

Бактериальная экспрессия полноразмерных и усеченных форм цитокина ЕМАР-2 и цитокинподобного домена тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих

А. Л. Дубровский, Дж. Браун¹, А. И. Корнелюк, Дж. К. Мюррей¹, Г. Х. Мацука

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

¹ Ноттингемский университет
Ноттингем NG5 1 PB, Англия

В вектор для бактериальной экспрессии рЕТ32a клонированы и секвенированы вставки ДНК, кодирующие полноразмерные цитокин ЕМАР-2 и цитокинподобный домен тирозил-тРНК синтетазы (TyrRS) млекопитающих, а также их делетированные с СООН- и NH₂-концов формы. Получена бактериальная экспрессия всех клонов, и для полноразмерных форм осуществлены аффинная очистка до гомогенного состояния, протеолитическое удаление константной части слитых рекомбинантных белков, а также тестирование их биологической активности в реакции индукции тканевого фактора. Полноразмерная форма цитокинподобного домена TyrRS не взаимодействует с поликлональными антителами к ЕМАР-2 в вестерн-блот-анализе. Делается вывод о пригодности полученной панели рекомбинантных белков для сравнительного изучения локализации функционально важных участков белков.

Введение. Тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих (TyrRS, КФ 6.1.1.1) подобно другим эукариотическим аминокислот-тРНК синтетазам содержат дополнительный некаталитический С-концевой домен [1]. Характерная особенность всех эукариотических АРСаз — сродство к полианионным носителям — обеспечивается дополнительными доменами [2]. Недавно была показана гомология некаталитического домена TyrRS и ЕМАР-2 [1, 3], а также продемонстрированы ЕМАР-2-подобные активности рекомбинантного некаталитического домена [4, 5]. Таким образом, дополнительный домен TyrRS содержит сайт(ы), ответственный(е) за сродство к полианионным носителям, и сайт(ы), ответственные за ЕМАР-2-подобные активности.

Цитокин ЕМАР-2 обладает синергическими эффектами с TNF- α [6, 7], вызывает апоптоз в культуре клеток; его экспрессия наблюдается в

участках эмбриона, активно подвергающихся апоптозу [8, 9]. Как было показано в опытах с синтетическими пептидами, для большинства (но не всех) биологических активностей ЕМАР-2 необходимым является короткий фрагмент белковой молекулы с V150 по R164 (аминокислотные остатки указаны по последовательности proEMAP-2), расположенный с N-конца зрелого ЕМАР-2. Данный пептид конкурирует с полноразмерным ЕМАР-2 за связывание с клеточной поверхностью. Тем не менее, одна из важнейших биологических активностей ЕМАР-2 — индукция тканевого фактора (тромбопластина) не индуцируется пептидом [10]. Таким образом, на сегодня идентифицированы не все участки полипептидной цепи ЕМАР-2, необходимые для его биологических активностей.

В настоящее время для выяснения локализации на полипептидной цепи участков, ответственных за различные свойства, активно используется скрининг панели рекомбинантных белков, представляющих собой полноразмерную и делетированную

ные формы исследуемого белка. Целью данной работы было получение панели рекомбинантных белков, включающей в себя полноразмерные и делетированные с N- и C-концов формы некаталитического домена TugRS и цитокина ЕМАР-2.

Материалы и методы. Выбор праймеров для полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для получения фрагментов ДНК методом ПЦР использовали следующие пары праймеров:

1. D1 (+)-праймер 5'-CCAGCTGTCAAACCA-TGGGCCCTGCCAAGAATTCCG-3';

D2 (-)-праймер 5'-CCTTCTCATAGCGGAT-CCTTACASAAACACTCGCTGA-3' (для получения кДНК фрагмента, кодирующего С-делементированный некаталитический домен TugRS);

2. YCD5F (+)-праймер 5'-AGCCATGGAGAA-GATTGATGTGGGGG-3';

YCD5R (-)-праймер 5'-CGGGATCCGCCAG-GTTGGCTAGCTGATG-3' (для получения кДНК фрагмента, кодирующего N-делементированный некаталитический домен TugRS);

3. E1 (+)-праймер 5'-TAGCTGGAAGTGCCA-TGGACTСТАAGССААТАG-3';

3'-pGEX-праймер 5'-CCGGGAGCTGCATG-TGTCAGAGGB (для получения кДНК фрагмента, кодирующего полноразмерный зрелый ЕМАР-2);

4. E1 (+)-праймер 5'-TAGCTGGAAGTGCCAT-GGACTСТАAGССААТАG-3';

E3 (-)-праймер 5'-AGCTCCTTGTTCGACAG-GCTCATCCTGGGAAAGC-3' (для получения кДНК фрагмента, кодирующего С-делементированный ЕМАР-2);

5. E4 (+)-праймер 5'-CAGATTCTTTGTCCA-TGGTGGAAGAAGTAGATG-3';

3'-pGEX-праймер 5'-CCGGGAGCTGCAT-GTGTСAGAGG-3' (для получения кДНК фрагмента, кодирующего N-делементированный ЕМАР-2).

Проведение ПЦР. Реакционные смеси в объеме 100 мкл содержали: 100 нг матричной ДНК (плазмидная ДНК), 1 пмоль каждого праймера, 400 мкмоль каждого dNTP, реакционный буфер и 10 ед. ДНК-полимеразы *Taq* («Stratagene», США). Проводили 35 циклов амплификации по следующей программе: денатурация матрицы в течение 60 с при 92 °С; отжиг праймеров — 60 с при 57 °С; достройка праймеров — 60 с при 72 °С. После завершения реакции образец дополнительно инкубировали при 72 °С в течение 10 мин.

Клонирование и анализ продуктов ПЦР. Продукты ПЦР, полученные с использованием пар праймеров D1, D2 и YCD5F, YCD5R, обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *NcoI* и *BamHI*, а продукты, полученные с парами E1, 3'-pGEX; E1, E3, и E4, 3'-pGEX, — эндонуклеазами рестрикции

NcoI и *Sall* и лигировали с обработанной указанными эндонуклеазами ДНК плазмиды *pET32a*. Лигазную смесь использовали для трансформации компетентных клеток *Escherichia coli* XL-1 Blue. Рекомбинантные клоны анализировали в ПЦР с использованием праймеров *S-Tag* и T7 terminator («Novagen», США) и методом рестрикционного анализа по сайту *StyI*.

В работе использовали эндонуклеазы рестрикции и T4 ДНК-лигазу производства «New England Biolabs», США. Вставки в клоны, дающие позитивный ответ, секвенировали на автоматическом секвенаторе нуклеиновых кислот «ALFexpress DNA Sequencer» фирмы «Pharmacia Biotech» (Швеция). ДНК клонов, содержащих вставки без мутаций, трансформировали компетентные клетки *E. coli* BL21(DE3).

Бактериальная экспрессия и очистка рекомбинантных белков. Единичную колонию *E. coli* BL21(DE3) инокулировали на 2 мл среды ТВ, содержащей 200 мкг/мл карбенициллина, и культивировали при 37 °С с интенсивным встряхиванием до достижения оптической плотности $OD_{600} = 0,4$. Клетки осаждали центрифугированием в настольной центрифуге при 12 000 об/мин в течение 1 мин. Осадок ресуспендировали в 2 мл свежей ТВ, и 100 мкл суспензии инокулировали в 8 мл ТВ с 500 мкг/мл карбенициллина. Культуру выращивали при тех же условиях до $OD_{600} = 0,4$. Затем клетки собирали центрифугированием при 2800 об/мин в течение 10 мин и ресуспендировали в 8 мл ТВ с 500 мкг/мл карбенициллина, содержащей 0,1 мМ IPTG. После 2 ч культивирования при тех же условиях клетки собирали центрифугированием при 5 000 об/мин в течение 15 мин, надосадочную жидкость удаляли и клеточный осадок замораживали при -20 °С.

Клеточный осадок размораживали в буфере для нанесения на Ni-NTA-агарозу (50 мМ NaH_2PO_4 , pH 8,0, 300 мМ NaCl; 20 мМ имидазол) с добавлением PMSF до концентрации 1 мМ и β -меркаптоэтанола — до 15 мМ. Клетки разрушали трехкратным замораживанием—оттаиванием в жидком азоте и полученный лизат наносили на колонку с Ni-NTA-агарозой («Qiagen», США), предварительно уравновешенную 10 объемами буфера для нанесения. Колонку промывали 10 объемами буфера для нанесения и последовательно 5 объемами промывочных буферов следующего состава: промывочный буфер WI — 50 мМ NaH_2PO_4 , pH 6,5, 300 мМ NaCl, 50 мМ имидазол; промывочный буфер WII — 50 мМ NaH_2PO_4 , pH 8,0, 1 М NaCl, 50 мМ имидазол; промывочный буфер WIII — 50 мМ NaH_2PO_4 , pH 8,0, 300 мМ NaCl, 0,5 %-й

трипон X-100, 20 мМ имидазол. Рекомбинантный белок элюировали ступенчатым градиентом концентрации имидазола от 30 до 130 мМ. Фракции анализировали электрофорезом в ПААГ, после чего фракции, содержащие гомогенный препарат белка, объединяли и переводили в буфер для расщепления энтерокиназой (20 мМ трис-хлорид, рН 7,4, 2 мМ CaCl₂, 50 мМ NaCl).

Расщепление энтерокиназой осуществляли при 4 °С в течение ночи. Нерасщепленный продукт и константную часть рекомбинантных белков удаляли инкубацией с Ni-NTA-агарозой.

Тест на плазмидную стабильность. Бактериальную культуру наращивали до OD₆₀₀ = 0,8 и проводили разведения в культуральной среде. Затем 200 мкл разведения 10⁻⁶ высевали на чашку с агаром без добавок и чашку с добавлением ампициллина (100 мкг/мл); 100 мкл разведения 10⁻⁵ высевали на чашку с IPTG (1 ммоль) и на чашку с IPTG и ампициллином. Колонии подсчитывали на следующий день.

Вестерн-блот-анализ полноразмерных рекомбинантных белков. Для вестерн-блот-анализа проводили гель-электрофорез в 12,5 %-м SDS-ПААГ. Белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану RPN303C («Amersham Life Science», Англия), используя электрофоретическую систему переноса («Pharmacia Biotech», 150 мА, 200 В, 60 мин). После переноса мембрану обрабатывали в 5 %-м сухом молоке на PBS с 0,1 %-м твином при температуре 4 °С в течение ночи. Далее мембрану промывали PBS с 0,1 %-м твином и обрабатывали последовательно поликлональными антителами против ЕМАР-2 (в разведении 1 : 2000), антителами против константной части IgG кролика, конъюгированными с пероксидазой (в разведении 1 : 2000). Результаты блотинга анализировали методом ECL («Amersham Life Science»).

Анализ индукции тканевого фактора. Для анализа индукции тканевого фактора эндотелиоциты человека из вены пупочного канатика высевали на 24-луночную планшету. Клетки культивировали при 37 °С/5 % CO₂ до образования сплошного монослоя. Культуральную среду удаляли и вносили ростовую среду, содержащую соответствующие разведения исследуемых белков, и клетки культивировали при тех же условиях в течение еще 4 ч. После этого среду удаляли, дважды промывали стерильным PBS и вносили раствор хлорида кальция (конечная концентрация 10 ммоль), буфер Оуэна и цитрированную плазму крови человека. Пробы инкубировали на водяной бане при температуре 37 °С до образования сгустка, определяемого визуально. Время образования сгустка заносили в таблицу.

Результаты и обсуждение. Последовательности праймеров D1, D2, YCD5F и YCD5R выводили из последовательности кДНК бычьей TyrRS таким образом, чтобы продукт амплификации D1 и D2 кодировал фрагмент полипептидной цепи TyrRS с G353 по V469, а продукт амплификации YCD5F и YCD5R — с E390 по S528. Праймеры D1 и YCD5F содержали в своей последовательности сайт рестрикции *NcoI*, а праймеры D2 и YCD5R — *BamHI* для последующего клонирования продукта ПЦР в *pET32a*.

EcoRI-фрагмент размером 1186 пар оснований (п. о.) из плазмиды *pKCTD* [11], кодирующий аминокислотную последовательность TyrRS с N357 по S528, был клонирован в *pET32a* по *EcoRI*-сайту. Продукты амплификации на ДНК плазмиды *pKCTD* с парами праймеров D1 и D2, YCD5F и YCD5R размером 400 п. о. были клонированы по *NcoI*- и *BamHI*-сайтам в *pET32a*.

Последовательности праймеров E1, E3 и E4 выводили из последовательности кДНК, кодирующей предшественник ЕМАР-2. Выбрать праймер, специфически гибридизующийся на 3'-конце кДНК ЕМАР-2 в качестве обратного праймера был использован 3'-*pGEX* праймер («Bio-Rad»). Как матрицу для амплификации использовали ДНК плазмиды *pGEX-4t-EMAP* [12]. Праймеры E1 и E4 содержали в своей последовательности сайт рестрикции *NcoI*, а праймер E3 — сайт рестрикции *Sall*. Продукт амплификации с праймерами E1 и E3 размером около 400 п. о., кодирующий аминокислотную последовательность proEMAP-2 с D144 по F254, был клонирован в *pET32a* по сайтам рестрикции *NcoI*, *Sall*. Продукты амплификации с парами праймеров E1 и 3'-*pGEX*, E4 и 3'-*pGEX* размерами около 550 и 500 п. о. соответственно, кодирующие последовательность аминокислот для proEMAP-2 с D144 по K310 и с V174 по K310 соответственно, были клонированы в *pET32a* по сайтам рестрикции *NcoI*, *Sall*. При этом использован *Sall*-сайт полилинкера плазмиды *pGEX4t*, в которую клонировали кДНК proEMAP.

Полученные клоны анализировали на наличие вставки при помощи ПЦР с праймерами *S-Tag* и T7 terminator («Novagen»). Клоны, давшие положительный сигнал, анализировали на специфичность вставки рестриционным картированием по *XbaI*-сайту для клонов, содержащих вставку кДНК TyrRS, и по *StyI*-сайту для клонов, содержащих вставку кДНК proEMAP-2. Далее вставки секвенировали по обеим цепям для обнаружения возможных мутаций. Клоны, не содержащие мутаций, отбирали для дальнейшей работы.

Конструкции получили следующие обозначения (рис. 1): *pEYCD3* — экспрессирует некаталитический домен бычьей TyrRS (YCD3); *pEYCD4* — экспрессирует С-делетированный некаталитический домен бычьей TyrRS (YCD4); *pEYCD5* — экспрессирует N-делетированный некаталитический домен бычьей TyrRS (YCD5); *pEMAP-2f* — экспрессирует полноразмерный зрелый EMAP-2 (EMAP-2f); *pEMAP-2ΔC* — экспрессирует С-делетированный зрелый EMAP-2 (EMAP-2ΔC); *pEMAP-2ΔN* — экспрессирует N-делетированный зрелый EMAP-2 (EMAP-2ΔN).

ДНК полученных конструкций использовали для трансформации компетентных клеток *E. coli* BL21 (DE3) для последующей экспрессии. При использовании стандартного протокола для экспрессии рекомбинантных белков в *pET*-векторах, успешно применяемого ранее, экспрессия целевых белков была снижена практически до нуля. Для выяснения причин отсутствия экспрессии осуществ-

лено тестирование на плазмидную стабильность для клонов, кодирующих полноразмерный и делетированные формы цитокинподобного домена TyrRS.

Результаты теста приведены в таблице. Практически все жизнеспособные клетки вырастают на чашке 1 без добавок; на чашке 3 с добавкой ампициллина вырастают лишь клоны, несущие плазмиду. Таким образом, в культурах, несущих плазмиды *pEYCD4* и *pEYCD5*, при данных условиях практически не содержится клонов, несущих целевые плазмиды. Клоны, выросшие в присутствии IPTG, либо не содержат плазмиды, либо не способны к экспрессии целевой вставки. Клоны, выросшие на чашке с ампициллином и IPTG, представляют собой мутанты, содержащие плазмиду, но не способные к экспрессии целевой вставки.

Как следует из этих результатов, популяция бактерий, пригодная для экспрессии целевых белков, составляет незначительную часть от общей.

YRS быка 351 VKGPAKNSEPEEVI**PSRLDIRVGVKIVSDKHEDADSLYVEKIDVGEAEFRTVVSGLVQGFVPEKELQDRLVVVLCNLRPQRMRGVK** 435
 YRS чел. 351 AKGLAENSEPEEVI**PSRLDIRVGVKIITVEKHEDADSLYVEKIDVGEAEFRTVVSGLVQGFVPEKELQDRLVVVLCNLRPQRMRGVE** 435
 EMAP-2 чел. 136 QQSIAGSADSKFID**VSRLLDIRIGCIITAKKHEDADSLYVEVDVGEIAPRTVVSGLVNHVPLEQMQNRNVILLCNLRPQRMRGVL** 220
 Цитокинактивный
 участок

YRS быка 436 **SQCMLLCASVEGVNRKVEPLDPPAGSAPGERV**FVKGYEKQ**PDDEELKPKKKVFEKIQADFKISDEYIAQWKQTNFMTKMGVSCKSLKGGNIS** 528
 YRS чел. 436 **SQCMLLCASIEGINRQLKPLDPPAGSAPGERV**FVKGYEKQ**PDDEELKPKKKVFEKIQADFKISEECIAQWKQTNFMTKLGSTICKSLKGGNIS** 528
 EMAP-2 221 **SQAMVMCAS---**SPEKIEILAPPNGSV**PG-DRITFDAPGEPDKELNPKKKIWEQIQPDLHTNDECVATYKGVVPEVK-GKGVCRQATMSN-SGIK** 3

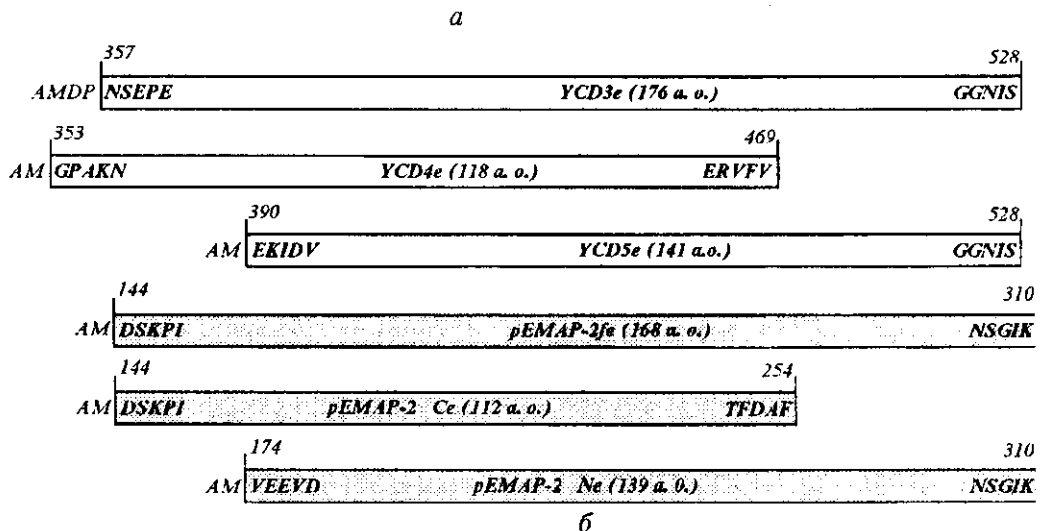


Рис. 1. Выравнивание аминокислотных последовательностей С-концевых некаталитических доменов TyrRS быка, человека, цитокина EMAP-2 (а) и схемы полученной панели рекомбинантных белков (б): YCD3 — некаталитический домен бычьей TyrRS, аминокислоты с N357 по S528; YCD4 — С-делетированный некаталитический домен бычьей TyrRS, аминокислоты с G353 по V469; YCD5 — N-делетированный некаталитический домен бычьей TyrRS, аминокислоты с E390 по S528; *pEMAP-2f* — зрелый EMAP-2, аминокислоты с D144 по K310; *pEMAP-2ΔC* — EMAP-2, делетированный с С-конца, аминокислоты с D144 по F254; *pEMAP-2ΔN* — EMAP-2, делетированный с N-конца, аминокислоты с D174 по K310

Таким образом, экспрессия данных белков в *pET*-системе приводит к плазмидной нестабильности, что может указывать на токсичность белкового продукта для бактериального хозяина.

При замене ампициллина на карбенициллин и изменении протокола экспрессии на протокол, предлагаемый фирмой «Novagen» для подобных случаев, удалось добиться значительного возрастания уровня экспрессии для всех конструкций (рис. 2).

Для подтверждения биологических активностей рекомбинантных белков некаталитический домен бычьей *TyrRS* и полноразмерный зрелый ЕМАР-2 были выделены и аффинно очищены в виде *fusion*-белков при помощи хроматографии на Ni-NTA-агарозе. Константные части *fusion*-белков были удалены протеолизом энтерокиназой (белки с отщепленной константной частью в конце обозначены индексом «е»). Активность полученных пре-

паратов анализировали по индукции тканевого фактора на поверхности эндотелиоцитов вены пупочного канатика человека (рис. 3). При этом исследовали диапазон концентраций от 100 до 0,1 пмоль. Активность YCD3е сопоставима с таковой ЕМАР-2fe. Ранее Као в опытах с синтетическими пептидами было показано, что при замене I157 на A пептид теряет способность индуцировать хемотаксис полиморфноядерных лейкоцитов. Полученные нами данные указывают на то, что для способности индуцировать тканевый фактор замена I157 на V незначительна.

Для изучения иммунологических свойств полученных препаратов белков был проведен иммуноблоттинг с поликлональными антителами против ЕМАР-2 [11] (рис. 4). Как видно, несмотря на высокий уровень гомологии некаталитического домена *TyrRS* и ЕМАР-2, рекомбинантные белки не имеют иммунологического перекреста в иммуноб-

Результаты тестирования стабильности плазмид, экспрессирующих полноразмерный и делетированные формы цитокинподобного домена *TyrRS* (в качестве контроля взята *pET32a*)

Добавка к агаризованной среде	<i>pET32a</i>	<i>pEYCD3</i>	<i>pEYCD4</i>	<i>pEYCD5</i>
Агар без добавок	56	97	42	27
+ IPTG	7	25	190	89
+ ампициллин	44	89	0	0
+ IPTG + ампициллин	0	1	0	0

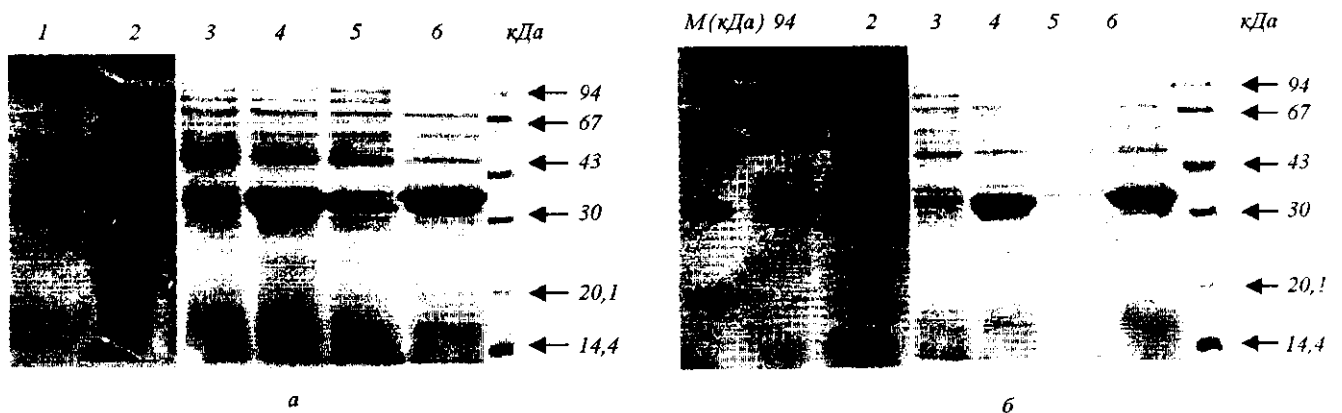


Рис. 2. Бактериальная экспрессия зрелой полноразмерной и делетированной форм цитокинподобного домена бычьей *TyrRS* (а) и цитокина ЕМАР-2 (б); а — лизат BL21 (DE3)/*pEYCD3*, экспрессирующий полноразмерный домен до индукции (1) и через 2 ч после нее (2); лизат BL21 (DE3)/*pEYCD4*, экспрессирующий С-делементированный домен до индукции (3) и через 2 ч после (4); лизат BL21 (DE3)/*pEYCD5*, экспрессирующий N-делементированный домен до индукции (5) и через 2 ч после (6); б — лизат BL21 (DE3)/*pEMAP-2f*, экспрессирующий полноразмерный цитокин до индукции (1) и через 2 ч после (2); лизат BL21 (DE3)/*pEMAP-2c*, экспрессирующий С-делементированный цитокин до индукции (3) и через 2 ч после (4); лизат BL21 (DE3)/*pEMAP-2ΔN*, экспрессирующий N-делементированный цитокин до индукции (5) и через 2 ч после (6)

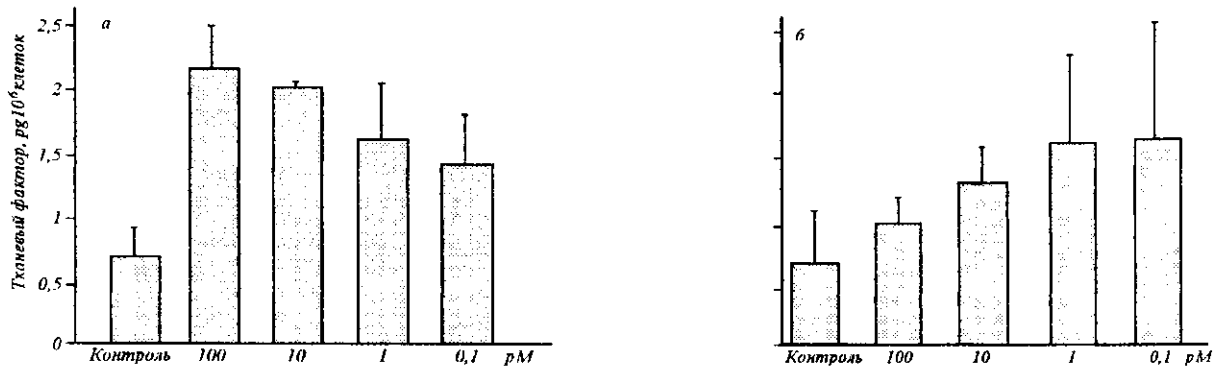


Рис. 3. Индукция прокоагуляционной активности тканевого фактора в человеческих эндотелиальных клетках человека под воздействием EMAP-2fe (а) и YCD3e (б)



Рис. 4. А: протеолиз энтерокиназой и разделение на Ni-NTA-агарозе белков YCD3 (1), EMAP-2f (2) и несвязавшаяся с носителем фракция, содержащая YCD3e (2) и EMAP-2fe (4); Б: вестерн-блот-анализ белков EMAP-2fe (1) и YCD3e (2) с поликлональными антителами против цитокина EMAP-2

лотинге. Это может свидетельствовать о том, что большинство антигенных детерминант, на которые вырабатываются антитела к данным белкам, конформационные. Секвенационные детерминанты взаимно не перекрываются в этом случае. Тем не менее, возможны и другие объяснения полученного результата.

Таким образом, нами получена панель рекомбинантных зрелого EMAP-2 и некаталитического домена бычьей T_{yr}RS и их делетированных форм, пригодная для изучения функционально важных участков этих белков.

Работа выполнена при финансовой поддержке Европейского Молекулярно-Биологического Общества (ЕМБО), номер гранта ASNf 9231.

Авторы статьи выражают благодарность М. Тасу (Ноттингемский университет) за любезно предоставленную плазмиду pGEX-4t-EMAP и поликлональные антитела против EMAP-2, а также В. Ворд (Ноттингемский университет) — за помощь в работе с клеточными культурами.

О. Л. Дубровский, Дж. Браун, О. І. Корнелюк, Дж. К. Мюррей, Г. Х. Мацука

Бактеріальна експресія повнорозмірних і усічених форм цитокину EMAP-2 і цитокінподібного домену тирозил-тРНК синтетази ссавців

Резюме

У вектор для бактеріальної експресії pET32a клоновано і секвеновано вставки ДНК, що кодують повнорозмірні цитокін EMAP-2 і цитокінподібний домен тирозил-тРНК синтетази (T_{yr}RS) ссавців, а також їхні делетовані з COOH- і NH₂-кінців форми. Отримано бактеріальну експресію всіх клонів, та для повнорозмірних форм здійснено афінне очищення до гомогенного стану, протеолітичне видалення константної частини злитих рекомбінантних білків, а також тестування їхньої біологічної активності у реакції індукції тканинного фактора. Повнорозмірна форма цитокінподібного домену

TyrRS не взаємодіє з поліклональними антитілами до ЕМАР-2 у вестерн-блот-аналізі. Зроблено висновок щодо придатності одержаної панелі рекомбінантних білків для порівняльного вивчення локалізації функціонально важливих ділянок білків.

A. L. Dubrovsky, Jn. Brown, A. I. Kornelyuk, J. C. Murray,
G. Kh. Matsuka

Bacterial expression of full-length and truncated forms of cytokine EMAP-2 and cytokine-like domain of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase

Summary

DNA fragments encoded full-length cytokine EMAP-2 and cytokine-like domain of mammalian TyrRS and truncated from COOH- and NH2-termini forms were cloned in vector for bacterial expression pET32a. For all clones bacterial overexpression were obtained and full-length forms were purified to homogeneity state by affinity chromatography and affinity tag was remove by protease cleavage. Induction of tissue factor for full-length forms was tested. Full-length form of cytokine-like domain of mammalian TyrRS did not interact with polyclonal antibody against EMAP-2 in western-blot analysis. It was concluded that this set of recombinant proteins may be usefull for functional study of these cytokine proteins.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Леванец О. В., Найденов В. Г., Вудмаска М. И., Мацука Г. Х., Корнелюк А. И. Клонирование «ДНК, кодирующей С-концевую часть тирозил-тРНК синтетазы млекопитающих, с использованием ПЦР-амплифицированного радиоактивно меченного гибридизационного зонда // Биополимеры и клетка.—1997.—13, № 2.—С. 121—126.
2. Mirande M. Aminoacyl-tRNA synthetase family from prokaryotes and eukaryotes: structural domains and their implications // Progr. Nucl. Acids Res. and Mol. Biol.—1991.—40.—Р. 95—141.
3. Kleeman T. A., Wei D. B., Simpson K. L., First E. A. Human tyrosyl-tRNA synthetase shares amino acid sequence homology with a putative cytokine // J. Biol. Chem.—1997.—272.—Р. 14420—14425.
4. Kornelyuk A., Tas M. P. R., Dubrovsky A. L., Murray C. J. Cytokine activity of non-catalytic EMAP-2-like domain of mammalian tyrosyl-tRNA synthetase // Биополимерия і клетка (Kyiv).—1999.—15, N 2.—Р. 168—172.
5. Wakasugi K., Schimmel P. T Two distinct cytokine released

- from a human aminoacyl-tRNA synthetase // Science.—1999.—284.—Р. 147—151.
6. Kao J., Ryan J., Brett G., Chen J., Shen H., Fan Y. G., Godman G., Familletti P. C., Wang F., Pan Y. C., Stern D., Clauss M. Endothelial monocyte-activating polypeptide II. A novel tumor-derived polypeptide that activates host-response mechanisms // J. Biol. Chem.—1992.—267.—Р. 20239—20247.
7. Kao J., Houck K., Fan Y., Haehnel I., Libutti S. K., Kayton M. L., Grikscheit T., Chabot J., Nowygrad R., Greenberg S., Kuang W.-J., Leung D., Hayward J. R., Kisiel W., Heath M., Brett J., Stern D. M. Characterization of a novel tumor-derived cytokine. Endothelial monocyte-activating polypeptide II // J. Biol. Chem.—1994.—269.—Р. 25106—25119.
8. Schwarz M., Lee M., Zhang F., Zhao J., Jin Y., Smith S., Bhuva J., Stern D., Warburton D., Starnes V. EMAP II: a modulator of neovascularization in the developing lung // Amer. J. Physiol.—1999.—276.—Р. 365—375.
9. Schwarz M. A., Kandel J., Brett J., Li J., Hayward J., Schwarz R. E., Chappey O., Wautier J. L., Chabot J., Lo Gerfo P., Stern D. Endothelial-monocyte activating polypeptide II, a novel antitumor cytokine that suppresses primary and metastatic tumor growth and induces apoptosis in growing endothelial cells // J. Exp. Med.—1999.—190.—Р. 341—354.
10. Kao J., Fan Y. G., Haehnel I., Brett J., Greenberg S., Clauss M., Kayton M., Houck K., Kisiel W., Seljelid R., Burnier J., Stern D. A peptide derived from the amino terminus of endothelial-monocyte-activating polypeptide II modulates mononuclear and polymorphonuclear leukocyte functions, defines an apparently novel cellular interaction site, and induces an acute inflammatory response // J. Biol. Chem.—1994.—269.—Р. 9774—9782.
11. Дубровский А. Л., Савинская Л. А., Корнелюк А. И. Клонирование и бактериальная экспрессия цитокинподобного некаталитического домена бычьей тирозил-тРНК синтетазы // Биополимеры и клетка.—1998.—14, № 5.—С. 449—452.
12. Tas M. P. R., Houghton J., Jakobsen A. M., Tolmachova T., Carmichael J., Murray J. C. Cloning and expression of human endothelial-monocyte-activating polypeptide 2 (EMAP-2) and identification of its putative precursor // Cytokine.—1997.—9.—Р. 535—539.

УДК 577.152.611

Поступила в редакцию 29.11.99