Фізика живого, Т. 21, No1-2, 2014. С.29-32.
© Малина А.Е., Ложко Д.М., Козлов О.В., Корнелюк О.І.

Physics of the Alive
www.pa.science-center.net

УДК 577.217.5

ДОСЛІДЖЕННЯ ВЗАЄМОДІЇ ЦИТОКІНА EMAP II З БЕТА-ЦИКЛОДЕКСТРИНОМ ТА ГІДРОКСИПРОПИЛ-БЕТА-ЦИКЛОДЕКСТРИНОМ ПРИ ПІДВИЩЕННІ ТЕМПЕРАТУРИ

Малина А.Е., Ложко Д.М., Козлов О.В., Корнелюк О.І.

Інститут молекулярної біології та генетики НАН України
e-mail: malinaalona@gmail.com

Надійшла до редакції 15.08.2014

EMAP II – ендотеліальний та моноцит-активуючий поліпептид II, попередником якого є білок AMP1/p43 – компонент високомолекулярного комплексу аміноацил-тРНК-синтетаз вищих евкаріот. β-циклодекстрин – олігомер залишків α-D-глюкози, який інтенсивно використовується при створенні лікарських препаратів в якості допоміжного агента, здатного знижувати рівень агрегації білкового компонента, підвищувати його стійкість до дії протеолітичних ферментів крові/шлунково-кищкового тракту (КШТ) та збільшувати розчинність. В даній роботі досліджено взаємодію EMAP II з β-циклодекстрином, а також EMAP II з гідроксипропил-β-циклодекстрин при підвищенні температури.

Ключові слова: EMAP II, β-циклодекстрин, гідроксипропил-β-циклодекстрин, спектроскопія.

ВСТУП

Кількість лікарських препаратів, створених на основі сучасних методів біотехнології, стрімко зростає на фармацевтичних ринках всіх країн світу. Для профілактики і лікування багатьох захворювань все частіше використовують рекомбінантні білки, нуклеїнові кислоти та інші генно-інженерні продукти.

EMAP II – ендотеліальний та моноцит активуючий поліпептид II, попередником якого є білок AIMP1/p43 – компонент високомолекулярного комплексу аміноцил-тРНК-синтетаз вищих еукаріот. Відомо, що цей пептид здатен модулювати ряд властивостей ендотеліальних клітин, моноцитів та лейкоцитів *in vitro* [1, 2]. Також досліджено гальмування росту ксенографтів раку простати людини, імплантованих під капсулу нирки мишей при обробці їх препаратом EMAP II [3, 4]. Здатність EMAP II інгібувати неоангіогенез та стимулювати апоптоз ракових клітин є основою для дослідження питання про те, чи може цей білок бути використаний у якості протипухлинного лікарського засобу.

Створення лікарської форми препарату передбачає застосування допоміжних речовин і для цього, на сьогоднішній день, використовують багато полімерів. Серед полімерів ефективним є гептаметр залишків α-D–глюкози – β-циклодекстрин (ЦД) (рис.1), які успішно застосовується у фармакології. Такий допоміжний агент здатний знизити рівень агрегації
білкової компоненти, підвищити стійкість до дії

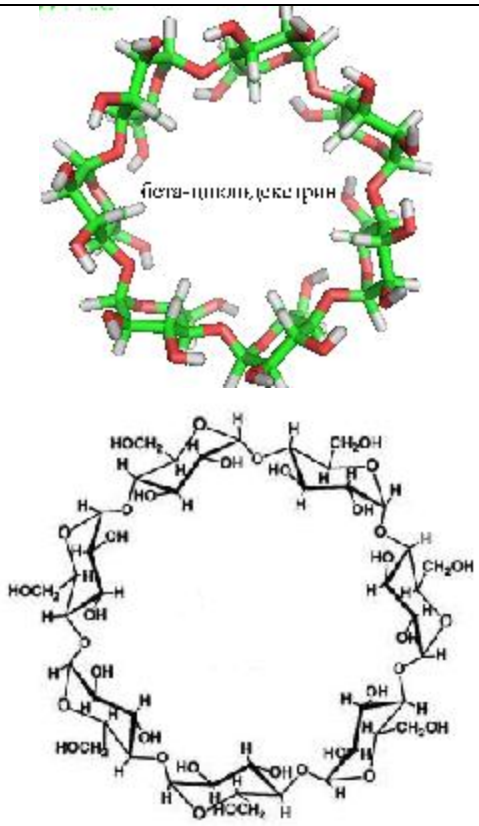

Рис. 1. Стрижнева (ліворуч) та хімічна (праворуч) моделі будови молекули β-циклодекстрину.

протеолітичних ферментів крові/ШКТ та збільшити розчинність [5, 6]. При створенні лікарських препаратів на основі рекомбінантних білків також

використовують похідні β-циклодекстрину – гідроксипропил-β-циклодекстрин. Це обумовлено його високим ступенем розчинності у воді.

Метою даної роботи є дослідження взаємодії рекомбінантного білка EMAP II з β-ЦД і гідроксипропил-β-циклодекстрином (ГПЦД) при підвищенні температури з подальшою можливістю використання їхніх комплексів для створення лікарської форми препарату.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Експресія, виділення та очистка рекомбінатного білка EMAP II з клітин E.coli. Для експресії EMAP II було використано штам-продуцент, отриманий на основі реціпієнта Escherichia coli BL21(DE3)pLysE. Штам клітин трансформовано плазмідним вектором pET-30a-EMAP II, у якого під контролем промотера фага T7 міститься ген цільового білка. Генетичним маркером плазміди pET-30a є ген kan, який забезпечує стійкість трансформованих клітин до антибіотику канаміцину.

Експресію рекомбінантного білка EMAP II проводили на поживному середовищі LB з додаванням канаміцину до кінцевої концентрації 30 мкг/мл. Індукцію експресії EMAP II з промотера lacUV5 здійснювали шляхом додавання до культурального середовища ізопропил-β-тіогалактопіранозиду (ІПТГ) до кінцевої концентрації 1,25 мМ [7]. Очистку цільового рекомбінантного білка EMAP II проводили методом металхелатуючої хроматографії на колонці з Ni-NTA агарозою (Qiagen, USA).

Концентрацію очищеного білка визначали на спектрофотометрі BioMate-5 з урахуванням коефіцієнту молярної екстинції на довжині хвилі 280 нм, що складав 8730 см-1М-1. Цей коефіцієнт молярної екстинції визначали за даними амінокислотного складу білка за допомогою програми ProtParam (web.expasy.org/protparam/). Аналіз отриманого препарату проводили за допомогою гель-електрофорезу за Лемлі в денатуруючих умовах, використовуючи 15% розділяючий поліакриламідний гель із 0,1 % додецилсульфату натрію.

Методика флуоресцентних вимірювань.

Бета- і гідроксипропил-β-циклодекстрин розчиняли у буфері, який містив 50 мМ Na-фосфат, 150 мМ NaCl з pH=7,5 і протягом 2 год інтенсивно перемішували при кімнатній температурі. Спектри флуоресценції EMAP II реєстрували на спектрофлуориметрі Hitachi M850 (Японія), який був обладнаний термостатованим кюветотримачем. Вимірювання проводили у кварцовій кюветі з довжиною оптичного шляху 0,5 см. Спектральна ширина щілин для монохроматорів збуджуючого світла та реєструючої системи становила 5—10 нм. Довжина хвилі збудження дорівнювала 280 нм, інтервал довжин хвиль для спектрів флуоресценції становив 300 – 400 нм, реєстрацію флуоресценції проводили під кутом 900 до напрямку пучка збуджуючого світла при температурах від 25 до 600С ± 0,20С.

Аналіз експонованості амінокислотних залишків проводили за допомогою програми PyMol (http://www.pymol.org/).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Виділення та очистка рекомбінантного білка EMAP II з клітин E. coli. Препарат EMAP II, виділеного за описаною вище методикою, було досліджено на чистоту, використовуючи SDS-гель-електрофорез за Леммлі (рис. 2). Чистоту отриманого препарату оцінювали більшою за 95%. На високу ступінь чистоти препарату вказують також значення оптичного поглинання на довжинах хвиль 260 і 280 нм (OD260 та OD280 відповідно), величина відношення яких (OD280/OD260) є індикатором відсутності домішок нуклеїнових кислот у отриманому розчині цільового білка. У нашому випадку вона становила 1,86.

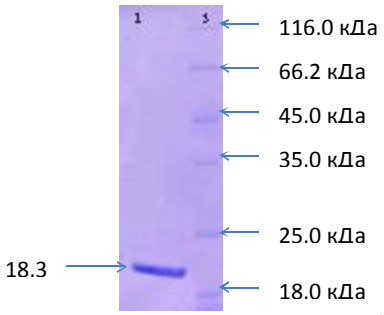

Рис. 2. Денатуруючий гель-електрофорез за Лемлі рекомбінантного білка EMAP II: 1-EMAP II; 2- маркерна суміш білків.

Дослідження взаємодії між EMAP II, β- та гідроксипропил-β-циклодекстрином методом флуоресцентної спектроскопії. При реєстрації спектрів флуоресценції EMAP II (рис. 3) максимум флуоресценції фіксували при 330 нм. Що стосується дослідів, проведених при 600С, максимум флуоресценції EMAP II змістився до ЕМ=350 нм (рис. 4), що відповідає максимуму флуоресценції вільної амінокислоти триптофану. Це обумовлено тим, що при нагріванні розчину EMAP II до 600С білок денатурує, що може впливати на зміну оточення триптофану у складі EMAP II. При підвищенні температури від 25 до 60оС в цитокіні EMAP II спостерігається

локальний конформаційний перехід, пов'язаний з експонуванням залишка Trp128 на поверхні білка.

При дослідженні впливу β-циклодекстрину на стабільність білкової глобули встановлено, що максимум емісії флуоресценції EMAP II зсувається до 336 нм при підвищенні температури до 60оС. Це свідчить про блокування локального конформаційного переходу та стабілізацію білкової глобули.

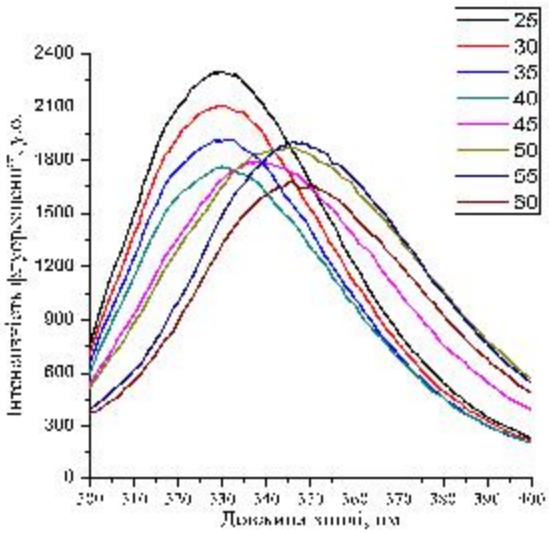

Рис. 3. Спектри флуоресценції EMAP II при підвищенні температури.

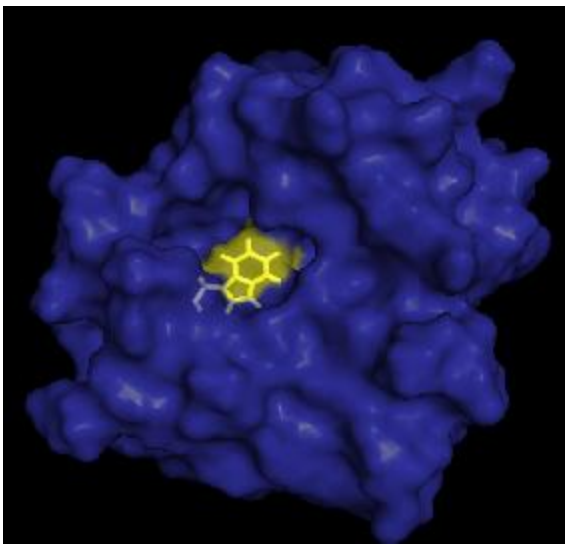

Рис. 5 Аналіз експонованості залишку триптофану128 у складі білка EMAP II.

При дослідженні впливу гідроксипропил-β-циклодекстрину на стабільність білкової глобули встановлено, що максимум емісії флуоресценції EMAP II зсувається до 334 нм при підвищенні температури до 60оС. Це, свідчить про блокування локального конформаційного переходу та

При дослідженні впливу гідроксипропил-β-циклодекстрину на стабільність білкової глобули встановлено, що максимум емісії флуоресценції EMAP II зсувається до 334 нм при підвищенні температури до 60оС. Це, свідчить про блокування локального конформаційного переходу та стабілізацію білкової глобули, як і в випадку з β-циклодекстрином.

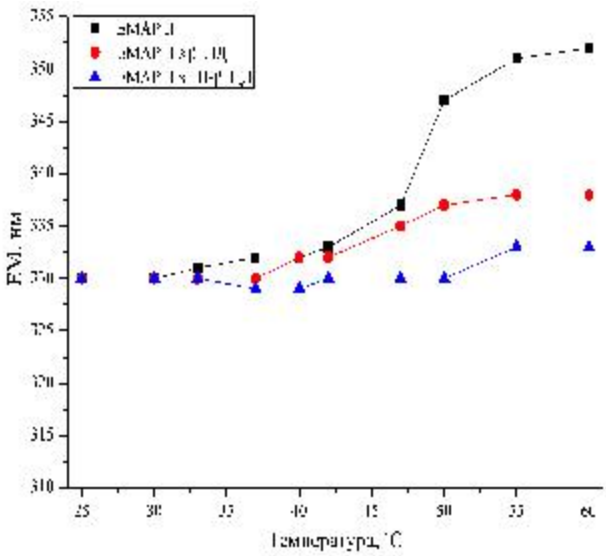

Рис. 4. Зсув максимуму флуоресценції EMAP II при підвищенні температур. EMAP II розчинений у 50 мМ натрий-фосфатному, 150 мМ NaCl, pH 7,5.

стабілізацію білкової глобули, як і в випадку з β-циклодекстрином.

Проведений аналіз експонованості ароматичих амінокислотних залишків в структурі рекомбінантного цитокіну EMAP II показав, що білок містить у своєму складі шість ароматичних амінокислот:Trp128, Tyr32, Phe110, Tyr145, Phe113, Phe150.

Залишок Trp128 є частково експонованим, однак цей залишок знаходиться у кішені, біля активного центру протеїну (рис.5). За літературними даними відомо, що циклодекстрини в першу чергу зв'язуються з ароматичними амінокислотними залишками, тому саме Trp128 є вірогідним сайтом зв'язування з β- та гідроксипропил-β-циклодекстрином.

ВИСНОВКИ

При підвищенні температури від 25 до 60оС в цитокіні EMAP II спостерігається локальний конформаційний перехід, пов'язаний з експонуванням залишка Trp128 на поверхні білка.

При взаємодії EMAP II з гідроксипропил-β-циклодекстрином спостерігається блокування локального конформаційного переходу і стабілізацію білкової глобули, як і в випадку з β-циклодекстрином.

Література

1. *KaoJ., Rayan J., Brett G., Chen J., Shen H., Fan Y., GodmanG., Familetti P. C., Wang F., Pan Y.E., Stern D., Clauss M.* Endothelial monocyte-activating polypeptide II. A novel tumor-derived polypeptide that activates host-response mechanisms // J. Biol. Chem. – 1992. – 267. – P.20239-20247.
2. *Tas M.P., Murray J.C.* Endothelial monocyte-activating polypeptide II // Int. J. Biochem. Cell. Biol. – 1996. – 28. – P.837-841.
3. *Reznikov A.G., Chaykovskaya L.V., Polyakova L.I., Kornelyuk A.I.* Antitumor effect of endothelial monocyte-activating polypeptide-II on human prostate adenocarcionoma in mouse xenograft model // Exper. Oncol. – 2007. – 29. – №4. – P.267-271.
4. *Возианов А.Ф., Резников А.Г., Корнелюк А.И., Романенко А.М., Чайковская Л.В., Полякова Л.И., Григоренко В.Н.* Влияние препаратов рекомбинантного белка ЕМАР II на рост, гистологические и гистохимические характеристики гетеротрансплантатов рака простаты человека // Короткі повідомлення. – 2008. – Т.14. № 4. – С.719-729.
5. *Клочков С.В., Компанцева Е.В., Бердник Е.Н., Ботезат-Белій Ю.К., Бабилев Ф.В.* Исследование клатрообразования β-циклодекстрина с метапрогеролом // Хим.-фарм. Журнал. -1991. – Т. 25. - № 11. – С.67-69.
6. *Беликов В.Г., Компанцева Е.В.,Гаврилин М.В., Умнова Э.Ф.* Использование возможности бета-циклодекстрина для совершенствования процесса получения преднизалона // Хим.-фарм. Журнал. — 1991. № 2. – С.48-49.
7. *Бабенко Л.А., Скоробогатов О.Ю., Дубровський О. Л., Корнелюк О. І.* Оптимізація бактеріальної експресії протипухлинного цитокіна ЕМАР II в клітинах *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysE // Мікробіологія і біотехнологія. - 2010. - № 3. – С. 21-31.

INTERACTION OF CYTOKINE EMAP II WITH BETA-CYCLODEXTRIN AND HYDROXYPROPYL-BETA-CYCLODEXTRIN AT INCREASING TEMPERATURE

Malyna A., Lozhko D., Kozlov O., Kornelyuk O.

EMAP II -endothelial monocyte-activating polypeptide II, which is a predecessor of protein AIMP1/P43 - a component of a high molecular complex of aminoacyl-tRNA synthetases of higher eukaryotes. β-Cyclodextrin – oligomer of α-D-glucose residues, intensively used in production of drugs as an auxiliary agent capable of reducing the level of aggregation of the protein components that increase resistance to proteolytic enzymes, blood and increase solubility. In this paper we investigate the interaction of EMAP II with β-cyclodextrin and with hydroxypropyl-β-cyclodextrin as the temperature rises.

Key words: EMAP II, β-cyclodextrin, hydroxypropyl-β-cyclodextrin, spectroscopy.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЦИТОКИНА ЕМАР II С БЕТА-ЦИКЛОДЕКСТРИНОМ И ГИДРОКСИПРОПИЛ-БЕТА-ЦИКЛОДЕКСТРИНОМ ПРИ ПОВЫШЕНИИ ТЕМПЕРАТУРЫ

Малина А.Э., Ложко Д.Н., Козлов А.В., Корнелюк А.И.

ЕМАР II - эндотелиальный и моноцит-активирующий полипептид II, предшественником которого является белок AIMP1/p43 - компонент высокомолекулярного комплекса аминоацил-тРНК-синтетаз высших эукариот. В фармакологической практике на сегодняшний день широко применяют β-циклодекстрин. β-циклодекстрин - олигомер остатков α-D-глюкозы, интенсивно используется при производстве лекарственных препаратов в качестве вспомогательного агента, способного снизить уровень агрегации белковой компоненты, повысить ее устойчивость к действию протеолитических ферментов крови / желудочно-кишечного тракта и увеличить ее растворимость. В данной работе исследовано взаимодействие ЕМАР II с β-циклодекстрином и гидроксипропил-β-циклодекстрин при повышении температуры.

Ключевые слова: ЕМАР II, β-циклодекстрин, гидроксипропил-β-циклодекстрин, спектроскопия.