

МЕТОДЫ БИОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

УДК 612.1.577.617.96

© Коллектив авторов

КОНСТРУИРОВАНИЕ СИСТЕМЫ ЭКСПРЕССИИ ИНДУЦИБЕЛЬНОЙ ИЗОФОРМЫ СИНТАЗЫ ОКСИДА АЗОТА В КЛЕТКАХ *ESCHERICHIA COLI*.

Ю.В.ГЕРВАЗИЕВ*, М.А.ЭЛЬДАРОВ**, И.С. ШКУНДИНА*,
С.С. АЛЕКСАНДРОВА*, Н.В. ВОЕВОДСКАЯ***, Н.Н. СОКОЛОВ*.

*Научно-исследовательский институт биомедицинской химии РАМН, 119832,
Москва, Погодинская ул., 10; Телефон/факс (095) 245-05-09; 245-08-57;

Эл. почта: yuga@medic.ibmh.msk.su

**Центр "Биоинженерия" РАН, Москва

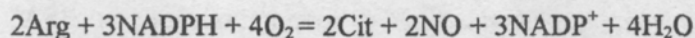
***Институт химической физики им. Н.Н. Семенова, РАН, Москва

Сообщается о разработке системы экспрессии индуцибельной изоформы синтазы оксида азота (iNOS) из макрофагов мыши в клетках *E.coli*. Для этого рамку трансляции iNOS клонировали в экспрессионный вектор pCWo1+. Поскольку для биосинтеза активной iNOS необходима коэкспрессия кальмодулина (CaM), то для получения функциональной экспрессии этого белка была проведена амплификация соответствующего участка библиотеки тотальной кДНК лягушки *Xenopus Laevis*, после чего сконструированы плазмиды для коэкспрессии кальмодулина под контролем tac и T7 промоторов. Рекомбинантная iNOS была функционально активна, о чем свидетельствуют результаты анализа СО-восстановленных спектров, детекция образования NO с помощью реакции превращения HbO₂ в metHb, а также идентификация молекулы NO методом ЭПР. Выход рекомбинантной iNOS при использовании различных конструкций составил от 10 до 22 мг/л культуральной среды, а удельная активность от 0,42 до 0,64 U/мг белка. Эти цифры совпадают с ранее опубликованными данными других авторов. Установлено, что экспрессированная нами iNOS связана с мембранной фракцией клеток, при этом в супернатанте активность фермента не обнаружена. Данные о мембранной локализации iNOS не укладываются в сложившееся представление о том, что этот фермент является растворимым.

Ключевые слова: синтаза оксида азота индуцибельная изоформа, оксид азота, кальмодулин, *Xenopus Laevis*, гетерологичная экспрессия в *E.coli*, электронный парамагнитный резонанс, оксигемоглобин.

ВВЕДЕНИЕ. Синтаза оксида азота (Nitric Oxide Synthase; NOS; EC 1.14.13.39) катализирует образование NO из L-аргинина, при этом суммарное уравнение реакции включает 5-ти электронное ($N^3 \rightarrow N^{2+}$) окисление атома азота аргинина, сопряженное с окислением NADPH [1]:

Список сокращений: ЭПР - электронный парамагнитный резонанс; HbO₂ - оксигемоглобин; metHb - метгемоглобин; NOS - синтаза оксида азота; iNOS - индуцибельная изоформа NOS; eNOS - эндотелиальная изоформа; nNOS - нейрональная



Известны три изоформы фермента [2]:

1. nNOS (Neuronal NOS), также называемый Тип 1, первоначально обнаруженный в нейрональных клетках центральной и периферической нервной системы;

2. iNOS (Inducible NOS), также известный как Тип 2 или macNOS, который, в отличие от nNOS и eNOS, не синтезируется постоянно (конститутивно); экспрессия этого фермента может быть индуцирована в разных типах клеток;

3. eNOS (Endotelial NOS), также известный как Тип 3, впервые обнаруженный в клетках эндотелия кровеносных сосудов.

Активность nNOS и eNOS (конститутивных форм NOS) регулируется ионами Ca^{2+} с участием кальмодулина (CaM). В то же время, с индуцибельной изоформой CaM связан столь прочно, что добавление Ca^{2+} не требуется для активации фермента, а регуляция активности iNOS осуществляется на уровне экспрессии белка [3].

В активном состоянии молекула NOS представляет собой гомодимер, стабилизируемый одной молекулой CaM [4]. В ходе катализа NOS использует пять различных простетических групп и кофакторов - флавинадениндинуклеотид (FAD), флавиномононуклеотид (FMN), гем (Fe-протопорфирин IX), тетрагидриобиптерин (BH_4) и CaM [1]. Шестой кофактор, ион цинка, выполняет скорее структурную функцию. Хотя многие из перечисленных кофакторов широко представлены в ферментах, катализирующих окислительно-восстановительные реакции, NOS является единственным ферментом, который одновременно использует все шесть кофакторов [5].

В направлении от N к C - концу молекулы NOS различают редуктазный домен, имеющий высокую гомологию с P450-редуктазой, и оксигеназный домен, обладающий многими характеристиками цитохрома P450, но без структурной гомологии с последним. В пределах редуктазного домена различают еще небольшой CaM-связывающий участок. Во всех изоформах NOS перенос электрона идет внутри одного белка, в отличие от P-450 редуктазной монооксигеназной системы. Такая модель строения фермента была подтверждена многочисленными исследованиями при помощи ограниченного протеолиза [4,6], экспрессии отдельных доменов фермента [7-9], изучения взаимодействия кофакторов с синтетическими пептидами [10-13], исследования свойств ферментов с точечными и делеционными мутациями [14].

Сравнение аминокислотных последовательностей NOS показало, что последовательности eNOS быка и человека идентичны на 95%, а последовательности iNOS крысы и мыши имеют 96% гомологии. Между iNOS человека и мыши различия более значительны - гомология составляет лишь 81% [15].

Надо заметить, что NOS хорошо экспрессируется практически во всех системах: в эукариотических клетках гепатоцитов [16], COS1 [17] и COS7 [18], в бакуловирусной системе [8,19,20], в дрожжах [9,21]. iNOS является единственной изоформой, которую можно экспрессировать в негетерологической системе для получения значительных количеств белка. Для этого используется культура макрофагов RAW 264.7, стимулированная бактериальными липополисахаридами и IFN- γ [22].

Первая публикация об экспрессии синтазы оксида азота в клетках *E.coli* была посвящена отдельной экспрессии оксигеназного и редуктазного домена индуцибельной изоформы фермента [7]. Экспрессию же интактного белка удалось осуществить в 1995 году [23].

В настоящей статье представлены результаты работы по конструированию системы гетерологической экспрессии iNOS в клетках *E.coli*.

МЕТОДИКА Квалификация реактивов. В работе использовали: BSA, MOPS, бромистый этидий, формамид, бромфеноловый синий, ксиленцианол, ДТТ, IPTG, δ -аминолевулинат, BH_4 , глицерин ("Sigma", США); трис-оксиметил-аминометан, MnCl_2 , акриламид, N,N -метиленисакриламид, TEMED, HEPES, PMSF, FAD, FMN, глицин, Hb ("Serva", Германия); бакто-триптон, дрожжевой экстракт ("Difco", США); MgCl_2 , MgSO_4 , ЭДТА, SDS, KCl, CaCl_2 (Merck); агароза, PSA ("Bio-Rad", США); dNTP, ddNTP, АТР ("Promega", США). Остальные реактивы отечественного производства, квалификации хч или осч.

Условия термоциклирования при введении сайта рестрикции *NdeI* в кДНК NOS с помощью мутагенеза: реакционная смесь (50 мкл) содержала 250 мкМ каждого из dNTP, 500 пкМ каждого из праймеров, 50 нг матрицы pINOS, $1 \times \text{PfuI}$ полимеразный буфер и 1 ед. *PfuI* ДНК полимеразы. Режим термоциклирования: 95°C -0,5 мин, 50°C -1 мин, 68°C -15 мин; 16 циклов (амплификатор "Циклон", Тула).

Проведение ПЦР при выделении ОРТ кальмодулина: 1 пкг библиотеки кДНК лягушки *Xenopus laevis* добавляли в смесь для ПЦР объемом 50 мкл, содержащую праймеры: 5'-CTTCTTCGCTCGCACCAT-3'

и 3'-GAAAGTTGATGAAAAGGGGGAG-5'

(250 пкМ), dNTP (200 мкМ каждого), $1 \times \text{Taq}$ -полимеразный буфер и 2,5 ед. *Taq* ДНК полимеразы. Смесь подвергали циклическому изменению температур в режиме 95°C -0,5 мин, 55°C -1 мин, 72°C -1,5 мин (30 циклов).

Индукция экспрессии iNOS. В 200 мл ТВ-среды, содержащей 100 мкг/мл ампициллина и 50 мкг/мл хлорамфеникола, добавляли 2 мл ночной бактериальной культуры и проводили инкубацию (37°C , скорость качания 250 об/мин) до $\text{OD}_{600}=0,8-1,0$. Экспрессию iNOS индуцировали добавлением IPTG до конечной концентрации 1 мМ, кроме того в среду добавляли предшественник гсма δ -аминолевулиновую кислоту до конечной концентрации 400 мкМ. Культуру выращивали при 25°C еще в течение 48 часов. В отсутствие плазмид pSAM хлорамфеникол в среду не добавляли.

Приготовление бесклеточных экстрактов iNOS. После окончания выращивания клетки собирали центрифугированием (7000 об/мин; $+4^\circ\text{C}$) и ресуспендировали в буфере (А): HEPES 20 мМ (pH 7,5), ДТТ 0,1 мМ, PMSF 200 мМ, FAD 20 мМ, FMN 20 мМ и BH_4 2 мкМ в объеме, составляющем 1/5 от объема культуральной среды. Клетки разрушали ультразвуком на дезинтеграторе MSE (Англия) в режиме 4х30 с, 20 кГц. Клеточный дебрис удаляли центрифугированием (4000 об/мин; $+4^\circ\text{C}$). Мембранную фракцию осаждали при $105\,000 \times g$ ($+4^\circ\text{C}$; 1 час), отбирали супернатант, после чего осадок ресуспендировали в равном объеме буфера А. Обе фракции подвергали дальнейшему анализу.

Исследование спектров СО-восстановленных NOS и определение выхода фермента. К супернатанту или мембранной фракции, полученным из бактериальных клеток, выращенных в 20 мл среды, добавляли 1-2 мг дитионита натрия. Смесь переносили в кювету для спектрофотометра "Hewlett Packard" (модель 8453-А). Прописывали базовую линию, после чего через смесь пропускали СО. Спустя минуту регистрировали спектр в области 400-600 нм. Файлы, содержащие экспериментальные данные, переводили в формат MS Excel, где проводили статистическую обработку и построение диаграмм.

Определение активности iNOS. Приготовление раствора HbO_2 : 25 мг Hb растворяли в 1 мл буфера, содержащего 20 мМ HEPES (pH 7,5) и 0,1 мМ ДТТ. К раствору добавляли 1-2 мг дитионита натрия, переносили в центрифужную пробирку объемом 45 мл и пропускали в течение 5 мин интенсивный ток воздуха. Раствор обессоливали на колонке с Sephadex G-25 ("Pharmacia"), предварительно насыщенной буфером для растворения Hb. После этих процедур пик поглощения Hb наблюдали при длине волны 413 нм.

В каждом анализе использовали супернатант или мембранную фракцию, выделенные из клеточного материала, соответствующего 20 мл культуральной

среды. Раствор HbO_2 добавляли в реакционную смесь до конечной концентрации 20 мкМ и смесь переносили в кювету для спектрофотометра "Hewlett Packard". Прописывали базовую линию, после чего добавляли растворы NADPH и L-аргинина до конечной концентрации 1 мМ. Далее регистрировали изменение оптического поглощения на трех длинах волн - 401 нм, 411 нм и 421 нм при 37°C. Файлы, содержащие экспериментальные данные, переводили в формат MS Excel, где проводили статистическую обработку и построение диаграмм.

Детекция NO методом ЭПР. В каждом анализе использовали супернатант или мембранную фракцию, выделенные из клеточного материала, соответствующего 2 мл культуральной среды. В реакционную смесь добавляли L-аргинин и NADPH до конечной концентрации 1 мМ. Реакцию вели в течение 30 мин при 37°C, после чего в смесь вносили диэтилкарбамат (ДЭТК) в мембранную фракцию или N-метил-D-глутамилдитиокарбамат (МГД) в супернатант. Реакционные смеси замораживали в жидком азоте. ЭПР спектры регистрировали на радиоспектрометре "Радиопан" (Польша).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Конструирование вектора экспрессии для *iNOS* (рис.1). Исходным материалом для создания системы экспрессии *iNOS* являлась кДНК индуцибельной изоформы синтазы оксида азота из макрофагов мыши, клонированная в векторе pBlueScript (вся эта конструкция получила условное название *piNOS*). В качестве экспрессионного вектора для NOS была выбрана плазмида, получившая название *pCWori+*. Эта плазмида, производная плазмиды *pHSE5*, содержит кассету из двух *tac* промоторов к началу от сайта рестрикции *NdeI*. Данный сайт должен совпадать с инициаторным ATG кодоном экспрессируемого белка. Вектор также содержит сильный терминатор транскрипции *trpA*, точку начала репликации фага M13 и *lacI^q* ген, кодирующий молекулу *Lac* репрессора, который предотвращает транскрипцию с *tac* промоторов без добавления индукторов. Показано, что в этой плазмиде очень эффективно экспрессируются гем-содержащие белки, в частности, цитохром P450. Сайт рестрикции *NdeI* был введен перед первым ATG кодоном кДНК NOS с помощью мутагенеза, который проводили термоциклированием пары олигонуклеотидов

GGCAAGCCATATGTGAGACTTTGCACT и комплементарного ему
CCGTTTCGGTATACACTCTGAAACGTGA (выделены точки замен) с плазмидой

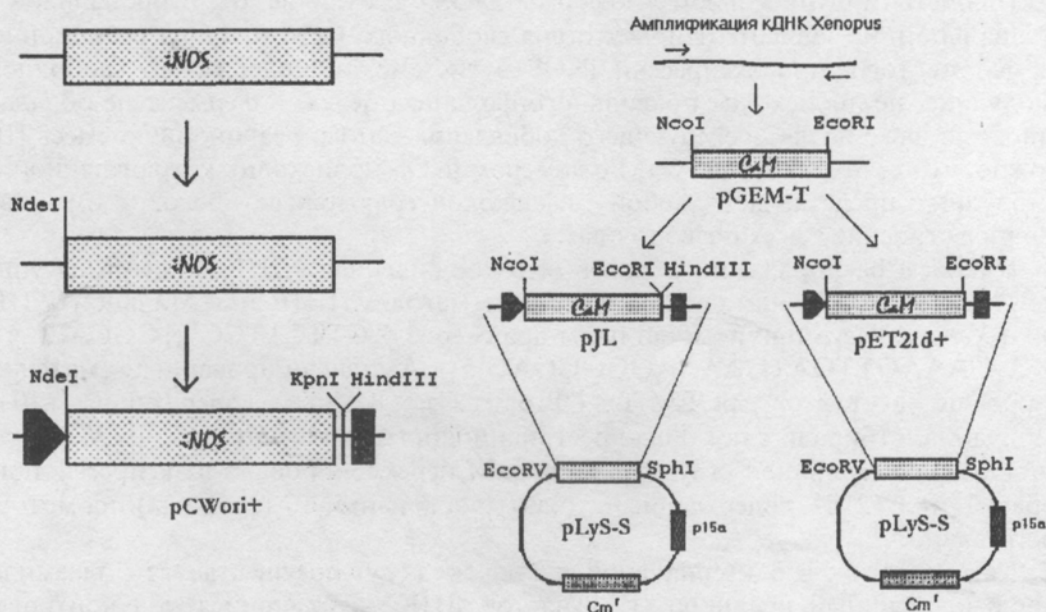


Рисунок 1.

Схема конструирования системы экспрессии в клетках *E. coli* функционально активной NOS.

pBlueScript, содержащей ген iNOS. После этого материал обрабатывали рестриктазой *DpnI* для гидролиза исходной матрицы и трансформировали в компетентные клетки *E. coli* JM-109. Отбирали содержащие сайт рестрикции *NdeI* клоны, кДНК iNOS вырезали из плазмиды piNOS по сайтам *NdeI*-*KpnI*_{тип} и лигировали в плазмиду pCW по сайтам *NdeI*-*HindIII*_{тип}.

После проведения индукции IPTG в лизатах из клеток *E. coli* при электрофорезе в SDS-ПААГ обнаружена полоса, соответствующая по подвижности белку с молекулярной массой 130 кДа (рис. 2). Такой результат позволил нам сделать вывод о том, что достигнута экспрессия целевого белка.

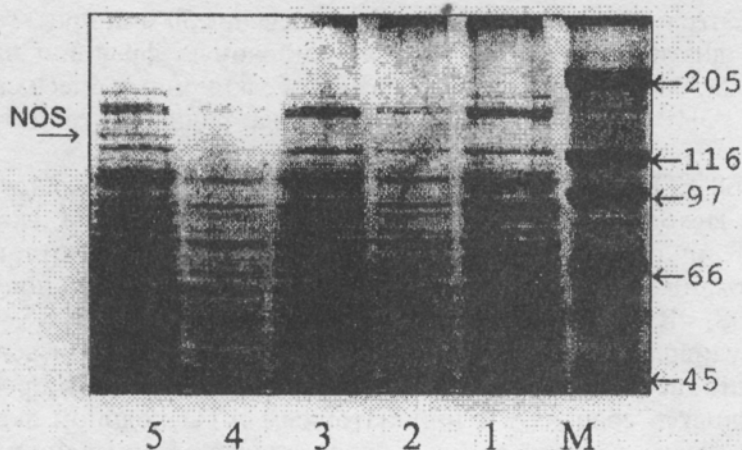


Рисунок 2.

Электрофорез в SDS-ПААГ (7,5% гель) рекомбинантной iNOS (окрашивание кумасси).

1 - лизат клеток без индукции; 2 - инкубация 12 час после индукции IPTG (25°C); 3 - инкубация 24 час после индукции IPTG (25°C); 4 - отрицательный контроль (клетки, трансформированные pCWori+ без вставки iNOS); 5 - Инкубация 48 часов после индукции IPTG (25°C).

Конструирование системы коэкспрессии кальмодулина. Следующий этап работы состоял в создании системы коэкспрессии CaM в клетках *E. coli*. Известно, что активность индуцибельной изоформы NOS, в отличие от нейрональной и эндотелиальной, не зависит от присутствия свободного CaM и Ca^{2+} в реакционной смеси. Кроме того, при экспрессии iNOS в системе, не содержащей свободного кальмодулина, не происходит правильного фолдинга белка, и фермент не обладает активностью даже после последующего добавления CaM в реакционную смесь [10]. Возможно, что взаимодействие CaM с димером iNOS происходит котрансляционно. Кальмодулин представляет собой высококонсервативный белок, имеющий идентичное строение у всех позвоночных.

В нашем распоряжении имелась высокоочищенная кДНК ооцитов лягушки *Xenopus Laevis*. ОРТ кальмодулина выделяли методом ПЦР из тотальной кДНК лягушки *Xenopus laevis* при помощи пары праймеров 5'-СТТСТТСТГСТГСТГСТГСТГСТГ-3' и 3'-GAAAGTTGATGAAAAGGGGGAG-5'. Амплифицированный материал клонировали в вектор pGEM-T ("Promega"). Клоны, содержащие кДНК кальмодулина, отбирали с помощью рестрикционного анализа по сайтам *NcoI*-*KpnI*. После проверки первичной структуры ген CaM переклонировали в экспрессионные вектора pJL и pET21d+, содержащие *tac* (бактериальный) и T7 (фаговый) промоторы соответственно.

Как известно, в бактериальной клетке не могут сосуществовать плазмиды, имеющие идентичный репликон (т.е. участок ДНК, находящийся под контролем одной точки репликации). Поэтому было необходимо переклонировать кассету экспрессии в плазмиду pLYS-S, имеющую репликон p15A и ген устойчивости к

хлорамфениколу (Cam) (см. рис. 1). Полученным в результате конструирования были даны следующие условные названия: pCAM-JL - плазмида, содержащая вектор pLYS-S, устойчивый к Cam, фрагмент вектора pJL и ген CaM; pCAM-ET - плазмида, содержащая вектор pLYS-S, устойчивый к Cam, фрагмент вектора pET и ген CaM.

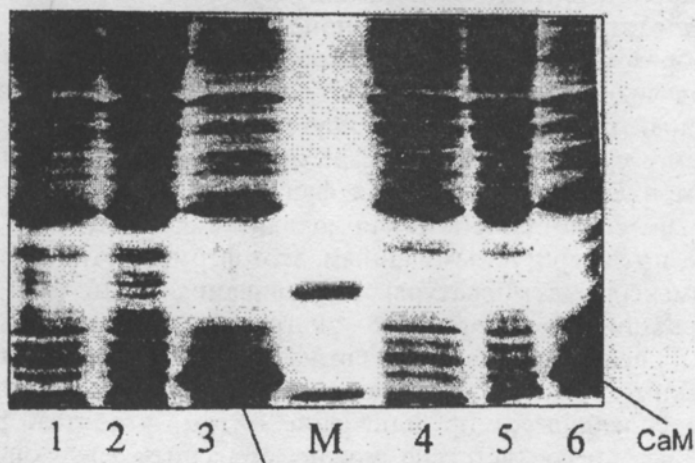


Рисунок 3.

Электрофорез в SDS-ПААГ (12%-ный гель) рекомбинантного CaM в векторе pET21d+ и бактериальном штамме BL-21. 1,4 - плазмиды без вставки после индукции IPTG; 2,5 - плазмиды с кДНК кальмодулина без индукции IPTG; 3,6 - плазмиды с кДНК кальмодулина после индукции IPTG; 1-3 - 6 часов инкубации; 4-6 - 9 часов инкубации; М - белковые маркеры 20 и 14 кДа.

Для экспрессии iNOS использовали штаммы JM-109 и BL-21 DE, дефицитный по протеазе. Были исследованы генетические конструкции: JM-109 [pCW-NOS pCAM-JL], BL-21 [pCW-NOS pCAM-JL] и BL-21[pCW-NOS pCAM-ET]. Как следует из электрофореграммы (рис. 3), в клетках *E.coli* экспрессируется белок, соответствующий по молекулярной массе (17 кДа) кальмодулину.

Следует отметить, что при определении нуклеотидной последовательности амплифицированного и клонированного в векторе pGEM-T материала, в одном из клонов оказалось 18, а в другом 22 нуклеотидные замены, по сравнению с опубликованной в литературе последовательностью кДНК кальмодулина, причем в первом клоне они не приводили к аминокислотным заменам, а во втором произошла замена трех аминокислот. Можно предположить, что эти нуклеотидные замены являются результатом либо ошибки Taq-полимеразы в реакции амплификации ДНК, либо того, что в ооцитах лягушки *Xenopus Laevis* нами найден новый ген, кодирующий CaM. Выяснение этого вопроса представляется интересной темой отдельного исследования.

Анализ спектров СО-восстановленной iNOS и оценка выхода фермента. Синтаза оксида азота, как и другие гем-содержащие ферменты, обладает специфическими спектральными характеристиками. При пропускании тока СО через раствор восстановленных цитохромов дыхательной цепи, миоглобина и гемоглобина в их спектрах поглощения определяется ярко выраженная полоса Sore при 420 нм, а также полосы поглощения α (570-580 нм) и β (540 нм). У цитохромов P450, так же как и у NOS, полоса Sore находится в области 446-448 нм (собственно поэтому цитохромы P-450 и получили свое название). Учитывая вышеизложенное, мы провели сравнение спектров СО-восстановленных гемопротеинов в 105 000×g - супернатанте и мембранной фракции, выделенных из клеток сконструированных штаммов-продуцентов iNOS.

Как видно из рис. 4 (кривые 1 и 2), в мембранных фракциях из клеток продуцентов наблюдается полоса поглощения при 419 нм, характерная для

цитохромов дыхательной цепи. Типичный для iNOS спектр с полосой поглощения при 448 нм регистрируется лишь в мембранной фракции и только при коэкспрессии CaM (кривая 1).

В спектрах мембранной фракции, выделенной из всех трех продуцентов iNOS, наблюдаются полосы поглощения при 419 и 448 нм, характерные соответственно для цитохромов дыхательной цепи и NOS (рис. 5).

Таким образом, результаты опытов, представленные на рис. 4 и 5, с достаточной очевидностью показывают, что спектр СО-восстановленного гемопротейна, характерный для NOS, присутствует только в мембранных фракциях клеток, тогда как в супернатанте он не регистрируется. Следовательно, в клетках всех трех штаммов *E.coli* - продуцентах функционально активной iNOS фермент оказался связанным с мембраной. Такая локализация не является характерной для iNOS, поскольку, по литературным данным, этот фермент относится к растворимым белкам [5]. Изменение температуры выращивания с 16 до 37°C, осаждение мембранной фракции из клеточного экстракта высокосолевыми растворами ((NH₄)₂SO₄ до 20% вес/объем) не повлияли на мембранную локализацию фермента. Полученные таким образом данные о мембранной локализации iNOS не укладываются в сложившееся представление о том, что этот фермент является растворимым. Такое несоответствие можно объяснить следующими причинами: либо белок мог встроиться в мембрану в результате несанкционированной мутации гена, либо он способен специфически взаимодействовать с каким-либо мембраносвязанным белком. Интересно, что локализованный в мембране фермент обладает специфической активностью.

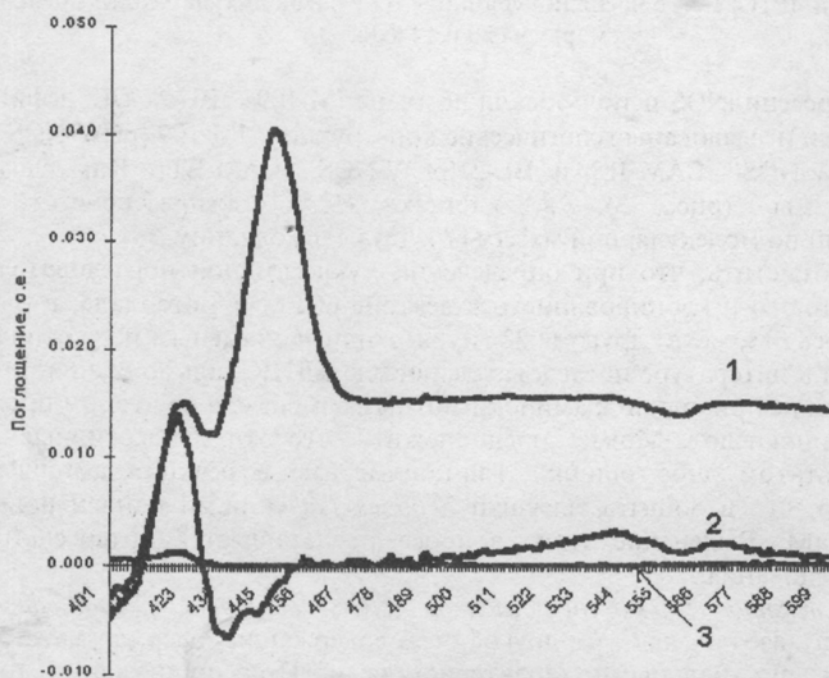


Рисунок 4.

Спектры СО-восстановленных гемопротейнов в препаратах клеток *E.coli*.

1 - JM-109 [pCW-NOS pCAM-JL], мембранная фракция; 2 - JM-109 [pCW-NOS] (без pCAM), мембранная фракция; 3 - JM-109 [pCW-NOS pCAM-JL], супернатант.

Для iNOS, экспрессированной в культуре клеток почки человека # 293, определен молярный коэффициент экстинкции, составляющий 74 мМ⁻¹ см⁻¹ при 448 нм [24]. Таким образом на основе спектроскопических данных нами был рассчитан выход белка iNOS.

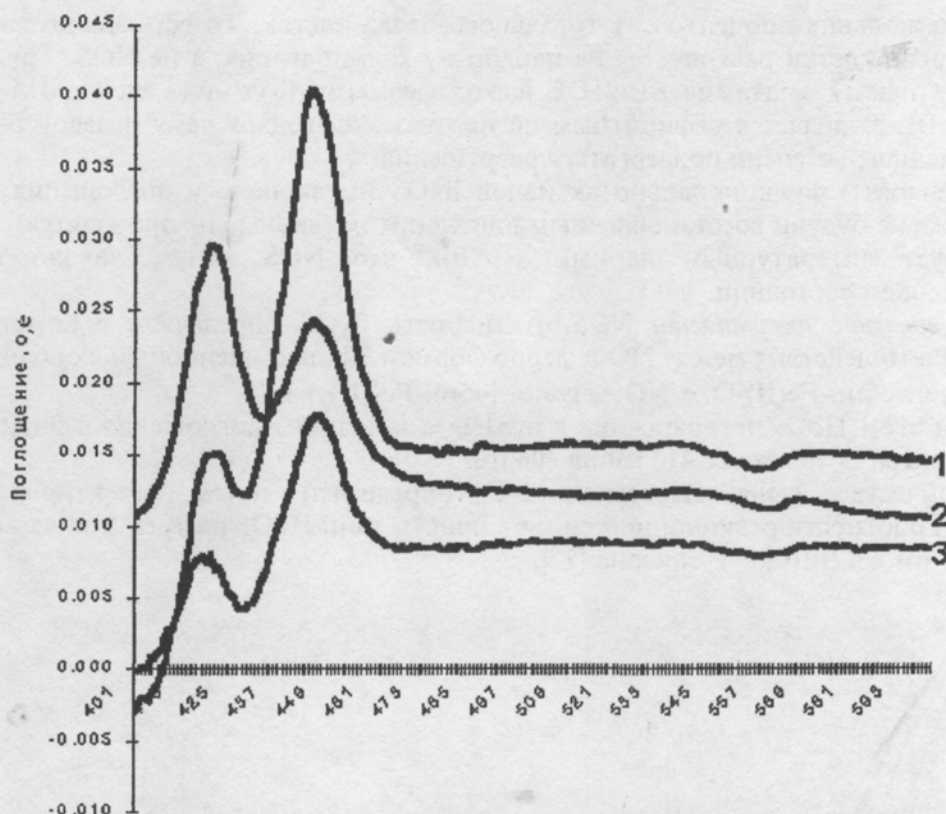


Рисунок 5.

Спектры СО-восстановленных гемопротеинов в препаратах мембранной фракции клеток *E. coli*, продуцирующих NO-синтазу. 1 - JM-109 [pCW-NOS pCAM-JL]; 2 - BL-21 [pCW-NOS pCAM-JL]; 3 - BL-21 [pCW-NOS pCAM-ET].

Таблица 1. Оценка эффективности экспрессии различных продуцентов iNOS.

Препарат	Пик поглощения 448 нм, о.е.	Молярная концентрация фермента в реакционной смеси, мкМ	Весовая концентрация фермента в реакционной смеси, мкг/мл	Выход iNOS (мг /литр культуры)
JM-109 [pCW-NOS pCAM-JL]	0,040	0,54	150	22
BL-21 [pCW-NOS pCAM-JL]	0,025	0,34	94	14
BL-21 [pCW-NOS pCAM-ET]	0,018	0,24	66	10

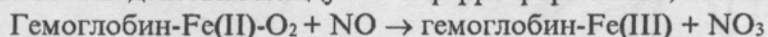
Примечание: Реакционная смесь (3 мл) содержала мембранную фракцию клеток, выделенную из 20 мл культуры. Молярную концентрацию фермента (мкМ) определяли по формуле: $M_{pc} = D / \epsilon$, где D - оптическое поглощение препарата NOS при 448 нм (о.е.), ϵ - молярный коэффициент экстинкции, равный $74 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [24]. Длина кюветы 1 см. Весовую концентрацию фермента в смеси (мкг/мл) определяли по формуле: $m_{pc} = M_{pc} \times 277 \text{ кДа}$, где 277 кДа - молекулярная масса димера iNOS. Весовую концентрацию фермента в культуре клеток (мг/л) рассчитывали по формуле: $m_{kk} = m_{pc} \times 3 \text{ мл} / 20 \text{ мл} = m_{pc} \times 0,15$, где 3 мл - объем реакционной смеси, 20 мл - объем культуры клеток, используемых в одном анализе.

Все три штамма-продуцента незначительно отличались по эффективности экспрессии iNOS. Максимальный выход фермента наблюдался при использовании конструкции JM-109 [pCW-NOS pCAM-JL] (около 22 мг/л). В конструкциях BL-21 [pCW-NOS pCAM-JL] и BL-21 [pCW-NOS pCAM-ET] выход был ниже. Что касается последней конструкции (BL-21 [pCW-NOS pCAM-ET]), то более низкой продукции iNOS можно найти логическое объяснение. Ген CaM был заклонирован под мощным фаговым промотором T7, который способен обеспечить выход целевого

белка до нескольких процентов от тотального белка клеток. То есть значительная часть ресурсов клетки расходуется на наработку кальмодулина, а не NOS. Труднее объяснить, почему в штамме BL-21DE выход фермента был ниже, чем в JM-109, поскольку BL-21 является дефицитным по протеазе, благодаря чему целевой белок должен в меньшей степени подвергаться разрушению.

Препараты функционально активной iNOS имели полосу поглощения при 448 нм, даже не будучи восстановленными дитионитом (данные не приводятся). Это соответствует литературным данным о том, что NOS всегда находится в высокоспиновом состоянии.

Определение активности NOS. Активность iNOS определяли с помощью прямого взаимодействия между NO и ферро формой Hb, насыщенной кислородом.



При этом HbO₂ превращается в metHb, а максимум поглощения в видимой области спектра смещается с 413 нм на 406 нм.

Количество вырабатываемого NO определяли путем детектирования оптической плотности реакционной смеси в присутствии HbO₂ на трех длинах волн: 401 нм, 411 нм и 421 нм, как описано [25].

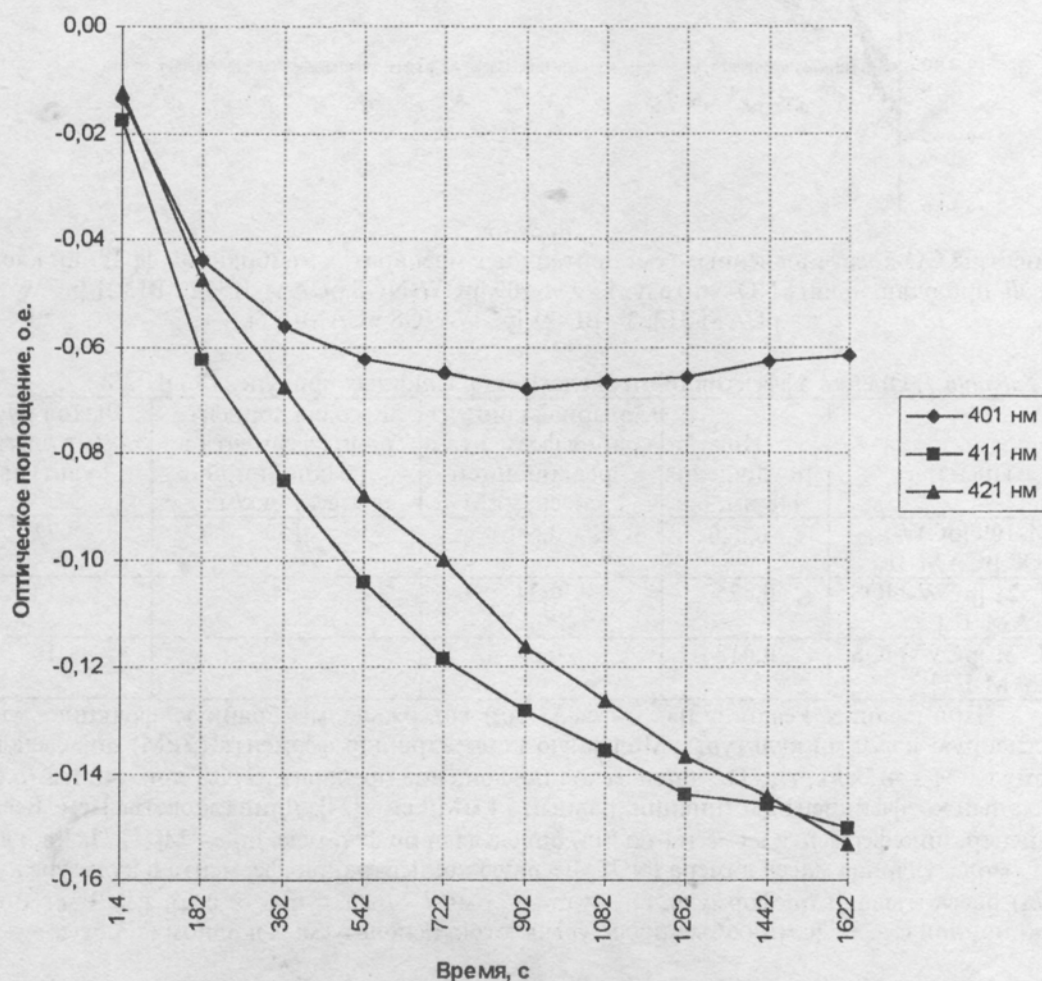


Рисунок 6.

Кинетика изменения оптического поглощения при трех длинах волн мембранной фракции из клеток JM-109 [pCW-NOS pCAM-JL] в присутствии HbO₂ и субстратов.

Как следует из рис. 6, при инкубации мембранной фракции из штамма JM-109 [pCW-NOS pCAM-JL] в присутствии субстратов (L-Arg и NADPH) и HbO₂

относительно длины волны 411 нм (изобетическая точка в процессе превращения HbO_2 в metHb) увеличивается поглощение при длине волны 401 нм и уменьшается при 421 нм, что совпадает с данными литературы. Такая же картина наблюдалась и в препаратах BL-21 [pCW-NOS pCAM-JL] и BL-21 [pCW-NOS pCAM-ET].

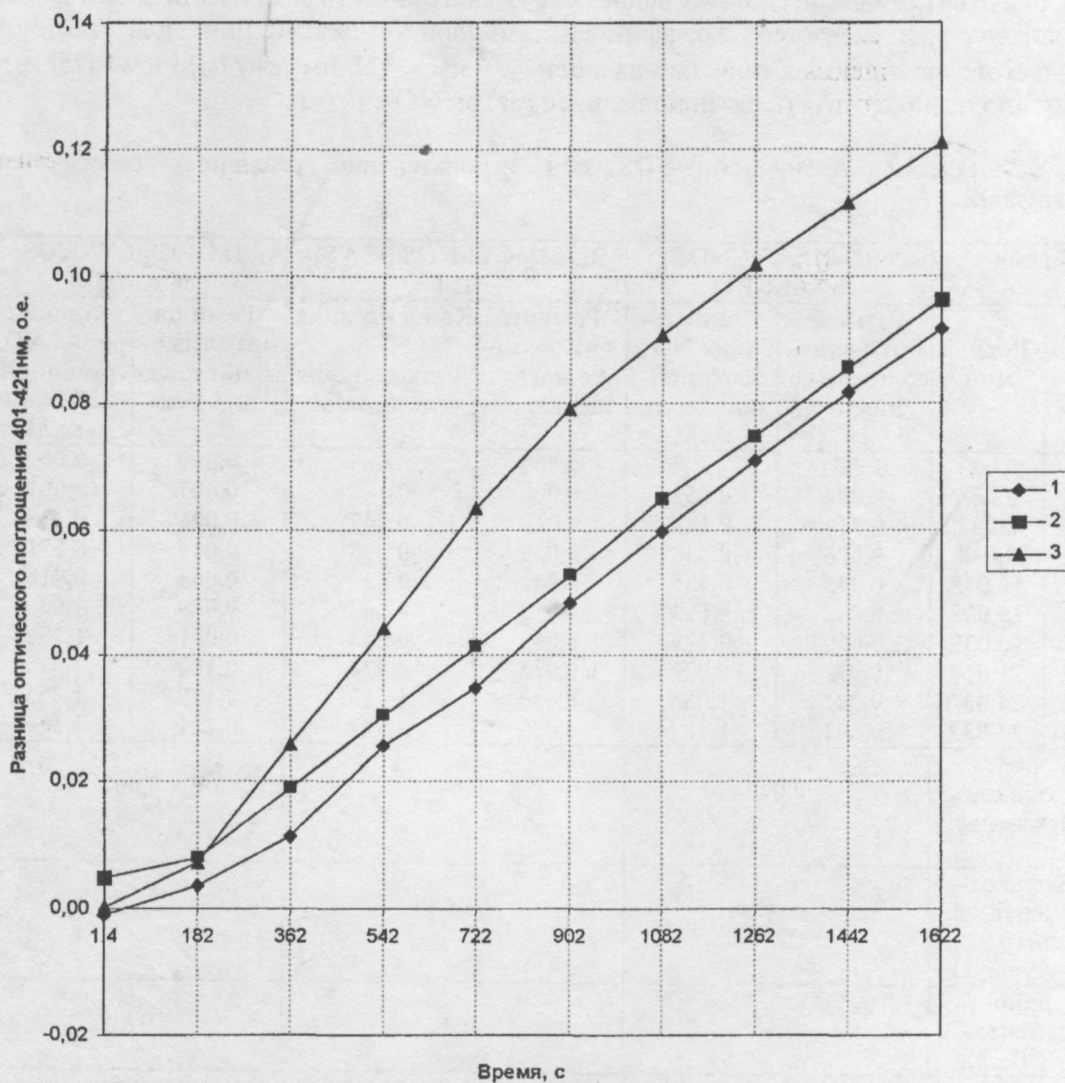


Рисунок 7.

Кинетика изменения разницы оптического поглощения мембранных фракций препарата iNOS в присутствии субстратов и HbO_2 . 1 - BL-21 [pCW-NOS pCAM-ET]; 2 - BL-21 [pCW-NOS pCAM-JL]; 3 - JM-109 [pCW-NOS pCAM-JL].

Были поставлены отрицательные контроли: реакционная смесь (JM-109 [pCW-NOS pCAM-JL] в присутствии субстратов) без оксигемоглобина, а также $105000 \times g$ - супернатант в реакционном буфере с HbO_2 . Следует отметить, что в обоих случаях происходит изменение оптического поглощения при трех длинах волн, причем не изменяются относительные показатели поглощения (т.е. линии, соответствующие трем длинам волн, идут параллельно друг другу) (не показано).

Кинетические параметры реакции оценивали по изменению разницы оптического поглощения между двумя длинами волн - 401 нм и 421 нм, как рекомендовано в работе [25]. Предварительно проводили титрование препарата NO-синтазы, т.е. определяли интервал концентраций клеточного материала, при котором скорость образования NO была бы пропорциональна концентрации препарата в пробе. Установлено, что оптимальное количество клеточного лизата,

необходимого для образования NO, присутствует в мембранной фракции, полученной из 20 мл культуральной среды. На рис. 7 представлена кинетика изменения разницы оптического поглощения в мембранных фракциях NO-синтазы, выделенных из трех штаммов - продуцентов.

Можно заметить, что активность iNOS в лизатах из клеток JM-109 [p CW-NOS pCAM-JL] была несколько выше, чем в клеточных лизатах из штамма BL-21. Из литературы известен коэффициент молярной экстинкции для разницы оптического поглощения при длинах волн 401 нм - 421 нм: $\epsilon = 77 \text{ ММ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [25], что позволило нам рассчитать активность препаратов NO-синтазы.

Таблица 2. Активность NOS при использовании различных генетических конструкций.

Время		BL-21[pCW-NOS pCAM-ET]		BL-21[pCW-NOS pCAM-JL]		JM-109[pCW-NOS pCAM-JL]	
Время, с	Время, мин	Разница оптического поглощения, о.е.	Концентрация NO в реакционной смеси, мкМ	Разница оптического поглощения, о.е.	Концентрация NO в реакционной смеси, мкМ	Разница оптического поглощения, о.е.	Концентрация NO в реакционной смеси, мкМ
1,4	0,023	-0,001	-0,013	0,005	0,065	0,000	0,000
182	3,033	0,004	0,052	0,008	0,104	0,007	0,091
362	6,033	0,011	0,143	0,019	0,247	0,026	0,338
542	9,033	0,026	0,338	0,030	0,390	0,044	0,571
722	12,033	0,035	0,455	0,041	0,532	0,063	0,818
902	15,033	0,048	0,623	0,053	0,668	0,079	1,026
1082	18,032	0,060	0,779	0,065	0,844	0,091	1,182
1262	21,032	0,071	0,922	0,075	0,974	0,102	1,325
1442	24,032	0,082	1,065	0,086	1,117	0,112	1,455
1622	27,032	0,091	1,182	0,096	1,247	0,121	1,571
Скорость образования NO, мкмоль (U)		0,043		0,046		0,062	
Активность фермента на литр культуры, U		6,40		6,90		9,29	
Активность фермента, U/мг белка		0,64		0,49		0,42	

Примечание: Реакционная смесь (3 мл) содержала мембранную фракцию клеток, выделенную из 20 мл культуры. Концентрацию NO в реакционной смеси (мкМ) определяли по формуле: $C_{NO} = D / \epsilon \times 1000$, где D - разность оптического поглощения при длинах волн 401-421 нм (о.е.), ϵ - молярный коэффициент экстинкции ($77 \text{ ММ}^{-1} \text{ см}^{-1}$) [25], длина кюветы - 1 см. Скорость образования NO в стандартных единицах активности U (мкМ/мин) [26] определяли как коэффициент линейной регрессии зависимости концентрации NO в реакционной смеси (мкМ) от времени (мин) с использованием специальной функции программы MS Excel. Активность фермента в пересчете на литр культуры клеток определяли по формуле: $U_{\text{кк}} = U_{\text{рс}} \times 3 \text{ мл} / 0,02 \text{ л} = U_{\text{рс}} \times 150$, где $U_{\text{рс}}$ - активность фермента (скорость образования NO) в реакционной смеси, U; 3 мл - объем реакционной смеси; 0,02 л - объем культуры клеток, используемых в одном анализе. Активность фермента на единицу массы белка определяли по формуле: $U_{\text{мг}} = U_{\text{кк}} / m_{\text{кк}}$, где $m_{\text{кк}}$ - масса фермента в 1 литре культуры (мг/л).

По данным, Wu и соавт. [27] выход активного белка iNOS составлял около 20 мг на литр культуры, удельная активность же фермента варьировала от 0,7 до 1,2 U/мг белка. В работе Fossetta с соавт. [28] накопление NOS в клетках составило 6-8 мг на литр культуры, а удельная активность - 0,6 U/мг белка (в пересчете на

стандартные единицы активности). Наши данные достаточно близки к приведенным выше результатам: максимальный выход целевого белка составил около 22 мг на литр культуры, а удельная активность iNOS варьировала от 0,42 до 0,64 U/мг белка. Таким образом, выход и удельная активность iNOS в наших экспериментах примерно соответствовали ранее описанным в литературе результатам.

Для доказательства того, что изменения оптического поглощения гемоглобина вызваны исключительно присутствием NO в реакционной смеси, а не какими-либо иными причинами, были поставлены дополнительные отрицательные контроли: препарат iNOS из клеток JM-109 [pCW-NOS pCAM-JL] в присутствии HbO₂ и ингибитора (0,1 мМ N^G-нитро-L-аргинина), HbO₂ в реакционном буфере в отсутствии клеточных экстрактов, препарат JM-109 [pCW-NOS pCAM-JL] с HbO₂, но без субстратов. Выявлено достоверное различие в изменении разницы оптического поглощения между положительным и отрицательным контролями (рис. 8).

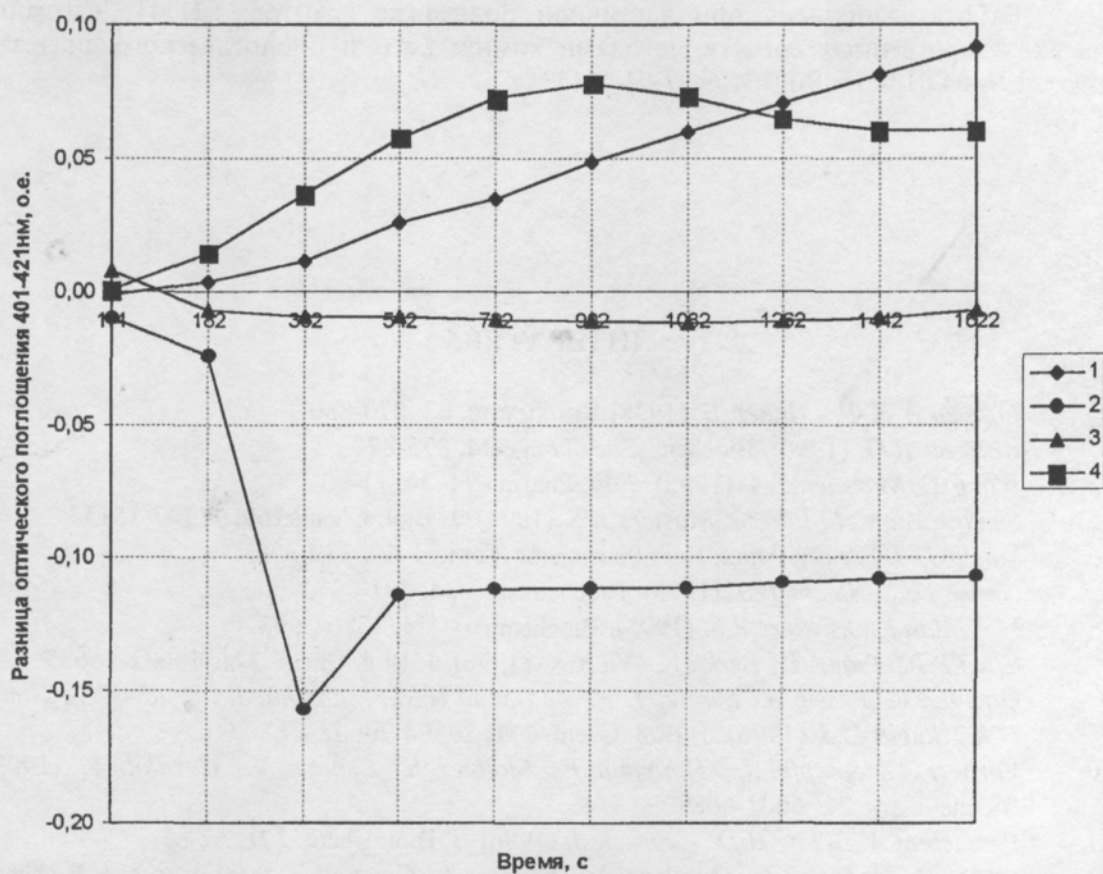


Рисунок 8.

Кинетика изменения разницы оптического поглощения препаратов NO-синтазы. 1 - JM-109 [pCW-NOS pCAM-JL] в присутствии HbO₂ и субстратов; 2 - JM-109 [pCW-NOS pCAM-JL] в присутствии HbO₂, субстратов и 0,1 М N^G-нитро-L-аргинина; 3 - Реакционный буфер с субстратами и HbO₂; 4 - JM-109 [pCW-NOS pCAM-JL] в присутствии HbO₂, но без субстратов.

Детекция NO методом ЭПР. Дополнительным подтверждением интенсивного образования оксида азота сконструированными нами штаммами-продуцентами служат ЭПР-исследования препаратов мембранной и растворимой фракций. В настоящее время для обнаружения оксида азота в биологических препаратах широко используются комплексы двухвалентного железа с диэтилдитиокарбаматом (ДЭТК) или N-метил-D-глутамилдитиокарбаматом (МГД) как избирательные ловушки NO [29]. Связывая NO, эти соединения образуют парамагнитные динитрозильные комплексы - МНКЖ-ДЭТК или МНКЖ-МГД,

растворимые соответственно в гидрофобной и гидрофильной фазах клеток и тканей. Оба комплекса характеризуются одинаковым сигналом ЭПР с $g = 2,035$, $g = 2,02$ и триплетной сверхтонкой структурой (СТС). Сигнал ЭПР, соответствующий комплексу оксида азота, обнаружен лишь в мембранной фракции препаратов NO-синтазы. Не был найден характерный спектр ЭПР для комплексов МНКЭ-МГД в $105\ 000 \times g$ - супернатантах из клеток - продуцентов NO-синтазы, в препаратах, не содержащих кальмодулин, а также при добавлении в реакционную смесь ингибитора - N^G -нитро-L-аргинина.

Таким образом, экспрессия функционально активной NO-синтазы сконструированными нами штаммами - продуцентами *E. coli* подтверждается рядом независимых методов: анализом спектров CO -восстановленных гемопротеинов, детекцией образования NO с помощью реакции превращения HbO_2 в metHb а также идентификацией молекулы NO с помощью ЭПР.

Работа выполнена при частичной поддержке грантов: ГНТП "Создание новых лекарственных средств методами химического и биологического синтеза", (проект № 04.01.05) и РФФИ №97-04-49133.

ЛИТЕРАТУРА

1. Горпен А.К.Ф., Майер Б. (1998) Биохимия. **63**, 870-880.
2. Knowles R.G. (1996). Biochem. Soc. Trans. **24**, 875-878.
3. Wang Y., Marsden P.A. (1995). Adv. Pharmacol. **34**, 71-90.
4. Sheta E.A., McMillan K., Masters B.S. (1994). J. Biol. Chem. **269**, 15147-15153.
5. Stuehr D.J. (1997). Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. **37**, 339-359.
6. Ghosh D.K., Stuehr D.J. (1995). Biochemistry. **34**, 801-807.
7. McMillan K., Masters B.S. (1995). Biochemistry. **34**, 3686-3693.
8. Chen P.F., Tsai A.L., Berka V., Wu K.K. (1996). J. Biol. Chem. **271**, 14631-14635.
9. Gachhui R., Presta A., Bentley D.F., Abu-Soud H.M., McArthur R., Brudvig G., Ghosh D.K., Stuehr D.J. (1996). J. Biol. Chem. **271**, 20594-20602.
10. Vorherr T., Knopfel L., Hofmann F., Mollner S., Pfeuffer T., Carafoli E. (1993). Biochemistry. **32**, 6081-6088.
11. Persechini A., White H.D., Gansz K.J. (1996). J. Biol. Chem. **271**, 62-67.
12. Anagli J., Hofmann F., Quadroni M., Vorherr T., Carafoli E. (1995). Eur. J. Biochem. **233**, 701-708.
13. Zoche M., Bienert M., Beyermann M., Koch K.W. (1996). Biochemistry. **35**, 8742-8747.
14. Xie Q.W., Cho H., Kashiwabara Y., Baum M., Weidner J.R., Elliston K., Mumford R., Nathan C. (1994). J. Biol. Chem. **269**, 28500-28505.
15. Sessa W.C. (1994). J. Vasc. Res. **31**, 131-143.
16. Geller D.A., Lowenstein C.J., Shapiro R.A., Nussler A.K., Di Silvio M., Wang S.C., Nakayama D.K., Simmons R.L., Snyder S.H., Billiar T.R. (1993). Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **90**, 3491-3495.
17. Adachi H., Iida S., Oguchi S., Ohshima H., Suzuki H., Nagasaki K., Kawasaki H., Sugimura T., Esumi H. (1993). Eur. J. Biochem. **217**, 37-43.
18. Lee C.M., Robinson L.J., Michel T. (1995). J. Biol. Chem. **270**, 27403-27406.
19. Busconi L., Michel T. (1995). Mol. Pharmacol. **47**, 655-659.

20. Charles I.G., Chubb A., Gill R., Clare J., Lowe P.N., Holmes L.S., Page M., Keeling J.G., Moncada S., Riveros-Moreno V. (1993). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **196**, 1481-1489.
21. Sari M.A., Booker S., Jaouen M., Vadon S., Boucher J.I., Pompon D., Mansuy D. (1996). *Biochemistry.* **35**, 7204-7213.
22. Lyons C.R., Orloff G.J., Cunningham J.M. (1992). *J. Biol. Chem.* **267**, 6370-6374.
23. Gerber N.C., Ortiz de Montellano P.R. (1995). *J. Biol. Chem.* **270**, 17791-17796.
24. Stuehr D.J., Ikeda-Saito M. (1992). *J. Biol. Chem.* **267**, 20547-20550.
25. Murphy M.E., Noack E. (1994). *Methods. Enzymol.* **233**, 240-250.
26. З. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика. М. Мир. 1991. стр 477.
27. Wu C., Zhang J., Abu-Soud H., Ghosh D.K., Stuehr D.J. (1996). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **222**, 439-444.
28. Fossetta J.D., Niu X.D., Lunn C.A., Zavodny P.J., Narula S.K., Lundell D. (1996). *FEBS. Lett.* **379**, 135-138.
29. Kubrina L.N., Caldwell W.S., Mordvintsev P.I., Malenkova I.V., Vanin A.F. (1992). *Biochim. Biophys. Acta.* **1099**, 233-237.

Поступила 18. 06. 99.

CONSTRUCTION THE EXPRESSION SYSTEM OF MOUSE INDUCIBLE NITRIC OXIDE SYNTHASE IN ESCHERICHIA COLI

Yu.V.GERVAZIEV*, M.A.ELDAROV**, I.S.SHKUNDINA*, A.A.ALEXANDROVA*,
M.V.VOEVOVSKAYA***, N.N.SOKOLOV*.

*Institute of Biomedical Chemistry RAMS, Pogodinskaya str. 10, 119832 Moscow; fax: (095) 245-0857;
e-mail: yura@medic.ibmh.msk.su

**Centre "Bioengineering", RAS

***Institute of Physical Chemistry, RAS

In the present work we describe the construction of expression system for inducible murine macrophage nitric oxide synthase (iNOS) in *E.coli*. For this purpose a framework of translation iNOS was cloned in the expression vector pCWori +. As biosynthesis of active iNOS requires coexpression of calmodulin (CaM), for obtaining functional expression of this protein we conducted amplification of an appropriate site of the library total cDNA a frog *Xenopus laevis*, then plasmids for coexpression of calmodulin were constructed under a control tac and T7 promoters. Recombinant iNOS was functionally active as revealed by the analysis of CO-reduced spectrums, detection of derivation NO with the help of reaction conversion HbO₂ in metHb, and also identification of a molecule NO by EPR method. The output of recombinant iNOS at usage of different constructions varied from 10 up to 22 mg/l culture, and specific activity was from 0,42 up to 0,64 U/mg of protein. These data coincide with the earlier published results of other investigators. It was established, that the expressed iNOS is associated to a membrane fraction of cells, thus in the 105 000 g-supernatant the activity of an enzyme is not detected. The data on membrane localization iNOS are inconsistent with general notion this enzyme is soluble.

Key words: nitric oxide synthase inducible isoform, nitric oxide, calmodulin, *Xenopus Laevis*, heterologous expression in *E.coli*, electron paramagnetic resonance, oxyhemoglobin.