

УДК 577.217.5:577.152.611

## СТАБІЛЬНІСТЬ СТРУКТУРИ ЦИТОКІНА ЕМАР II ПРИ ПІДВИЩЕННІ ТЕМПЕРАТУРИ

А. Малина<sup>1,2\*</sup>, О. Козлов<sup>1</sup>, С. Левченко<sup>1</sup>, О. Корнелюк<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Інститут молекулярної біології і генетики НАН України  
вул. Академіка Заболотного, 150, Київ 03143, Україна

<sup>2</sup>Інститут високих технологій, КНУ імені Тараса Шевченка  
вул. Академіка Глушкова, 4-г, Київ 03022, Україна  
e-mail: malinaalona@gmail.com

Метою роботи було дослідження впливу підвищення температури на стабільність структури протипухлинного цитокіна ЕМАР II за допомогою флуоресцентної спектроскопії. Білок експресували в клітинах *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysE й очищали, використовуючи метал-хелатуючу хроматографію. Спектри флуоресценції цитокіна ЕМАР II реєстрували при довжині хвилі збудження 280 нм, інтенсивність флуоресценції детектували у діапазоні 300–400 нм. Встановлено, що при підвищенні температури у структурі цього цитокіна спостерігається локальний конформаційний перехід, пов'язаний з експонуванням залишку Trp128 на поверхні білка. При нагріванні ЕМАР II<sub>r</sub> відбуваються блокування цього локального конформаційного переходу і стабілізація білкової глобули. Ймовірно, до цього призводить перекривання “кишені” із залишком Trp128 N-кінцевим фрагментом з 43 а.з. у складі ЕМАР II<sub>r</sub>.

**Ключові слова:** ЕМАР II, денатурація, флуоресценція, стабілізація білкової глобули.

Для профілактики і лікування багатьох захворювань дедалі частіше використовують рекомбінантні білки, нуклеїнові кислоти й інші продукти генної інженерії. ЕМАР II (endothelial monocyte activating polypeptide II) – ендотеліальний моноцит-активуючий поліпептид II, попередником якого є білок АІМР1/р43 – компонент високомолекулярного комплексу аміноацил-тРНК синтетаз вищих еукаріот. ЕМАР II здатен впливати на деякі властивості ендотеліальних клітин, моноцитів і лейкоцитів *in vitro* [3, 5]. Також встановлено гальмування росту ксенографтів пухлини простати людини, імплантованих під капсулу нирки мишей після обробки їх препаратом ЕМАР II [2, 4]. Здатність ЕМАР II інгібувати неоангіогенез та індукувати апоптоз ракових клітин є основою для дослідження питання про використання цього білка як протипухлинного засобу.

Метою даної роботи є дослідження стабільності структури цитокіну ЕМАР II при підвищенні температури з подальшою можливістю використання отриманих результатів для створення лікарської форми препарату зі стабілізуючими полімерами.

### Матеріали та методи

**Експресія, виділення й очищення рекомбінантного білка ЕМАР II з клітин *E. coli*.** Для експресії ЕМАР II було використано штам-продуцент, отриманий на основі реципієнта *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysE. Штам клітин трансформовано плазмідним вектором рЕТ-30а-ЕМАР II, у якого під контролем промотора фага Т7 міститься ген цільового білка. Генетичним маркером плазміди рЕТ-30а є ген *kan*, який забезпечує стійкість трансформованих клітин до антибіотика канаміцину. Експресію рекомбінантного

білка ЕМАР II<sub>f</sub> (212 а.з.) проводили на поживному середовищі LB з додаванням канаміцину до кінцевої концентрації 30 мкг/мл. Індукцію експресії ЕМАР II з промотора lacUV5 здійснювали ізопропіл-β-тіоґалактопіранозидом (ІПТГ), який додавали в культуральне середовище до кінцевої концентрації 1,25 мМ [1]. Очищення цільового рекомбінантного білка ЕМАР II<sub>f</sub> проводили методом метал-хелатуючої хроматографії на колонці з Ni-NTA агарозою (Qiagen, США). Проводили протеоліз рекомбінантного ЕМАР II ентерокіназою (NEB, Англія), яка відщеплює фрагмент 43 а.з. (MНННННННSSG LVPRGSGMKE TAAAK-FERQH MDSPLDGTDD DDK), у тому числі His<sub>6</sub>-таг. Концентрацію білків визначали на спектрофотометрі BioMate-5 (Англія) з урахуванням коефіцієнта молярної екстинкції при довжині хвилі 280 нм, який становив 8730 см<sup>-1</sup>М<sup>-1</sup>. Цей коефіцієнт визначали за амінокислотним складом білка, використовуючи програму ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>). Аналіз отриманих препаратів проводили гель-електрофорезом за денатуруючих умов за методом Леммлі, використовуючи 15% розділяючий поліакриламідний гель із 0,1% додецилсульфату натрію.

**Флуоресцентні вимірювання.** Буфер, у якому проводили досліди, містив 50 мМ Na-фосфат, 150 мМ NaCl з рН 7,5. Спектри флуоресценції ЕМАР II<sub>f</sub> і ЕМАР II реєстрували на спектрофлуориметрі JASCO (Японія), обладнаному термостатованим кюветотримачем. Вимірювання проводили у кварцовій кюветі з довжиною оптичного шляху 1,0 см. Довжина хвилі збудження становила 280 нм, інтервал довжин хвиль для спектрів флуоресценції 280–400 нм, реєстрацію флуоресценції проводили під кутом 90° до напрямку пучка збуджуючого світла при температурах від 15 до 80°C±0,01°C.

Візуалізацію структури ЕМАР II проводили за допомогою програми PyMOL (<http://www.pymol.org/>). Координатну структуру ЕМАР II отримано з Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). Аналіз експонованості ароматичних амінокислотних залишків у структурі рекомбінантного цитокіна ЕМАР II проводили за допомогою онлайн-сервісу GetArea (<http://curie.utmb.edu/getarea.html>): координатний файл ЕМАР II – код 1E7Z, радіус молекули розчинника 1,4 Å.

### Результати і їхнє обговорення

**Виділення й очищення рекомбінантного білка ЕМАР II<sub>f</sub> з клітин *E. coli*.** Препарат ЕМАР II<sub>f</sub> (212 а.з., рис. 1), виділений за описаною вище методикою, було досліджено на чистоту, використовуючи SDS-гель-електрофорез за методом Леммлі. Гомогенність отриманого препарату була більшою за 95%. На високий ступінь чистоти препарату вказують також значення оптичного поглинання на довжинах хвиль 260 і 280 нм, величина відношення яких (OD<sub>280</sub>/OD<sub>260</sub>) є індикатором відсутності домішок нуклеїнових кислот в отриманому препараті білка. У нашому випадку вона становила 1,86. Вихід рекомбінантного ЕМАР II становив до 35 мг з розрахунку на 1 л поживного середовища.

**Очищення рекомбінантного білка ЕМАР II** Сайт-специфічний протеоліз здійснювали при 16°C у 50 мМ Na-фосфатому буфері з рН 7,5 за наявності 2 мМ CaCl<sub>2</sub> при постійному перемішуванні протягом 24 год. ЕМАР II очищали методом метал-хелатуючої хроматографії на колонці, наповненій Ni-NTA агарозою. Чистоту отриманого препарату визначали за допомогою оптичної спектроскопії. Просторову структуру ЕМАР II представлено на рис. 2.

**Дослідження впливу фрагмента 43 а.з. (у т.ч. His<sub>6</sub>-тагу) на стабільність білкової глобули при температурній денатурації ЕМАР II.** При реєстрації спектрів флуоресценції ЕМАР II<sub>f</sub> і ЕМАР II (початкова температура 15°C) максимум флуоресценції фіксували при 334 нм для обох білків. При нагріванні ЕМАР II (концентрація білка 10 мМ) від 15 до 80°C спостерігали зсув максимуму емісії флуоресценції з 334 до 350 нм (рис. 3, А). Це

обумовлено тим, що при нагріванні ЕМАР II до 80°C білок денатурує, а це може впливати на оточення залишку триптофану 128 (Trp128) у складі ЕМАР II. При температурі 42°C в цитокіні ЕМАР II спостерігається локальний конформаційний перехід, пов'язаний з експонуванням залишка Trp128 на поверхні білка.

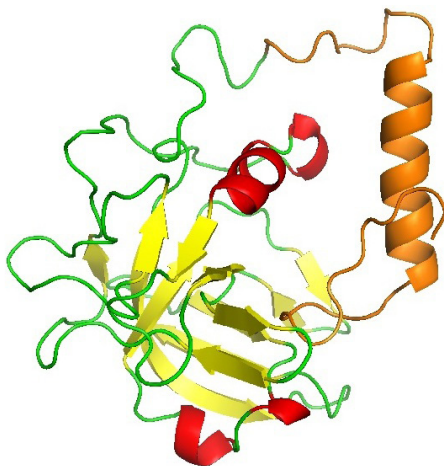


Рис. 1. Просторова структура моделі ЕМАР II<sub>f</sub> (координатний файл побудовано у відділі білкової інженерії і біоінформатики ІМБГ НАН України). Сірим кольором позначено N-кінцеві 43 а.з. (в т.ч. і His<sub>6</sub>-tag), які відщеплюються під час проведення протеолізу рекомбінантною ентерокіназою. Знаком питання позначено можливу структуру N-кінцевого залишку. ЕМАР II<sub>f</sub> має у своєму складі 212 а.з., молекулярна маса 22,8 кДа.

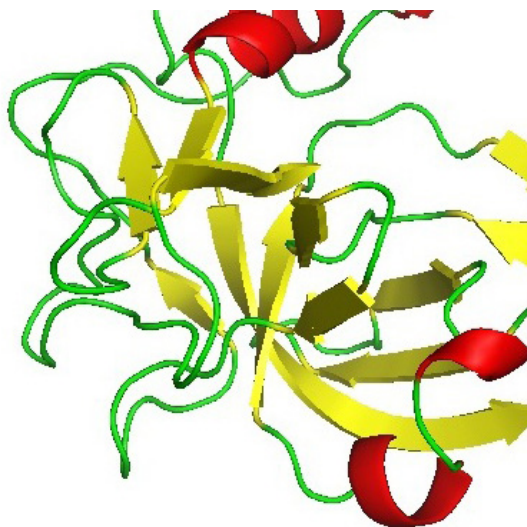


Рис. 2. Стрічкова модель ЕМАР II (координатний файл 1E7Z.pdb). ЕМАР II має у своєму складі 169 а.з., молекулярна маса – 18,5 кДа.

При нагріванні ЕМАР II<sub>f</sub> (концентрація 10 мкМ) від 15 до 80°C спостерігали аналогічний зсув максимуму емісії флуоресценції з 334 до 350 нм (рис. 3, Б), як і у досліді з ЕМАР II. При температурі 42°C в ЕМАР II<sub>f</sub> спостерігали блокування локального конформаційного переходу, пов'язаного з експонуванням залишка Trp169 (Trp128 для ЕМАР II) на

поверхні білка, та стабілізацію білкової глобули. Для порівняння результатів дослідження побудовано криві залежності зсуву максимуму емісії флуоресценції ЕМАР II і ЕМАР II<sub>f</sub> від температури плавлення (рис. 4). Як видно, при 42°C відбувається блокування локального конформаційного переходу в ЕМАР II<sub>f</sub>.

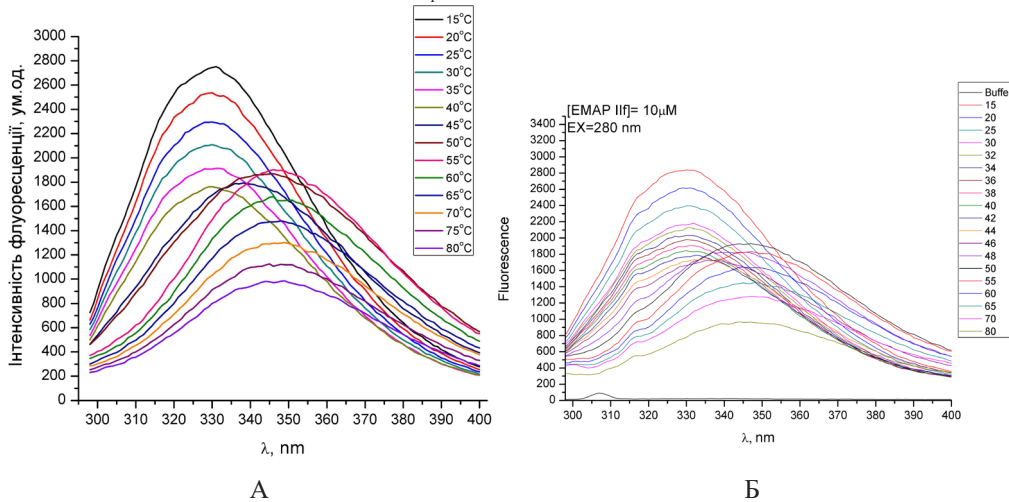


Рис. 3. А – спектри флуоресценції ЕМАР II (169 а.з.) залежно від температури; Б – спектри флуоресценції ЕМАР II<sub>f</sub> (212 а.з.) залежно від температури. Довжина хвилі збудження 280 нм, температура від 15 до 80°C з точністю до 0,1°C.

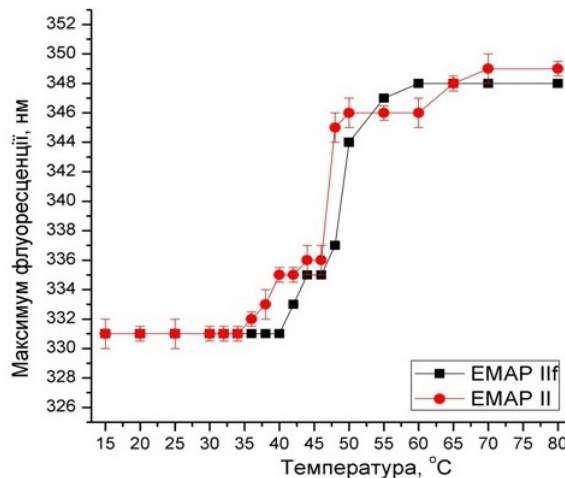


Рис. 4. Зсув максимуму емісії флуоресценції ЕМАР II і ЕМАР II<sub>f</sub> при підвищенні температури від 15 до 80°C. Довжина хвилі збудження 280 нм.

Проаналізовано експонування ароматичних амінокислотних залишків у структурі рекомбінантного цитокіна ЕМАР II з використанням веб-сервера GetArea (<http://curie.utmb.edu/getarea.html>). Встановлено, що ЕМАР II має у своєму складі шість ароматичних залишків: Tyr32, Phe110, Tyr145, Phe113, Phe150 і Trp126, з яких найбільш експонованим є залишок Trp126 (18,6%), який міститься поблизу функціонального центру білка у “кишені” на його поверхні (рис. 5).

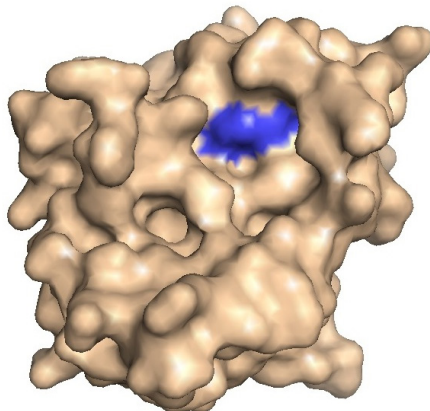


Рис. 5. Молекулярна поверхня ЕМАР ІІ (PDB код 1E7Z). ЕМАР ІІ має у своєму складі 169 а.з., молекулярна маса – 18,5 кДа. Залишок Trp128 усереднені «кишені» позначено синім кольором.

Можна висунути припущення, що N-кінцевий фрагмент з 43 а.з. на ЕМАР ІІ, здатен екранувати «кишеню» з залишком Trp128. Цей фрагмент стабілізується у такому положенні водневими зв'язками з залишками, які утворюють «кишеню», а також з С-кінцем білка, зокрема з Lys168 (Lys212 для ЕМАР ІІ<sub>r</sub>), що забезпечує загальну стабілізацію просторової структури ЕМАР ІІ<sub>r</sub>.

Підвищення температури викликає локальний конформаційний перехід у структурі цитокіна ЕМАР ІІ пов'язаний з експонуванням залишку Trp128 на поверхні молекули білка. Разом з тим, при нагріванні ЕМАР ІІ<sub>r</sub> спостерігається блокування цього локального конформаційного переходу і стабілізація білкової глобули. Ймовірно, до цього призводить перекривання «кишені» із залишком Trp128 N-кінцевим фрагментом з 43 а.з. у складі ЕМАР ІІ<sub>r</sub>.

Отримані результати можна використовувати для подальших досліджень зі створення наноконструктивних комплексів з полімерами (у т.ч. з циклодекстринами), а також досліджень стабільності білка під час ліофілізації, та у вивченні впливу цитокіна ЕМАР ІІ на ксенографти аденокарциноми простати.

*Висловлюємо подяку співробітникам відділу білкової інженерії та біоінформатики ІМБГ НАН України Д. М. Ложко за допомогу у побудові просторової структури ЕМАР ІІ<sub>r</sub> та А. І. Драгану за допомогу в обговоренні результатів.*

#### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. *Бабенко Л. А., Скоробогатов О. Ю., Дубровський О. Л., Корнелюк О. І.* Оптимізація бактеріальної експресії протипухлинного цитокіна ЕМАР ІІ в клітинах *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysE // *Мікробіологія і біотехнологія*. 2010. № 3. С. 21–31.
2. *Возианов А. Ф., Резников А. Г., Корнелюк А.И.* и др. Влияние препаратов рекомбинантного белка ЕМАР ІІ на рост, гистологические и гистохимические характеристики гетеротрансплантатов рака простаты человека // *Журнал АМН України. Тезиси докладов*. 2008. Т. 14. № 4. С. 719–729.
3. *Kao J., Rayan J., Brett G. et al.* Endothelial monocyte-activating polypeptide II. A novel tumor-derived polypeptide that activates host-response mechanisms // *J. Biol. Chem.* 1992. 267. P. 20239–20247.

4. Reznikov A. G., Chaykovskaya L. V., Polyakova L. I., Kornelyuk A. I. Antitumor effect of endothelial monocyte-activating polypeptide-II on human prostate adenocarcinoma in mouse xenograft model // *Exper. Oncol.* 2007. Vol. 29. N 4. P. 267–271.
5. Tas M. P., Murray J. C. Endothelial monocyte-activating polypeptide II // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 1996. Vol. 28. P. 837–841.

Стаття: надійшла до редакції 31.03.15

доопрацьована 25.09.15

прийнята до друку 09.10.15

## STABILITY OF STRUCTURE OF CYTOKINE EMAP II AT ELEVATION OF TEMPERATURE

A. Malyna<sup>1,2</sup>, O. Kozlov<sup>1</sup>, S. Levchenko<sup>1</sup>, O. Kornelyuk<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Molecular Biology and Genetics, NAS of Ukraine  
150, Akademik Zabolotnyi St., Kyiv 03143, Ukraine*

<sup>2</sup>*Institute of High Technology, Taras Shevchenko National University of Kyiv  
4g, Akademik Gloushkov St., Kyiv 03022, Ukraine  
e-mail: malinaalona@gmail.com*

The objective of this study was to investigate the effect of elevation of the temperature on the stability of cytokine EMAP II by fluorescence spectroscopy. Protein expression was performed in cells of *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysE and purified by metalchelate chromatography. Fluorescence spectra of EMAP II were registered at excitation of 280 nm and fluorescence intensity was measured in the wavelength range of 300–400 nm. Local conformational transition has been observed in structure of EMAP II associated with exposure of Trp128 residue on protein surface with temperature elevation. However, for heated EMAP II, such local conformational transition was blocked and structure of protein globule was stabilized. These results in the overlap of “pockets” from residue Trp128 N-terminal fragment of 43 amino acid residues in EMAP II<sub>r</sub> molecule.

*Keywords:* EMAP II, protein denaturation, fluorescence spectroscopy, protein stabilization.

## СТАБИЛЬНОСТЬ СТРУКТУРИ ЦИТОКИНА ЕМАР II ПРИ ПОВЫШЕНИИ ТЕМПЕРАТУРЫ

А. Малина<sup>1,2</sup>, А. Козлов<sup>1</sup>, С. Левченко<sup>1</sup>, А. Корнелюк<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины  
ул. Академика Заболотного, 150, Киев 03143, Украина*

<sup>2</sup>*Институт высоких технологий, КНУ имени Тараса Шевченко  
ул. Академика Глушкова, 4-г, Киев 03022, Украина  
e-mail: malinaalona@gmail.com*

Целью работы было исследовать влияние повышения температуры на стабильность структуры противоопухолевого цитокина ЕМАР II методом флуоресцентной спектроскопии. Экспрессию белка проводили в клетках *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysE и очищали методом металл-хелатирующей хроматографии.

Спектры флуоресценции цитокина ЕМАР II регистрировали при длине волны возбуждения 280 нм, интенсивность флуоресценции определяли в диапазоне длин волн 300-400 нм. Установлено, что при повышении температуры в структуре цитокина ЕМАР II наблюдается локальный конформационный переход, связанный с экспонированием остатка Trp128 на поверхности белка. При нагревании ЕМАР II<sub>r</sub> наблюдается блокирование этого локального конформационного перехода и стабилизация белковой глобулы. Вероятно, к этому приводит перекрывание «кармана» с остатком Trp128 N-концевым фрагментом 43 а.о. в составе ЕМАР II<sub>r</sub>.

*Ключевые слова:* ЕМАР II, денатурация, флуоресцентная спектроскопия, стабилизация белковой глобулы.