000 г).

Супернатант фракционировали сухим сульфа-

том аммония. Небольшой осадок, образовавшийся в интервале 0—25% насыщения, отбрасывали, а к супернатанту добавляли сухой сульфат аммония до конечной концентрации 35%. Полученный осадок растворяли в буфере Б (20 мМ трис-ацетат pH 7,6, 0,1 мМ ЭДТА, 10 мМ NaCl, 15 мМ меркаптоэтанол, 0,1 мМ ФМСФ) и диализовали в течение ночи против 4 л этого буфера. Полученный на этой стадии выделения грубый препарат hsp25 подвергали дальнейшей очистке с помощью ионообменной хроматографии и гель-фильтрации (см. раздел "Результаты и обсуждение").

Выделение рекомбинантного hsp25 и его точечных мутантных форм. Для экспрессии в клетках *E. coli*, полноразмерная копия кДНК chsp25 была встроена в вектор pET11c(+) ("Novagen") под контроль промотора РНК-полимеразы фага Т7. Для этого с помощью Pwo ДНК-полимеразы ("Boehringer Mannheim") был амплифицирован соответствующий участок плазмиды pGC25-7 (любезно предоставленной проф. А. Nakai, Department of Molecular and Cell Biology, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Japan) с использованием следующих праймеров: chsp25Nde, комплементарного 5'-концу гена: 5'-GAGATATACATATGGCCGAGCGC-3', NdeI сайт подчеркнут; chsp25Bam комплементарного 3'-концу: 5'-CCGGATCCCTACTTCTTGGCTGG-3', BamHI сайт подчеркнут. Затем ПЦР-продукт был последовательно обработан рестриктазами NdeI и BamHI и лигирован с pET11c(+) предварительно обработанным теми же рестриктазами. Полученная конструкция — pECSP25 — была проверена секвенированием и затем использована для препаративной экспрессии в клетках *E. coli* и проведения мутагенеза.

Экспрессию chsp25 проводили в штамме *E. coli* BL21(DE3) ("Novagen"). Клетки выращивали при 37°C с интенсивной аэрацией на среде LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина, до оптической плотности при 600 нм, равной 0,5. Затем к суспензии клеток добавляли изопропил-β-тиогалактозид (IPTG) до конечной концентрации 1,0 мМ и продолжали культивирование в течение 4,5 ч при комнатной температуре. Клетки собирали центрифугированием и замораживали.

Для моделирования процесса фосфорилирования остатки серина в положениях 15, 77 и 81 CHSP25 были заменены на остатки аспарагиновой кислоты. Получение замен аминокислот S15D, S77D + S81D и S15D + S77D + S81D проводили методом "мегапраймера" [14] с помощью ПЦР. Для этого были синтезированы следующие праймеры: S15D 5'-ACCAGCCCCGACTGGGAGCCCC-3' и S77-81D 5'-GCCGCTGTCCAGCTGCCGGTC-CAGCGC-3'.

Для получения замены S15D на первом этапе с помощью Pwo ДНК-полимеразы амплифицировали фрагмент гена chsp25 с использованием вышеуказанного мутагенного праймера и праймера комплементарного 3'-концу гена chsp25Bam. Полученный таким образом двухцепочечный 550 п. о. фрагмент, содержащий нужную замену нуклеотидов, очищали в легкоплавкой агарозе NuSieve GTG (FMC Bioproducts) и затем использовали в следующем раунде ПЦР в качестве праймера, комплементарного 3'-концу гена; праймером, комплементарным 5'-концу гена, в этом случае был chsp25Nde.

После проведения ПЦР полученную копию гена chsp25 очищали в легкоплавкой агарозе, последовательно обрабатывали рестриктазами NdeI и BamHI и лигировали с вектором pET11c(+) ("Novagen"), обработанным теми же рестриктазами. В качестве матричной ДНК в ПЦР использовали плазмиду pECSP25.

Получение замен S77D + S81D проводили сходным образом, с той лишь разницей, что на первой стадии проводили ПЦР с использованием соответствующего мутагенного праймера и праймера, комплементарного 5'-концу гена, chsp25Nde. Полученный таким образом 250 п. о. двухцепочечный фрагмент затем использовали в следующем раунде ПЦР в качестве праймера, комплементарного 5'-концу гена, праймером, комплементарным 3'-концу гена, в этом случае был chsp25Bam. Замены аминокислот S15D + S77D + S81D были получены так же, как и S77D + S81D, но с использованием в качестве матричной ДНК в ПЦР pECSP25-S15D.

Наличие требуемой мутации в каждом случае подтверждали секвенированием.

В основу процедуры выделения рекомбинантного белка была положена процедура, предложенная Бюхнером и соавт. [3] для выделения рекомбинантных белков теплового шока млекопитающих. Замороженный осадок клеток, полученный из 1 л культуры клеток *E. coli*, суспендировали в 14 мл лизирующего буфера (50 мМ трис-HCl pH 8,0, 0,1 М NaCl, 1 мМ ЭДТА, 15 мМ меркаптоэтанол, 0,5 мМ ФМСФ). К полученной суспензии добавляли раствор лизоцима до конечной концентрации 0,9 мг/мл и инкубировали 15 мин на холоду. К суспензии добавляли свежую порцию лизоцима до суммарной конечной концентрации 1,25 мг/мл и инкубировали 15 мин на холоду. К полученной вязкой суспензии добавляли 2,5 М раствор MgCl₂ до конечной концентрации 2 мМ, ДНКазу I до конечной концентрации 0,02 мг/мл и инкубировали при комнатной температуре 10 мин при периодическом перемешивании. После окончания инкубации препарат подвергали ультразвуковой обработке в течение 1 мин при максимальной частоте и мощности (ультразвуковой дезинтегратор USD-A, "Vintrop Inc"). Далее лизат инкубировали 30 мин при комнатной температуре, после чего к нему добавляли 11 мл лизирующего буфера и центрифугировали 20 мин при 17 000 g. Супернатант собирали, а осадок, полученный после центрифугирования, суспендировали в 25 мл того же буфера и подвергали озвучиванию в течение 1 мин при максимальной частоте и мощности, после чего центрифугировали 20 мин при 17 000 g. Осадок отбрасывали, а супернатант объединяли с супернатантом, полученным после первого центрифугирования.

Объединенный супернатант фракционировали сульфатом аммония в интервале 0—50% насыщения. Сульфатно-аммонийный осадок растворяли и диализовали против буфера Б. Для дальнейшей очистки рекомбинантного hsp25 и его мутантных форм использовали методы ионообменной хроматографии и гель-фильтрации (см. раздел "Результаты и обсуждение").

Определение шаперонной активности hsp25. О шаперонной активности hsp25 судили по его способности предотвращать агрегацию α -лактальбумина, вызванную восстановлением дисульфидных связей этого белка под действием избытка дитиотреитола [9].

α -Лактальбумин из молока крупного рогатого скота выделяли по модифицированной методике Шмидта и Эбнера [17]. В контрольной пробе 200 мкл раствора лактальбумина (1 мг/мл) в буфере В (100 мМ фосфат, 0,2 М NaCl, 2 мМ ЭДТА pH 7,0) смешивали с 200 мкл буфера Г (20 мМ трис-ацетат pH 7,6, 10 мМ NaCl, 15 мМ меркаптоэтанол, 10% глицерин). В опытной пробе 200 мкл раствора лактальбумина смешивали с 200 мкл раствора hsp25 (1,3 мг/мл), приготовленного на буфере Г. К обеим пробам добавляли 200 мМ раствор дитиотреитола до конечной концентрации 20 мМ. Образцы инкубировали при 37°C, и через каждые 20 мин отбирали аликвотные части по 40 мкл, которые центрифугировали 10 мин при 14000 g. Количество α -лактальбумина в супернатантах и осадках определяли методом количественного Ds-Na-ПААГ-электрофореза [6], строили зависимость содержания лактальбумина в супернатанте и в осадке от времени инкубации.

Результаты и их обсуждение

Определение содержания hsp25 в различных тканях птиц. Прежде чем приступить к выделению hsp25 из тканей животных следовало определить, в каких тканях содержание этого белка максимальное. С помощью иммунологических методов выявлено, что мышечные ткани уток — мускульный желудок, сердце и скелетная мышца содержат соответственно 675, 586 и 490 мкг hsp25 на 1 г сырой ткани. Высокое содержание hsp25 было выявлено и в мускульном желудке кур (более 250 мкг на 1 г сырой ткани). Другие исследованные ткани птиц (трахея, печень, легкие) содержат заметно меньшие количества hsp25. При этом количество hsp25 колеблется от 7 мкг на 1 г сырой ткани в легких до 150 мкг на 1 г сырой ткани в трахее. Полученные результаты хорошо согласуются с данными литературы. Так, в работе Като и соавт. [5] установлено, что максимальное содержание hsp25 в тканях человека характерно для скелетных мышц, сердца и аорты, а минимальное — для печени, селезенки и жировой ткани. По данным литературы [5, 11], на долю hsp25 в мышечных тканях приходится около 0,2% экстрагируемых белков. Если учесть, что белки составляют 20–30% веса сырой ткани мышц, то можно ожидать, что содержание hsp25 составляет 400–600 мкг на 1 г сырой ткани. То же показано и в наших исследованиях. Таким образом, мышцы птиц богаты hsp25 и могут использоваться для получения препаративных количеств этого белка.

Выделение тканевого hsp25 из гладких мышц кур. В литературе нам удалось найти только 2 подробно описанные процедуры выделения hsp25 из тканей животных. Процедура, предложенная Като и соавт. [5], довольно длинна и трудоемка, поэтому мы воспользовались более простой методикой, предложенной Мирон и соавт. [11, 12]. Суть этого метода

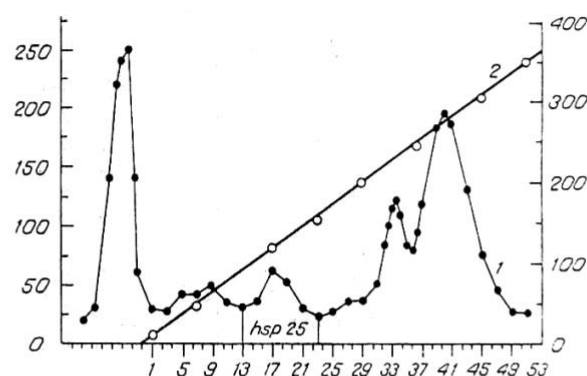


Рис. 1. Профиль элюции грубого препарата hsp25, полученного из 100 г ткани мускульных желудков кур при анионообменной хроматографии.

Грубый препарат белка наносили на колонку (2,4 × 16 см) с Q-сефарозой, уравниваемой буфером В. После удаления несвязавшихся белков элюцию hsp25 проводили линейным градиентом NaCl (10–390 мМ) общим объемом 600 мкл и собирали фракции объемом 10 мкл. 1 — оптическая плотность при 280 нм (мА); 2 — концентрация NaCl, мМ. Белковый состав фракций анализировали с помощью Ds-Na-ПААГ электрофореза. Вертикальными линиями отмечены фракции, содержащие hsp25. По оси абсцисс — номер фракций; по оси ординат: слева — оптическая плотность при 280 нм, мА; справа, концентрация NaCl, мМ.

состоит в том, что мышечную ткань отмывают от растворимых белков, а остаток ткани экстрагируют растворами с низкой ионной силой при щелочных значениях pH. В этих условиях происходит частичная деполимеризация промежуточных филаментов и актина и экстрагируется часть актинсвязывающих белков, таких как винкулин, филамин и α -актинин (см. раздел "Материалы и методы"). Добавление $MgCl_2$ приводит к осаждению большей части актина и десмина, а остающиеся в супернатанте актинсвязывающие белки и hsp25 высаливают сульфатом аммония. Грубый препарат hsp25 подвергают анионообменной хроматографии.

Теоретически рассчитанная изоэлектрическая точка hsp25 из гладких мышц кур составляет 6,51. В этой связи hsp25 довольно слабо сорбируется на анионообменниках. Для того чтобы добиться более полной сорбции белка на носителе, мы использовали сильный анионообменник Q-сефарозу и проводили ионообменную хроматографию с использованием большого избытка сорбента (рис. 1). Анализ белкового состава проб, полученных в ходе ионообменной хроматографии, показал, что в выбранных условиях весь наносимый hsp25 сорбируется на колонке. На профиле элюции удается выделить 3 не полностью разделенных белковых пика. В первом пике элюируются винкулин и hsp25, во втором — преимущественно филамин, и, наконец, в третьем, наибольшем по размеру пике, — α -актинин. Соотношение пиков филамина и α -актинина варьирует от выделения к выделению, однако неизменным остается очень небольшой размер первого пика, в котором элюируются в основном винкулин и hsp25.

Дальнейшую очистку hsp25 проводили методом гель-фильтрации среднего давления (хроматограф Acta-FPLC, "Amersham-Pharmacia") на колонке (1,6 × 60 см) с сефакрилом S300. Первую гель-фильтрацию проводили в буфере В, содержащем 0,6 М KCl (рис. 2, а). На этой стадии удается отде-

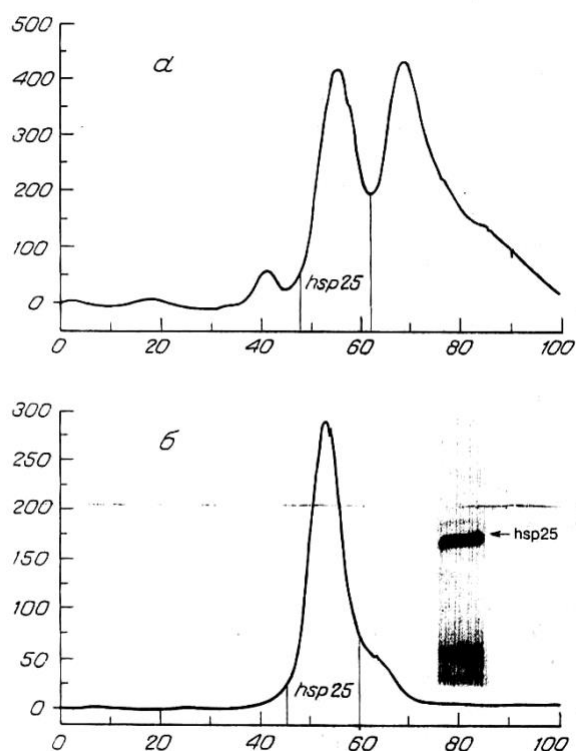


Рис. 2. Очистка препарата тканевого hsp25 на колонке с сефадрозом S300 (Sephacryl S300, High prep 16/60).

а — профиль элюции при первой гели-фильтрации, проведенной в буфере Б, содержащем 0,6 М КСl; б — профиль элюции при второй гели-фильтрации, проведенной в буфере Б. Вертикальными линиями на обоих профилях обозначены фракции, содержащие hsp25. На врезке — электрофореграмма конечного препарата hsp25, полученного после 2-кратной гели-фильтрации. Стрелкой обозначено положение hsp25. По оси абсцисс — объем элюции, мл; по оси ординат — оптическая плотность при 280 нм, мА/м.

лить hsp25, элюируемый в первом большом пике, от винкулина, элюируемого во втором большом пике. Рехроматография hsp25 на той же колонке в буфере Б позволяет получить высоко очищенные препараты малого белка теплового шока (рис. 2, б). Незначительная примесь в виде диффузной полосы белков с молекулярными массами в интервале 50–60 кД при Ds-Na-ПААГ-электрофорезе, по всей видимости, представляет собой десмин и продукты его протеолитической деградации.

Наши попытки увеличить чистоту препарата с помощью хроматографии на гидроксипатите, как это было описано у Мирон и соавт. [11], не были успешны. Хроматография на гидроксипатите, описанная в оригинальной методике, не приводит к сколько-нибудь заметному увеличению чистоты препарата hsp25. Как бы то ни было, изложенный метод позволяет получить 1–1,5 мг hsp25 с чистотой более 90% из 100 г мускульных желудков кур. В оригинальной методике Мирон и соавт. [11, 12] не приводится выход hsp25, однако в работе Като и соавт. [5], выполненной на скелетных мышцах человека, выход hsp25 составил 2,6 мг белка из 100 г ткани, что сопоставимо с таковым, полученным в нашей работе. Если учесть, что общее содержание hsp25 в мышечной ткани, по данным литературы и нашим экспериментальным данным, составляет около 40–60 мг на 100 г сырого веса, то

полученный нами выход составляет менее 5% ожидаемого. Мы предприняли попытки модифицировать процедуру, предложенную Мирон и соавт. [11, 12], с целью повышения выхода hsp25.

На заключительных хроматографических стадиях выделения не происходило существенных потерь hsp25, поэтому наши модификации были направлены на совершенствование начальных стадий выделения. Было установлено, что начальные стадии отмывания мышечной ткани водой не сопровождаются экстракцией и потерей hsp25. Выход hsp25 можно повысить в 1,3–1,5 раза, если проводить 2-кратную (а не однократную, как в оригинальной методике) экстракцию мышечной ткани щелочным раствором с низкой ионной силой (2 мМ трис-ацетат, 1 мМ ЭГТА, 0,5 мМ ФМСФ pH 9,0). Однако вне зависимости от условий экстракции наибольшие потери hsp25 происходят при осаждении белков 10 мМ MgCl₂. Как уже отмечалось, при добавлении MgCl₂ образуется большой осадок, состоящий преимущественно из актина и десмина. Выпадающие в осадок белки захватывают значительную часть hsp25. Попытка проэкстрагировать hsp25 из осадка актина и десмина растворами с высокой ионной силой (20 мМ трис-ацетат pH 7,6, 0,6 М КСl, 2 мМ MgCl₂, 15 мМ меркаптоэтанол) не была удачной. Вероятно, выпадающие в осадок в присутствии MgCl₂ белки находятся в частично денатурированном состоянии и вследствие этого прочно связывают hsp25. Образующийся прочный комплекс не поддается диссоциации в использованных нами условиях. Также не удалось избежать стадии осаждения белков MgCl₂. Если стадия осаждения MgCl₂ опускалась, то фракционирование сульфатом аммония приводило к выпадению большого количества десмина и актина в осадок, который плохо растворялся в буфере диализа. Супернатант, полученный после центрифугирования диализата, содержал минимальные количества hsp25. По всей видимости, щелочные экстракты содержат огромные количества актина и десмина, и единственным доступным способом удаления этих белков является их осаждение MgCl₂. Таким образом, экстракция мышечной ткани растворами с низкой ионной силой при щелочных значениях pH приводит к обогащению экстракта актином и десмином, а последующее осаждение этих белков MgCl₂ сопровождается значительными потерями hsp25.

Для того чтобы избежать этих проблем мы экстрагировали отмывую мышечную ткань 20 мМ трис-ацетатом (pH 8,0), содержащим 0,1 М КСl и 10 мМ MgCl₂. В таких условиях резко понижается экстрагируемость актина и десмина и вследствие этого отпадает необходимость проведения дополнительной стадии осаждения этих белков MgCl₂. К сожалению, оказалось, что в этих условиях лишь незначительная часть hsp25 переходит в экстракт и вследствие этого резко уменьшается выход белка. Суммируя результаты, представленные в этом разделе, и данные литературы [4, 15], можно заключить, что, судя по всему, hsp25 образует довольно прочные комплексы с сократительным аппаратом и мембранами клеток. В силу этого эффективная экстракция hsp25 становится возможной только

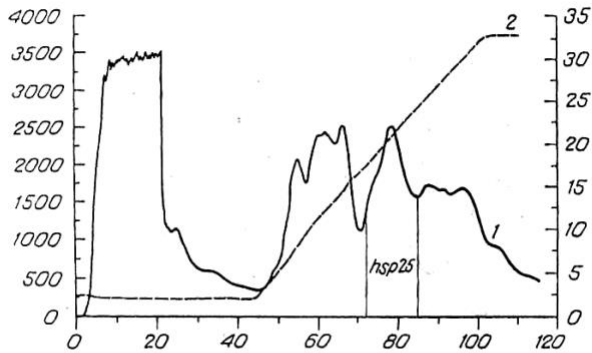


Рис. 3. Очистка рекомбинантного hsp25 на колонке HiTrap Q.

Колонку объемом 5 мл уравнивали буфером Б и наносили образец частично очищенного рекомбинантного hsp25, полученного из 1 л культуры *E. coli*. Колонку промывали 4-кратным объемом буфера Б, белки элюировали линейным градиентом соли (10–360 мМ NaCl), общий объем 60 мл. 1 — оптическая плотность при 280 нм, мАи, 2 — непрерывно регистрируемая электропроводность элюента мС/см. Белковый состав фракций (объем каждой фракции 1 мл) определяли методом Ds-Na-ПААГ — электрофореза, фракции, содержащие hsp25 (отмечены вертикальными линиями), объединяли и подвергали дальнейшей очистке методом гель-фильтрации. По оси абсцисс — объем элюции, мл; по оси ординат слева — оптическая плотность, мАи, справа — электропроводность, мС/см.

после частичной разборки сократительного аппарата и цитоскелета, что сопряжено с рядом трудностей. Вероятно, экстрагируемость hsp25 можно повысить, используя растворы мягких неионных детергентов (например, тритон X-100), однако в этом случае нельзя исключить существенного (и, возможно, необратимого) изменения четвертичной структуры белка. Таким образом, несмотря на очень высокое содержание hsp25 в мышечной ткани, лишь очень незначительная часть белка экстрагируется в мягких условиях. Вследствие этого выход белка из 100 г сырой ткани не превышает 2–3 мг ([5] и данная работа). В связи с тем, что выделение hsp25 из тканей животных сопряжено со значительными методическими трудностями и обеспечивает сравнительно низкий выход, мы предприняли попытку выделения рекомбинантного hsp25.

Выделение рекомбинантного hsp25 из клеток *E. coli*. При разработке метода выделения рекомбинантного hsp25 мы взяли за основу процедуру, описанную Бюхнером и соавт. [3]. В то же время были внесены довольно существенные изменения как в начальные стадии экстракции белка, так и в последующие стадии хроматографического разделения. На ранних стадиях выделения мы отказались от использования детергентов (дезоксихолата натрия, использованного в оригинальной методике) и проводили разрушение клеток и фрагментацию ДНК путем 2-кратной

ультразвуковой обработки. Было установлено, что при однократной экстракции очень значительная часть hsp25 остается связанной с обломками клеток и лишь 2-кратная экстракция приводит к полной солиubilизации hsp25. Мы также установили, что фракционирование насыщенным раствором сульфата аммония в интервале 0–40% (как это рекомендуется в оригинальной методике) не обеспечивает полного осаждения hsp25. Вследствие этого мы проводили осаждение сухим сульфатом аммония в интервале 0–50% насыщения. В связи с тем, что изоэлектрическая точка hsp25 из тканей птиц имеет большую величину, чем изоэлектрическая точка hsp25 из тканей млекопитающих, были изменены условия ионообменной хроматографии белка.

Анионообменную хроматографию грубого препарата рекомбинантного hsp25 проводили на колонке объемом 5 мл с Q-сефарозой (HiTrap Q, Аста FPLC) (рис. 3). Рекомбинантный белок дикого типа элюируется в середине градиента соли в виде довольно размытого асимметричного пика (см. рис. 3). Фракции, содержащие hsp25, объединяли, концентрировали и подвергали гель-фильтрации на колонке с сефакрилом S300 (Sephacryl S300, High prep 16/60). Как видно из рис. 4, рекомбинантный hsp25 дикого типа элюируется в виде большого симметричного пика с максимумом элюции на 50 мл. В конце профиля элюции элюируется примесный белок с кажущейся мол. массой 30 кД, а также олигонуклеотиды, образующиеся в ходе разрушения ДНК бактерий под действием ДНКазы I и ультразвука.

Разработанный метод позволяет получить от 6 до 20 мг белка из 1 л культуры *E. coli*. Выход белка

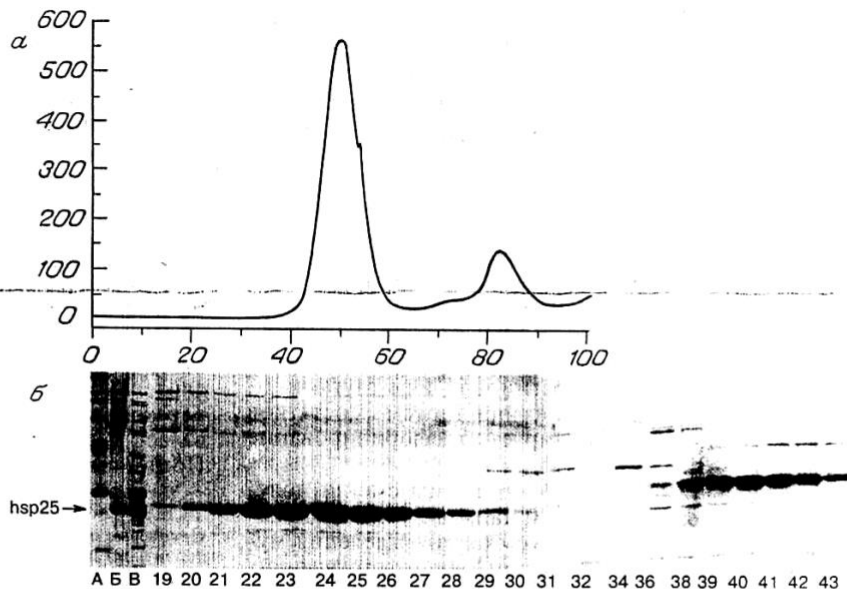


Рис. 4. Гель-фильтрация рекомбинантного hsp25 на колонке с сефакрилом S300 (Sephacryl S300, High prep 16/60).

а — профиль элюции частично очищенного препарата hsp25, полученного после ионообменной хроматографии, на колонке с сефакрилом S300. На колонку, уравнированную буфером Б, наносили 5 мл образца белка и элюировали со скоростью 0,5 мл/мин, собирая фракции объемом 2 мл, б — электрофоретический анализ белкового состава фракций, полученных в ходе гель-фильтрации. Цифры под треками соответствуют номерам фракций. Стрелкой обозначено положение hsp25. А — смесь белков стандартов с молекулярными массами 205, 116, 94, 66, 45 и 29 кД. Б — образец частично очищенного hsp25, Б — наносимый на колонку образец hsp25. По оси абсцисс — объем элюции, мл; по оси ординат — оптическая плотность при 280 нм, мАи.

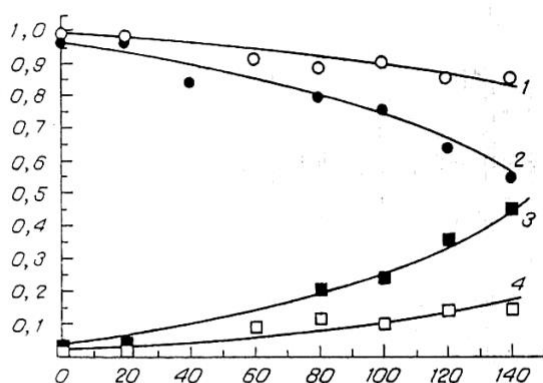


Рис. 5. Влияние рекомбинантного hsp25 на агрегацию α -лактальбумина, вызванную восстановлением его дисульфидных связей. Лактальбумин (0,55 мг/мл) инкубировали в 50 мМ фосфатном буфере (рН 7,0), содержащем 100 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА и 20 мМ дитиотрейтола в отсутствие (кривые 2 и 3) или в присутствии (кривые 1 и 4) 0,65 мг/мл hsp25. Через каждые 20 мин алиquotную часть образца подвергали центрифугированию и анализу на содержание лактальбумина в супернатанте (кривые 1 и 2) и в осадке (кривые 3 и 4) с помощью метода количественного Ds-Na-ПААГ электрофореза.

По оси абсцисс — время, мин; по оси ординат — доли лактальбумина в соответствующей форме.

существенно зависит от условий экспрессии. Так, установлено, что добавление малых концентраций изопропил- β -тиогалактозида (0,5—1 мМ) к суспензии *E. coli*, обладающей поглощением при 600 нм, равным 0,4—0,6, и культивирование бактерий в этих условиях в течение 4—5 ч приводит к существенному увеличению экспрессии hsp25.

Предложенный метод применим и для выделения мутантных форм рекомбинантного hsp25. Известно, что в условиях *in vivo* hsp25 может подвергаться фосфорилированию и что фосфорилирование влияет на олигомерное состояние hsp25 и его шаперонную активность [7, 10, 13]. Для моделирования фосфорилирования мы провели точечные мутации остатков серина, которые могут подвергаться фосфорилированию в малых белках теплового шока. Было получено 3 мутантных белка, в которых остатки Ser15, Ser77 и Ser81 и все 3 остатка Ser15, Ser77, Ser81 были заменены на остатки аспарагиновой кислоты (соответственно мутантные белки S15D, S77,81D и S15,77,81D).

Считается, что введение отрицательно заряженных остатков аспарагиновой или глутаминовой кислоты на место фосфорилируемых остатков серина успешно моделирует фосфорилирование hsp25 [7, 13].

Используя описанный метод, мы смогли получить все перечисленные мутантные белки в гомогенном состоянии. Первые стадии выделения мутантных белков не отличались от соответствующих стадий выделения рекомбинантного белка дикого типа. В то же время при проведении ионообменной хроматографии и гель-фильтрации были выявлены определенные различия в хроматографическом поведении белка дикого типа и его мутантных форм (см. таблицу). Оказалось, что мутантные белки с заменой остатков серина на остатки аспарагиновой кислоты прочнее сорбируются на колонке Q-сефа-

розой и элюируются в более широком диапазоне ионных сил, чем белок дикого типа. При этом увеличение количества точечных мутаций сопровождается увеличением прочности сорбции на анионообменнике. Например, белок с 3-я мутациями сорбируется на Q-сефарозе прочнее, чем белки с одной или двумя мутациями. Это может быть следствием того, что мутированные остатки располагаются на поверхности белка и вносят свой вклад в сорбцию белка на анионообменнике. Конечно, нельзя исключить возможности, что обнаруженное различие в сорбции на Q-сефарозе является следствием различного взаимодействия мутантных форм hsp25 с различными белками, присутствующими в смеси, подвергающейся хроматографическому разделению. Как видно из таблицы, введение точечных замен серина на аспарагиновую кислоту сопровождается увеличением объема элюции hsp25 при гель-фильтрации. Это может быть следствием либо частичной диссоциации крупных олигомеров hsp25 [7, 13], либо изменением формы и гидродинамических свойств крупных олигомеров hsp25. Потребуется дополнительные исследования для изучения физико-химических свойств рекомбинантного hsp25 и его мутантных форм, имитирующих фосфорилирование.

Изучение шаперонной активности рекомбинантного hsp25. Одним из наиболее распространенных методов исследования шаперонных свойств белков теплового шока является изучение их влияния на агрегацию частично денатурированных белков. Известно, что восстановление дисульфидных связей в структуре α -лактальбумина сопровождается переходом белка в состояние расплавленной глобулы и последующей агрегацией [9]. Малые белки теплового шока связываются с белками, находящимися в состоянии расплавленной глобулы, и тем самым препятствуют агрегации частично денатурированных белков. При инкубации изолированного лактальбумина в присутствии избытка дитиотрейтола происходит медленное восстановление дисульфидных связей, что приводит к агрегации белка. Вследствие этого после центрифугирования проб, инкубированных с дитиотрейтолом в течение 140 мин примерно половина лактальбумина оказывается в осадке и примерно столько же лактальбумина остается в супернатанте (кривые 2 и 3 на рис. 5). Если инкубацию лактальбумина проводили в присутствии рекомбинантного hsp25, то даже после очень длительной инкубации менее 20% лактальбумина переходило в осадок, а большая часть белка оставалась в супернатанте (кривые 1 и 4 на рис. 5). Представленные данные свидетельствуют о том,

Некоторые особенности хроматографического поведения рекомбинантного hsp25 дикого типа и его мутантных форм при ионообменной хроматографии и гель-фильтрации

Белок	Интервал ионных сил, в которых происходит элюция с колонки Q-сефарозы, мС/см	Максимум пика при гель-фильтрации на колонке с сефакилом S300, мл
Дикий тип	6,0—11,0	50
S15D	7,5—12,5	52
S77,81D	10,0—17,5	54
S15,77,81D	10,0—22,0	55

что рекомбинантный hsp25 обладает шаперонной активностью и может использоваться для проведения различных биохимических исследований.

Выводы

1. Проведенное исследование позволило определить содержание hsp25 в различных тканях птиц.
2. Разработаны модифицированные методы выделения тканевого и рекомбинантного hsp25.
3. Измерена шаперонная активность рекомбинантного малого белка теплового шока.

ЛИТЕРАТУРА

1. Benjamin I. J., McMillan D. R. Stress (Heat Shock) proteins. Molecular chaperones in cardiovascular biology and disease // *Circ. Res.* — 1998. — Vol. 83, N 2. — P. 117–132.
2. Benndorf R., Hayeß K., Ryazantsev S. et al. Phosphorylation and supramolecular organization of murine small heat shock protein HSP25 abolish its actin polymerization-inhibiting activity // *J. Biol. Chem.* — 1994. — Vol. 269, N 32. — P. 20780–20784.
3. Buchner J., Ehrnsperger M., Gaestel M., Walke S. Purification and characterization of small heat shock proteins // *Meth. Enzymol.* — 1998. — Vol. 290. — P. 339–349.
4. Ibitayo A. I., Sladick J., Tuteja S. et al. HSP27 in signal transduction and association with contractile proteins in smooth muscle cells // *Am. J. Physiol.* — 1999. — Vol. 277, N 2, Pt 1. — P. G445–G454.
5. Kato K., Shinohara H., Goto S. et al. Copurification of small heat shock protein with α B crystallin from human skeletal muscle // *J. Biol. Chem.* — 1992. — Vol. 267, N 11. — P. 7718–7725.
6. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4 // *Nature*. — 1970. — Vol. 227, N 259. — P. 680–685.
7. Lambert H., Charette S., Bernier A. F. et al. HSP27 multimerization mediated by phosphorylation-sensitive intermolecular interaction at the amino terminus // *J. Biol. Chem.* — 1999. — Vol. 274, N 14. — P. 9378–9385.
8. Larsen J. K., Yamboliev I. A., Weber L. A., Gerthoffer W. T. Phosphorylation of the 27 kDa heat shock protein via p38 MAP kinase and MAPKAP kinase in smooth muscle // *Am. J. Physiol.* — 1997. — Vol. 273, N 5, Pt 1. — P. L930–L940.
9. Lindner R. A., Carver J. A., Ehrnsperger M. et al. Mouse Hsp25, a small heat shock protein. The role of its C-terminal extension in oligomerization and chaperone action // *Eur. J. Biochem.* — 2000. — Vol. 267, N 7. — P. 1923–1932.
10. MacRae T. H. Structure and function of small heat shock/ α -crystallin proteins: established concepts and emerging ideas // *Cell. Mol. Life Sci.* — 2000. — Vol. 57, N 6. — P. 899–913.
11. Miron T., Wilchek M., Geiger B. Characterization of an inhibitor of actin polymerization in vinculin-rich fraction of turkey gizzard smooth muscle // *Eur. J. Biochem.* — 1988. — Vol. 178, N 2. — P. 543–553.
12. Miron T., Vancompernelle K., Vandekerckhove J. et al. A 25-kD inhibitor of actin polymerization is a low molecular mass heat shock protein // *J. Cell Biol.* — 1991. — Vol. 114, N 2. — P. 255–261.
13. Rogalla T., Ehrnsperger M., Preville X. et al. Regulation of Hsp27 oligomerization, chaperone function, and protective activity against oxidative stress/tumor necrosis factor α by phosphorylation // *J. Biol. Chem.* — 1999. — Vol. 274, N 27. — P. 18947–18956.
14. Sarkar G., Sommer S. S. The "megaprimer" method of site-directed mutagenesis // *Biotechniques*. — 1990. — Vol. 8, N 4. — P. 404–407.
15. Schäfer C., Clapp P., Welsh M. J. et al. HSP27 expression regulates CCK-induced changes of actin cytoskeleton in CHO–CCK–A cells // *Am. J. Physiol.* — 1999. — Vol. 277, N 6, Pt 1. — P. C1032–C1043.
16. Schaffner W., Weismann C. A rapid, sensitive, and specific method for determination of protein in diluted solution // *Analyt. Biochem.* — 1973. — Vol. 56, N 2. — P. 502–514.
17. Schmidt D. V., Ebner K. E. Isolation and properties of α -lactalbumin from various sources // *Biochim. Biophys. Acta*. — 1971. — Vol. 243, N 2. — P. 273–283.
18. Suzuki A., Stigiyama Y., Hayashi Y. et al. MKBP, a novel members of the small heat shock protein family, binds and activates the myotonic dystrophy protein kinase // *J. Cell Biol.* — 1998. — Vol. 140, N 5. — P. 1113–1124.
19. Wieske M., Benndorf R., Behlke J. et al. Defined sequence segments of the small heat shock proteins HSP25 and α B-crystallin inhibit actin polymerization // *Eur. J. Biochem.* — 2001. — Vol. 268, N 7. — P. 2083–2090.

Поступила 05.10.01