



УДК 577.322

ИСКУССТВЕННЫЙ БЕЛОК, ОБЛАДАЮЩИЙ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ ФАКТОРА ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ КЛЕТОК ЛИНИИ HL-60 ПРОМИЕЛОЦИТАРНОГО ЛЕЙКОЗА ЧЕЛОВЕКА

© 2003 г. Р. В. Черткова[#], И. А. Костанян, М. В. Астапова,
Е. А. Сурина, Д. А. Долгих, М. П. Кирпичников

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

Поступила в редакцию 11.12.2001 г. Принята к печати 15.02.2002 г.

Искусственный белок АВВ-df получен путем включения биологически активного гексапептида TGENHR с последовательностью 41–46 фактора дифференцировки клеток линии HL-60 промиелоцитарного лейкоза человека в *N*-конец полипептидной цепи альбегетина – искусственного белка с заданной структурой. Обнаружено, что белок АВВ-df вызывает дифференцировку и подавляет пролиферацию клеток HL-60 с эффективностью, сопоставимой с эффективностью исходного пептида. Согласно данным КД-спектроскопии, включение пептидного фрагмента в альбегетин практически не изменяет регулярную вторичную структуру белка.

Ключевые слова: альбегетин, искусственные белки, пептид HLDF-6, фактор дифференцировки HLDF, клеточная линия HL-60.

ВВЕДЕНИЕ

Теоретические знания о принципах структурной и функциональной организации белковых молекул, накопленные к настоящему моменту, активно используются при дизайне новых белковых структур (*de novo*-белков). Одним из возможных практических применений искусственных белков, не обладающих собственной функцией, может быть использование их в качестве “носителей” биологически активных пептидов. Это позволит вычленивать отдельные функциональные участки природных белков для их подробного исследования, а в перспективе создавать не обладающие побочными активностями белковые препараты с полезными медицинскими или биотехнологическими свойствами. Кроме того, возможно, что присоединение к структурированной белковой молекуле активного пептида может оказаться эффективным способом стабилизации последнего за счет уменьшения уровня биodeградации под действием клеточных протеиназ.

Ранее [1] в нашей лаборатории был получен искусственный белок альбегетин с уникальной

топологией, не обнаруженной в природных белках, и обладающий достаточной стабильностью и компактностью [2]. Затем на основе альбегетина путем введения в его *N*-концевую последовательность пептида (фрагмент 130–137) LKEKKYSP [3] из консервативной части молекулы α_2 -интерферона человека [4] был получен белок альбегетин [5]. Было показано, что альбегетин обладает более высокой по сравнению с нативным α_2 -интерфероном бласттрансформирующей активностью [6], а также несколько более компактной и стабильной по сравнению с альбегетином структурой [7]. Исследования иммунологических свойств альбегетина и альбегетина позволили установить, что оба белка обладают относительно низкой иммуногенностью [8].

В 1995 г. из культуральной среды клеток HL-60 промиелоцитарного лейкоза человека, обработанных *полностью-транс*-ретиноевой кислотой, был выделен и охарактеризован эндогенный белковый фактор с *M* 8.2 кДа (HLDF), вызывающий дифференцировку исходной клеточной линии HL-60 по гранулоцитарному пути [9, 10]. Для получения полноразмерного фактора HLDF были созданы экспрессионные конструкции, однако, выяснилось, что его экспрессия в прокариотических системах сопряжена со значительными сложностями, возникающими, по-видимому, вследствие высокой ДНК/РНК-гидролизующей активности фактора, обусловленной фрагментом RRWHLKE (31–38) [11]. В процессе изучения химически синтезированных фрагментов фактора HLDF был идентифи-

Сокращения: АВВ – искусственный белок альбегетин; АВВ-df – альбегетин с присоединенным фрагментом TGENHR; HLDF – фактор дифференцировки клеток HL-60 промиелоцитарного лейкоза человека; HLDF-6 – гексапептидный фрагмент TGENHR HLDF-(41–46); NBT – нитроглюбой тетразолий; TRX – тиоредоксин; IPTG – изопропилтио- β -D-галактозид; PEI – полиэтиленмин.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 335-28-88; факс: (095) 335-50-33; эл. почта: rita@nmr.ru).

df-dp (5') CC ATC GAG GGT CGT ACT GGT GAG AAC CAC CGT GAT CCG GGC GACC

df-rp (5') CGTC GCC CGG ATC ACG GTG GTT CTC ACC AGT ACG ACC CTC GAT GG

Схема. Структура синтезированных олигонуклеотидов – праймеров, использованных для введения в ген альбегетина последовательности, кодирующей гексапептидный фрагмент HLDF-6 (подчеркнута). Участок, кодирующий сайт связывания протеиназы фактора Ха, выделен зачернением.

цирован шестичленный пептид TGENHR (HLDF-6), сохраняющий способность полноразмерного фактора вызывать дифференцировку и останавливать пролиферацию клеток HL-60 [12]. Исследование механизмов действия пептида HLDF-6 не выявило специфических рецепторов пептида на клеточной поверхности, что позволило авторам предположить его неспецифическое взаимодействие с липидными компонентами клеточной мембраны [12].

Индукторы дифференцировки, подобные полноразмерному фактору HLDF и пептиду HLDF-6, представляют большой практический интерес в качестве терапевтических средств для лечения некоторых форм лейкозов. Преимуществами таких препаратов по сравнению с химиотерапевтическими средствами являются отсутствие побочных воздействий и токсичности, хорошая растворимость и физиологический диапазон активных концентраций. Однако, как сказано выше, получение рекомбинантного фактора HLDF сопряжено с большими трудностями, а пептидные препараты, удобные для исследований *in vitro*, зачастую сложно применить в клинической практике вследствие их быстрой инактивации в организме. В связи с этим актуальной является задача конструирования белковых препаратов, воспроизводящих противоопухолевые свойства подобных белковых факторов и обладающих более высокой по сравнению с пептидными препаратами устойчивостью к деградации *in vivo* и отсутствием ограничений доступности препарата.

Цель настоящей работы – получение и исследование нового искусственного белка с заданными биологическими свойствами, а именно, способностью вызывать дифференцировку и останавливать пролиферацию лейкемических клеток и представляющего собой альбегетин с присоединенным к его N-концевой последовательности активным гексапептидным фрагментом HLDF-6 фактора дифференцировки линии клеток HL-60 промиелоцитарного лейкоза человека.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ген искусственного белка альбегетина был получен ранее [1], а затем введен в плазмидный вектор для экспрессии *pMal-c* [13] по сайтам рестрикции *Bam*HI и *Hind*III. Этот вектор позволяет экспрессировать ген целевого белка в слитном виде с геном мальтозосвязывающего белка (МСБ).

Однако конечный выход альбегетина при использовании этой системы оказался недостаточным, вероятно, вследствие значительного различия молекулярных масс МСБ (~45 кДа) и целевого белка (~9 кДа). В связи с этим было решено использовать другую конструкцию для слитной экспрессии, позволяющую применить удобную схему выделения и очистки и соответственно добиться высокого выхода искусственных белков.

В качестве такой конструкции был использован плазмидный вектор *pET-32 LIC* [14] для экспрессии в прокариотической системе (*Escherichia coli*). Этот вектор позволяет экспрессировать ген целевого белка в виде единой полипептидной цепи (гибрида) с тиоредоксином (TRX, ген *trxA*) из *E. coli* (рис. 1, А). Помимо TRX в состав такого гибридного белка входят вспомогательные участки – последовательность из шести остатков His (6His × Tag, *bhis*) для быстрой и эффективной очистки гибридного белка с использованием металлхелатной хроматографии на колонке с никель-нитрилтриацетатагарозой (Ni-NTA-SF), а также участок распознавания высокоспецифической протеиназы фактора Ха IEGR (*iegr*) [15] для последующего энзиматического расщепления гибридного белка. Рекомбинантный ген гибридного белка в этом векторе находится под контролем сильного промотора бактериофага T7, что позволяет достигать достаточно высокого уровня экспрессии.

Для субклонирования гена альбегетина в вектор *pET-32 LIC* в его состав с помощью ПЦР был введен сайт рестрикции *Bgl*III, после чего ген был проклонирован по рестриктным сайтам *Bgl*III и *Hind*III в приведенный выше вектор.

Введение олигонуклеотида, кодирующего пептидный фрагмент TGENHR, в область гена, соответствующую N-концевой последовательности альбегетина, было осуществлено методом сайт-направленного мутагенеза (“QuikChange”, Stratagene, США) [16]. Метод позволяет с большой точностью вводить в ген последовательности, кодирующие небольшие фрагменты, путем амплификации в ходе циклической реакции обеих цепей плазмидной ДНК. Для этого были синтезированы два комплементарных праймера, прямой *df-dp* и обратный *df-rp* (схема), содержащие участок плазмиды, кодирующий сайт распознавания протеиназы фактора Ха (выделен зачернением), участок, кодирующий вводимый пептид (подчер-

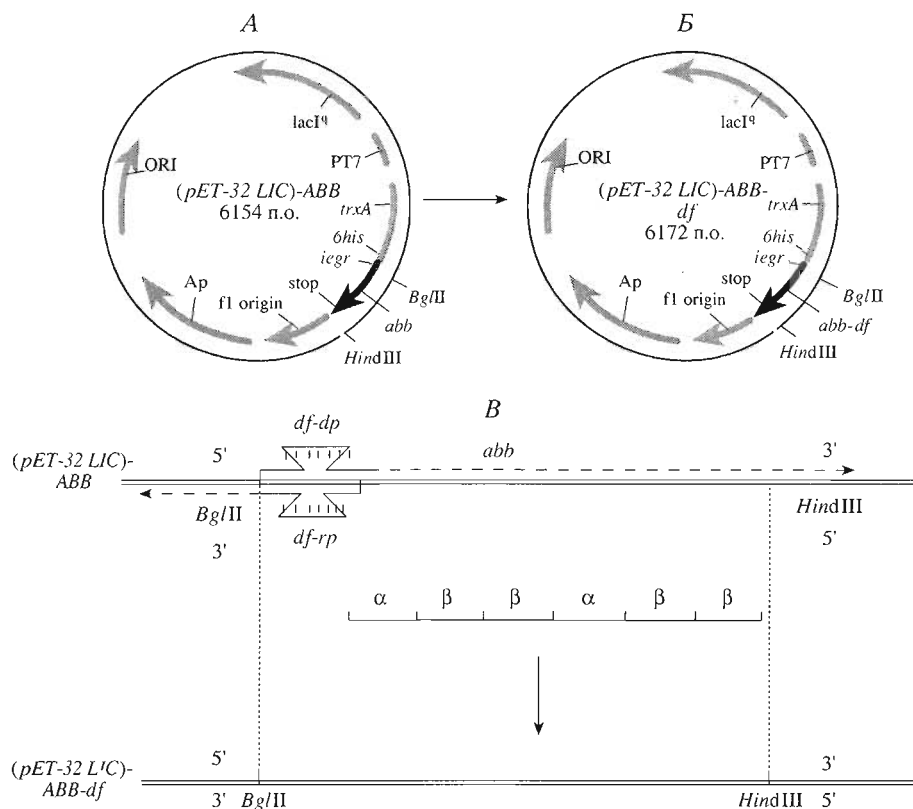


Рис. 1. Экспрессионные плазмидные векторы серии *pET-32 LIC*. **A** и **Б** – схемы исходного плазмидного вектора (*pET-32 LIC*)-*ABB*, несущего ген альбегетина, и вектора (*pET-32 LIC*)-*ABB-df*, несущего ген альбегетина с присоединенным пептидным фрагментом HLDF-6. **В** – схема, иллюстрирующая введение в (*pET-32 LIC*)-*ABB* с помощью циклической реакции последовательности *hldf-6*, кодирующей гексапептид HLDF-6. *df-dp* и *df-rp* – праймеры для введения в ген альбегетина этой последовательности. Показано распределение элементов вторичной структуры (α , β) белка альбегетина на соответствующей нуклеотидной цепи.

нут), и участок 5'-концевой последовательности гена альбегетина.

В качестве матричной в реакции использовалась ДНК вектора (*pET-32 LIC*)-*ABB*, несущего ген альбегетина. Схема реакции представлена на рис. 1, **В**. Реакцию амплификации плазмидной ДНК проводили согласно рекомендациям фирмы-изготовителя ("QuikChange", Stratagene, США). Для того чтобы избавиться от матричной плазмидной ДНК, по окончании реакции продукт обрабатывали эндонуклеазой рестрикции *DpnI*, проявляющей специфичность к метилированной ДНК (последовательность 5'-G^{m6}ATC-3') [17]. В отличие от матричной плазмиды, наработанной в *E. coli*, синтезированная в ходе реакции плазмидная ДНК (*pET-32 LIC*)-*ABB-df*, содержащая мутантный ген, не подвергалась расщеплению *DpnI*.

Полученные плазмиды проверяли на наличие вставки секвенированием и использовали для трансформации *E. coli*. Таким образом, в составе описанной экспрессирующей конструкции был получен ген альбегетина, включающий олигонуклеотидную последовательность, кодирующую пептид TGENHR-HLDF-(41-46)-фрагмент (рис. 1, **В**).

На рис. 2 представлена аминокислотная последовательность полипептида, кодируемого полученным геном (*a*), а также его предполагаемая пространственная структура (*b*) (см. ниже).

Наработку белков *ABB* и *ABB-df* в виде гибридов с TRX осуществляли в штамме *E. coli* BL21(DE3)*pLysS*, который является лизогенным по бактериофагу λ (DE3) и несет участок ДНК с геном *lacI^q* и геном РНК-полимеразы фага Т7 под контролем промотора *lacUV5* (PT7). Известно, что сочетание содержащегося в векторе *pET-32 LIC T7-lac*-промотора и клеточной плазмиды *pLysS* является необходимым условием для экспрессии генов токсичных и сильно токсичных белков в клетке [18]. Несмотря на отсутствие токсичности в наших белках, значительного уровня экспрессии их генов в слитном виде с геном *trxA* удалось достичь лишь при наличии в клетках штамма плазмиды *pLysS*; попытки получить достаточный уровень экспрессии в штаммах *E. coli* BL21(DE3) и AD494 не увенчались успехом. В результате оптимизации условий биосинтеза гибридных белков было обнаружено, что максимальный выход (до 150 мг/л клеточной суспензии) достигается за

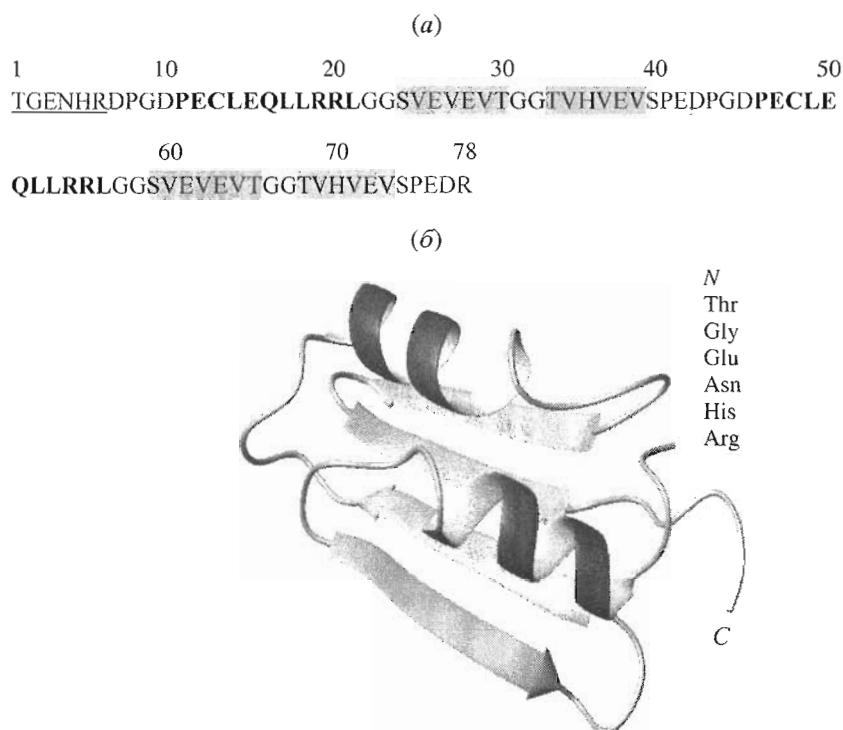


Рис. 2. Структура искусственного белка альбегетина, несущего в составе *N*-концевой последовательности пептидный фрагмент HLDF-6: (а) – первичная структура; подчеркнута аминокислотная последовательность пептида HLDF-6, жирным шрифтом выделены α -спиральные, а зачернением – β -структурные участки; (б) – предполагаемая пространственная структура.

8–9 ч в питательной среде ТВ при концентрации индуктора изопропилтио- β -*D*-галактозида (IPTG) 0,6 мМ и 37°C.

Гибридные белки очищали с помощью жидкостной хроматографии на колонке с анионообменным сорбентом Mono Q HR, а затем на колонке с металлхелатным сорбентом Ni-NTA-SF и подвергали расщеплению высокоспецифичной протеиназой фактором Ха. После этого реакцию смесь наносили на колонку с Ni-NTA-SF. На этом этапе разделение смеси белков основывалось на том, что отщепившийся искусственный белок в отличие от остальной части гибрида, несущей в своем составе 6His \times Tag, не взаимодействовал с сорбентом. Разработанная схема выделения и очистки искусственных белков позволяла получать от 12 до 15 мг белка с 1 л клеточной суспензии.

Согласно данным масс-спектрометрии, молекулярная масса полученного белка соответствовала рассчитанной и составляла 8,37 кДа. Гомогенность препарата АВВ-df была подтверждена электрофоретически, а также анализом *N*-концевой аминокислотной последовательности методом секвенирования. При этом удалось определить последовательность девяти *N*-концевых аминокислотных остатков: Thr-Gly-Glu-Asn-His-Arg-Asp-Pro-Gly-.

Из данных КД-спектроскопии белков АВВ и АВВ-df в дальней УФ-области (рис. 3) следует, что искусственные белки имеют весьма похожие спектры. Как известно, анализ формы и интенсивности спектров КД в этой области позволяет определить содержание регулярной вторичной

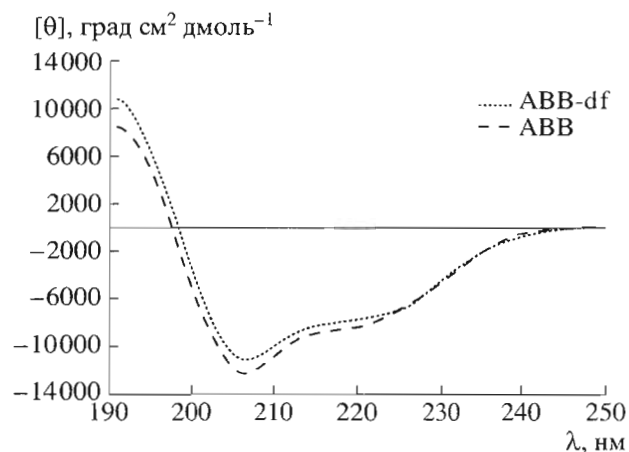


Рис. 3. Спектры КД белков АВВ и АВВ-df в дальней УФ-области. Измерения проводились в буфере 20 мМ NH_4HCO_3 , pH 7,9 при 21°C. Концентрации белков – 0,90 (АВВ) и 0,81 (АВВ-df) мг/мл, толщина кюветы – 0,1 см.



Рис. 4. Влияние препаратов белков АВВ-df (темно-серые столбцы) и АВВ (белые столбцы) на дифференцировку клеток линии HL-60 промиелоцитарного лейкоза человека в ходе NBT-теста. В качестве отрицательного контроля использовались интактные клетки HL-60 (светло-серый столбец), в качестве положительного – пептидный фрагмент HLDF-6 в концентрации 10^{-6} М (черный столбец). Приведены средние значения трех независимых экспериментов, величина стандартного отклонения составляла не более 6% среднего значения.

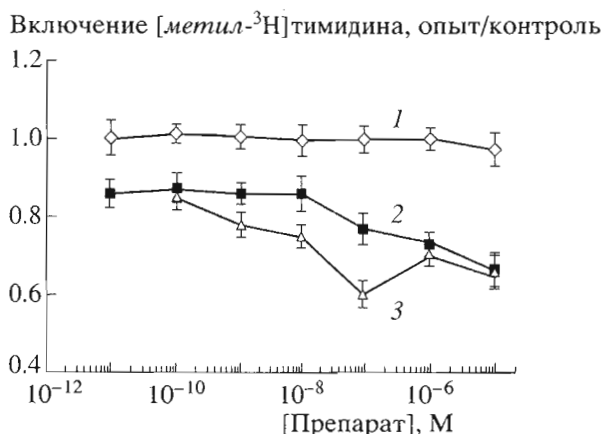


Рис. 5. Влияние препаратов белков АВВ (1) и АВВ-df (2) и пептида HLDF-6 (3) на пролиферацию клеток HL-60. Включение [*метил*-³H]тимидина в контроле составляло 46100 ± 2100 имп./мин. Приведены средние значения двух независимых экспериментов \pm S.E.M.

структуры в исследуемом белке. Действительно, расчет спектров по методике Провенчера и Глокера [19] показал, что содержание α - и β -структур в новом искусственном белке АВВ-df составляет 28 и 33% соответственно, тогда как для альбелбетина эти характеристики равны 29 и 40%. Полученные значения хорошо согласуются с расчетными данными: из анализа предполагаемой структуры альбелбетина следует, что молекула этого белка должна содержать 30 и 36% α - и β -структур [20]. Небольшое уменьшение содержания

α -структурированных участков по сравнению с расчетными и увеличение содержания неструктурированных объясняется, по-видимому, тем, что фрагмент TGENHR в составе белка АВВ-df (как, предположительно, и в самом HLDF) не обладает регулярной вторичной структурой. Полученные данные хорошо сопоставимы с результатами исследования структурных свойств альбелбетона, содержание α - и β -структур в котором, как было показано, составляет 27 и 35% [21].

Ранее на основе данных КД-спектроскопии в ближней УФ-области было показано, что введение в состав альбелбетина октапептидного фрагмента 130–137 α_2 -интерферона человека приводит к появлению более жесткой и упорядоченной по сравнению с альбелбетинном пространственной структуры, по крайней мере, в окружении остатка Tyr7 [7]. Поскольку в белке АВВ-df, как и в альбелбетине, отсутствуют ароматические аминокислотные остатки, спектр КД в ближней УФ-области не имеет выраженных специфических сигналов, поэтому судить об изменении упорядоченности и стабильности структуры этого белка можно лишь после проведения исследований другими методами, например, дифференциальной сканирующей микрокалориметрией. Тем не менее сохранение регулярной вторичной структуры альбелбетина в белке АВВ-df позволяет предположить, что молекула нового белка сохранила общие структурные свойства альбелбетина, не противоречащие предполагаемой структуре (рис. 2б).

В ходе тестирования биологических свойств белка АВВ-df было показано, что по отношению к клеткам линии HL-60 белок обладает дифференцирующей активностью, которую определяли с помощью NBT-теста [22] (рис. 4). Приведенные данные демонстрируют, что в присутствии белка АВВ-df возрастало число NBT-положительных клеток HL-60 (способных восстанавливать нитро-голубой тетразолий) во всем диапазоне исследованных концентраций, в то время как альбелбетин не оказывал на клетки подобного воздействия. Эффективность действия препарата АВВ-df сопоставима с эффективностью пептидного фрагмента HLDF-6, хотя и более низкая по сравнению с эффективностью нативного фактора HLDF [10].

Дифференцирующая активность исследуемого белка оценивалась также по способности подавлять общий уровень пролиферации культуры клеток HL-60, определяемый по количеству включенного в клетки [*метил*-³H]тимидина [23]. Из приведенных на рис. 5 данных следует, что воздействие белка АВВ-df, ингибирующее включение [*метил*-³H]тимидина, проявлялось в широком диапазоне концентраций (10^{-11} – 10^{-5} М). При увеличении доз препарата активность возрастала пропорционально, достигая максимального значения при концентрации 10^{-5} М, что сопоставимо с активностью пептида HLDF-6, хотя и ниже, чем активность нативного фактора дифференцировки

HLDF [10]. Исследованный параллельно препарат альбегетина при тех же концентрациях не оказывал заметного влияния на пролиферацию клеток. Важно отметить, что препараты искусственных белков ABB-df и ABB, а также пептида HLDF-6 не проявляли в отношении клеток HL-60 цитотоксической активности (данные не представлены).

Таким образом, в результате нашей работы на основе альбегетина и фактора дифференцировки HLDF клеток линии HL-60 промиелоцитарного лейкоза человека сконструирован новый искусственный белок ABB-df с заданными биологическими свойствами. Получен экспрессионный вектор, содержащий ген этого белка, и разработана эффективная система его биосинтеза, выделения и очистки, что позволило наработать искусственный белок в количествах, достаточных для анализа биологических и структурных свойств. Согласно данным КД-спектроскопии, введение пептида в молекулу альбегетина не вызвало сколько-нибудь заметного изменения его структурных характеристик. В ходе тестирования биологической активности было обнаружено, что введение аминокислотной последовательности пептида HLDF-6 в N-концевую последовательность альбегетина приводит к появлению у последнего некоторых свойств полноразмерного фактора дифференцировки HLDF, а именно дифференцирующей и антипролиферативной активностей. Полученный нами химерный белок ABB-df является индуктором дифференцировки клеток линии HL-60 и практически воспроизводит активность синтетического пептида, хотя и уступает в активности нативному фактору HLDF.

В целом, полученные результаты служат основанием для дальнейших исследований (как *in vitro*, так и *in vivo*) биологических свойств нового белка, а также изучения его структурных особенностей. Полученные результаты позволяют предполагать возможное использование подобных белковых препаратов в биотехнологии, фармакологии и биомедицине, а кроме того, еще одно свидетельство в пользу того, что альбегетин – отличная модель для исследования функциональной роли отдельных пептидных фрагментов биологически активных белков.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы реактивы производства фирм ICN (США), Sigma (США), Serva (США), Bio-Rad (США), а также Реахим (Россия); ферменты: высокоспецифическая протеиназа фактора Ха (New England Biolabs, США), эндонуклеазы рестрикции (Stratagene, Promega, США), ДНК-полимераза *Pfu* (Stratagene, США). Дистиллированную воду дополнительно очищали с помощью системы Milli-Q (Millipore, США).

Штаммы бактерий и ростовые среды. В работе использовали штаммы бактерий *E. coli*: XL-1 Blue (*recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac⁻*) (Stratagene, США) и BL21(DE3)*pLysS* (*F⁻, ompT, hsdS_B, (r_B⁻, m_B⁻), gal, dcm, (DE3), pLysS*) (Novagen, США). Клетки *E. coli* выращивали в средах LB, SOB или TB [24] в зависимости от поставленной задачи; твердые среды содержали 1.5% агара. При необходимости в среду добавляли антибиотики ампициллин (100 мкг/мл) и/или хлорамфеникол (30 мкг/мл).

Конструирование вектора для экспрессии гена, кодирующего белок ABB-df. Все генно-инженерные работы (выделение плазмиды и секвенирование, трансформация бактериальных штаммов) выполняли по стандартным методикам [24]. Введение олигонуклеотида, кодирующего фрагмент TGENHR из HLDF, в ген альбегетина с помощью сайт-направленного мутагенеза проводили согласно рекомендациям протокола фирмы-изготовителя ("QuikChange", Stratagene, США). Реакционная смесь в объеме 50 мкл содержала 50 нг матричной ДНК (плазида (*pET-32 LIC*)-ABB, содержащая ген альбегетина), по 125 нг олигонуклеотидных праймеров, по 10 нмоль каждого из четырех дезоксирибонуклеозидтрифосфатов и 2.5 ед. акт. *Pfu*-ДНК-полимеразы. Проводили 20 циклов реакции амплификации по следующей схеме: денатурация матричной ДНК при 95°C (45 с), отжиг при 55°C (60 с) и элонгация при 68°C (12 мин). После завершения реакции к смеси добавляли 10 ед. акт. рестриктазы *DpnI* и инкубировали в течение 60 мин при 37°C. Далее аликвоты полученной смеси использовали для трансформации суперкомпетентных клеток *E. coli* XL-1 Blue по стандартной методике.

Экспрессия рекомбинантных генов. Клетки штамма *E. coli* BL21(DE3)*pLysS*, трансформированные содержащими гены белков ABB и ABB-df рекомбинантными плазмидами (*pET-32 LIC*)-ABB и (*pET-32 LIC*)-ABB-df, выращивали в среде Terrific broth (TB) (12 г/л бактотриптона, 24 г/л дрожжевого экстракта, 0.04% глицерина и 1/10 объема раствора фосфатов: 0.17 М KH_2PO_4 , 0.72 М K_2HPO_4 , pH 7.4), до значения оптического поглощения $A_{550} = 0.5-0.6$. Затем индуцировали экспрессию генов, добавляя IPTG до конечной концентрации 0.6 мМ. Индуцированную культуру выращивали при 37°C и хорошей аэрации в течение 8–9 ч, после чего клеточную биомассу осаждали центрифугированием в течение 15 мин при 4000 g.

Выделение и очистка белков. Полученный клеточный осадок ресуспендировали в буфере для лизиса (50 мМ Трис-HCl, pH 7.8, 2 мМ EDTA, 100 мМ NaCl, 0.1 мМ фенилметилсульфонилфторид). Клеточную суспензию гомогенизировали с помощью ультразвукового дезинтегратора, кле-

точный дебрис осаждали центрифугированием в течение 15 мин при 25000 *g*. К супернатанту добавляли полиэтиленимин (PEI) до конечной концентрации 0.01%, смесь инкубировали в течение 30 мин при 4°C и постоянном перемешивании, после чего осадок комплекса PEI с нуклеиновыми кислотами и частью клеточных белков удаляли центрифугированием в течение 15 мин при 25000 *g*.

Выделение и очистку белков проводили на автоматическом хроматографе Bio-Logic (Bio-Rad, США). Клеточный экстракт наносили на ионообменную колонку Mono Q HR 16/10 (Pharmacia, Швеция). Гибридный белок элюировали в линейном градиенте концентрации NaCl (0.28–0.56 М) со скоростью 2 мл/мин в буфере для элюции (25 мМ Трис-HCl, pH 8.0, 1 мМ NaN₃). Фракции, обогащенные гибридным белком, диализовали против 50 мМ Трис-HCl-буфера, pH 8.0, содержащего 300 мМ NaCl, 20 мМ имидазол, 1 мМ NaN₃, концентрировали и наносили на колонку, заполненную никель-нитрилтриацетатагарозой (Ni-NTA-SF) (Qiagen, США).

Металлхелатная очистка проводилась согласно протоколу фирмы-производителя; фракции, содержащие гибридный белок, диализовали против буфера для протеолиза (25 мМ Трис-HCl, pH 8.0, 50 мМ NaCl, 2 мМ CaCl₂, 1 мМ NaN₃). Энзиматическое расщепление гибридного белка протеиназой фактором Ха и последующее разделение TRX и целевого белка с помощью металлхелатной хроматографии на колонке с Ni-NTA-SF проводили согласно протоколам фирм-производителей (New England Biolabs, США и Qiagen, США соответственно). Очищенные белки при необходимости концентрировали и диализовали против буфера 20 мМ NH₄HCO₃, pH 7.9.

Аналитические методы. Концентрацию гибридного белка определяли по поглощению при длине волны 280 нм с учетом расчетного молярного коэффициента поглощения. Концентрации белков АВВ и АВВ-df определяли путем сравнения оптического поглощения при λ 215 и 225 нм [25].

Все этапы наработки, выделения и очистки белков контролировали с помощью электрофореза в 12% SDS-ПААГ по методу Лэммли [26] и в 12% геле в Трис/трициновой буферной системе [27]. Анализ N-концевых аминокислотных последовательностей полученных белков проводили автоматической деградацией по Эдману [28] с использованием газофазного аминокислотного секвенатора 470A (Applied Biosystems, США).

Спектры КД в дальней УФ-области (190–250 нм) были получены с помощью спектрополяриметра Jasco-500C (Japan Spectroscopic Co., Япония), обобранного термостатируемой ячейкой. Концентрации белков в исследуемых образцах составляли 0.90 и 0.81 мг/мл для АВВ и АВВ-df соответственно. Измерения проводили в буфере 20 мМ NH₄HCO₃, pH 7.9, при 21°C, в кювете с длиной оптического пути 0.1 см. Состав регулярной вторич-

ной структуры исследуемых белков рассчитывали по методике Провенчера и Глокера [19].

Культивирование лейкемических клеток. Клеточную линию HL-60 культивировали во влажной атмосфере воздуха с 5% CO₂ при 37°C в среде RPMI-1640, содержащей 10 мМ HEPES, 0.2% NaHCO₃, 2 мМ L-глутамин, 2 мМ пируват натрия, 50 мкг/мл гентамицина, 10% инактивированную эмбриональную сыворотку теленка, pH 7.5. Концентрация клеток для инициации роста составляла 2.5×10^5 клеток/мл; время удвоения клеток составляло 36–48 ч. По достижении максимальной плотности (2×10^6 клеток/мл) в конце логарифмической фазы клетки пересевали. По тесту с трипановым синим, жизнеспособность клеток превышала 95%.

Дифференцирующую активность препаратов белков и пептида определяли по их способности восстанавливать нитроголубой тетразолий в ходе NBT-теста [22]. Исследуемый препарат белка или пептида вносили в лунки в диапазоне концентраций от 10^{-10} – 10^{-6} М, клетки инкубировали во влажной атмосфере воздуха с 5% CO₂ при 37°C. На четвертые сутки после индукции дифференцирующую активность определяли по числу NBT-положительных клеток, выраженному в процентах. Для представления результатов были просчитаны не менее 300 клеток. NBT-положительными считали клетки, содержащие не менее 10 темно-голубых гранул.

Антипролиферативные свойства препаратов оценивали по их способности оказывать влияние на включение в клетки [метил-³H]тимидина [23]. Для постановки этого эксперимента в 24-луночные планшеты вносили по 1 мл суспензии клеток (концентрация 2.5×10^5 клеток/мл), затем в лунки вносили исследуемый препарат белка или пептида в диапазоне концентраций 10^{-10} – 10^{-5} М; в контрольные лунки вносили равный объем среды. Клетки инкубировали во влажной атмосфере воздуха с 5% CO₂ при 37°C в течение 72 ч. За 2 ч до окончания культивирования клеток в каждую лунку добавляли по 1 мкКи [метил-³H]тимидина. По окончании инкубации реакцию смесь фильтровали через стекловолоконистые фильтры GF/C (Whatman, Англия). Радиоактивность на фильтрах подсчитывали с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика LS5801 (Beckman, США). Долю включения [метил-³H]тимидина рассчитывали по формуле:

$$\text{доля включения [метил-}^3\text{H]тимидина} = \frac{\text{= (имп./мин в опыте)}}{\text{(имп./мин в контроле)}}$$

Работа выполнена при финансовой поддержке Международного научно-технического центра (ISTC) и Международного центра геномной инженерии и биотехнологии (ICGEB).

Авторы выражают благодарность Е.В. Наволоцкой, Р.И. Нуриевой, Т.Н. Лепиховой и Н.В. Малковой (ФИБХ им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчин-

никова РАН, г. Пущино) за помощь при исследовании антипролиферативной активности белков; Н.С. Быстрову за синтез олигонуклеотидов, Ю.Ф. Леоновой за определение N-концевой аминокислотной последовательности, а также И.А. Куделиной за помощь при измерении КД-спектров.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Долгих Д.А., Федоров А.Н., Чермерис В.В., Чернов Б.К., Финкельштейн А.В., Шульга А.А., Алахов Ю.Б., Кирпичников М.П., Птицын О.Б. // Докл. АН СССР. 1991. Т. 320. С. 1266–1269.
2. Fedorov A.N., Dolgikh D.A., Chemeris V.V., Chernov B.K., Finkelstein A.V., Schulga A.A., Alakhov Yu.B., Kirpichnikov M.P., Ptitsyn O.B. // J. Mol. Biol. 1992. V. 225. P. 927–931.
3. Zav'yalov V.P., Navolotskaya E.V., Vasilenko R.N., Abramov V.M., Volodina E.Y., Roslovtseva O.A., Prusakov A.N., Kaurov O.A // Molecular Immunology. 1995. V. 32. P. 425–431.
4. Zav'yalov V.P. Proceedings of the First ISTC Symp. "Immunoglobulins, Molecular Chaperones and Immunity". 1995. P. 45–68.
5. Dolgikh D.A., Gabrielyan A.E., Navolotskaya Y.V., Chemeris V.V., Kirpichnikov M.P. // Biophysics. 1993. V. 38. P. 59–66.
6. Dolgikh D.A., Uversky V.N., Gabrielyan A.E., Chemeris V.V., Fedorov A.N., Navolotskaya Y.V., Zav'yalov V.P., Kirpichnikov M.P. // Protein Eng. 1996. V. 9. P. 195–201.
7. Aphsizheva I.Yu., Dolgikh D.A., Abdullaev Z.K., Uversky V.N., Kirpichnikov M.P., Ptitsyn O.B. // FEBS Lett. 1998. № 425. P.101–104.
8. Афасижева И.Ю., Долгих Д.А., Кирпичников М.П. // Молекулярн. биология. 1999. Т. 33. С. 679–683.
9. Kostanyan I.A., Astarova M.V., Starovoytova E.V., Dranitsina S.M., Lipkin V.M. // FEBS Lett. 1994. № 356. P. 327–329.
10. Костанян И.А., Астапова М.В., Старовойтова Е.В., Драницына С.М., Липкин В.М. // Биоорган. химия. 1995. Т. 21. С. 243–248.
11. Драницына С.М., Костанян И.А., Андреева С.Г., Астапова М.В., Бабиченко И.И., Баева О.В., Богачук А.П., Молотковская И.М., Родионов И.Л., Смирнова Е.В., Липкин В.М. // Биоорган. химия. 2000. Т. 26. С. 340–351.
12. Костанян И.А., Наволоцкая Е.В., Лепихова Т.Н., Астапова М.В., Родионов И.Л., Телегин Г.Б., Золотарев Ю.А., Молотковская И.М., Липкин В.М. // Биоорган. химия. 2000. Т. 26. С. 505–511.
13. Protein Fusion and Purification System. Direction for Expression and Purification of Proteins from Cloned Genes // New England Biolabs, 1991.
14. pET System Manual // 6th ed. Novagen, 1995.
15. Nagia K., Thogersen H.C. // Nature. 1984. V. 309. P. 810–812.
16. QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit // Instruction Manual. Stratagene, 1997.
17. Nelson M., McClelland M. // Methods Enzymol. 1992. V. 216. P. 279–303.
18. Studier F.W., Moffatt B.A. // J. Mol. Biol. 1986. V. 189. P. 113–130.
19. Provencher S.W., Glocker J. // Biochemistry. 1981. V. 20. P. 33–37.
20. Chemeris V.V., Dolgikh D.A., Fedorov A.N., Finkelstein A.V., Kirpichnikov M.P., Uversky V.N., Ptitsyn O.B. // Protein Eng. 1994. V. 7. P. 1041–1052.
21. Афасижева И.Ю., Долгих Д.А., Абдуллаев З.Х., Латыпов Р.Ф., Туктопуло Е.И., Уверский В.Н., Птицын О.Б., Кирпичников М.П. // Биофизика. 1998. Т. 43. С. 384–391.
22. Baehner R.L., Nathan D.G. // J. Med. 1968. V. 278. P. 971–976.
23. Тесенков В. // Иммунологические методы / Ред. Х. Фримеля. М.: Мир, 1979. С. 185–186.
24. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, N.Y.; Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989.
25. Practical Protein Chemistry. A Handbook / Ed. A. Darbre. Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore: John Wiley and Sons Ltd., 1986. P. 300–302.
26. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.
27. Schagger H., Jagow G. // Analyt. Biochem. 1987. V. 166. P. 368–379.
28. Edman P., Henschen A. // Protein Sequence Determination / Ed. S.B. Needleman. 2nd ed. Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 1975. P. 232–279.

An Artificial Protein with the Biological Activity of the Differentiation Factor for the HL-60 Cell Line of Human Promyelocyte Leukemia

R. V. Chertkova[#], I. A. Kostanyan, M. V. Astarova,
E. A. Surina, D. A. Dolgikh, and M. P. Kirpichnikov

[#] Phone: +7 (095) 335-2888, fax: +7 (095) 335-5033, e-mail: rita@nmr.ru

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

The ABB-df artificial protein was prepared by inserting TGENHR biologically active peptide corresponding to the 41–46 sequence of the differentiation factor for the HL-60 cell line of the human promyelocyte leukemia into the N-terminus of the polypeptide chain of albebetin, an artificial protein with the preset structure. The ABB-df protein was found to induce the differentiation of HL-60 cells and to inhibit their proliferation; its efficiency was almost the same as that of the starting peptide. According to CD spectroscopy, the inclusion of the peptide fragment into albebetin exerts virtually no effect on the regular secondary structure of albebetin. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2003, vol. 29, no. 1; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: albebetin, artificial proteins, HLDF-6 peptide, HLDF differentiation factor, HL-60 cell line