



УДК 577.217.3

©1992 А.С. Спирин

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ В БЕСКЛЕТОЧНЫХ СИСТЕМАХ В ПРЕПАРАТИВНОМ МАСШТАБЕ

Институт белка РАН, г.Пуццо Московской обл.

Экспрессия *in vivo* чужеродных и синтетических генов связана с определенными ограничениями. Продукты многих генов оказываются плохо растворимыми, легко агрегируют, токсичны по отношению к клетке-хозяину или легко разрушаются клеточными протеиназами. В принципе эти проблемы могут быть решены с помощью бесклеточных систем трансляции. Однако в этом случае короткое время жизни и низкий выход белка также ограничивают область использования подобных систем. В этом обзоре предлагаются две системы экспрессии генов, базирующиеся на новом принципе, позволяющем решить перечисленные выше проблемы. Синтез белка происходит в течение длительного периода времени не в фиксированном объеме инкубационной смеси, а в протоке питательного раствора через бесклеточный экстракт, что приводит к высокому выходу белка. В первом случае для трансляции матриц используются прокариотические и эукариотические клеточные лизаты. Во втором случае для экспрессии генов используются сопряженные системы транскрипции — трансляции, где транскрипция происходит с помощью эндогенных или фаговых РНК-полимераз. В обоих случаях бесклеточные системы трансляции работают десятки часов, что приводит к увеличению выхода белка.

70 – 80-е годы ознаменовались развитием техники рекомбинантных ДНК и методов экспрессии *in vivo* чужеродных и синтетических генов, что привело к так называемой биотехнологической революции. Сегодня биологически активные полипептиды и белки различного происхождения, состава и свойств могут быть получены из клеточных культур, несущих соответствующие клонированные гены.

Однако экспрессия *in vivo* чужеродных и синтетических генов неизбежно связана с определенными ограничениями. Чужеродные гены могут быть нестабильными или плохо экспрессируемыми вследствие воздействия регуляторных механизмов хозяина. Продукты многих генов оказываются плохо растворимыми и часто агрегируют как "тельца включения". Другие белки нестабильны и разрушаются внутриклеточными протеиназами. Наконец, продукты некоторых генов токсичны по отношению к клетке-хозяину и, следовательно, не экспрессируемы.

В принципе эти и другие проблемы экспрессии генов могут быть решены с помощью бесклеточных систем. Эксперименты, проведенные еще в 60-х годах, продемонстрировали, что экзогенные матричные полинуклеотиды, добавленные или непосредственно как полирибонуклеотидные матрицы, или как полидезоксирибонуклеотидные гены, могут быть экспрессируемы в полипептидные и белковые продукты в бесклеточной системе трансляции или в сопряженных системах

транскрипции — трансляции соответственно. С тех пор бесклеточные системы играют основную роль в исследованиях молекулярных механизмов белкового синтеза на рибосомах. Отсутствие механизмов клеточного контроля и возможность манипулировать составом инкубационной смеси (например, путем добавления протеиназных и нуклеазных ингибиторов, избирательного устранения нежелательных белков и веществ, очистки белоксинтезирующих компонентов) делают бесклеточные системы привлекательными. Однако короткое время жизни и низкий выход белка были основными ограничениями, не допускавшими использование классических бесклеточных систем для препаративной экспрессии генов.

Недавно было продемонстрировано, что трансляция в течение длительного периода времени, приводящая к высокому выходу белка, может быть достигнута в бесклеточных системах, где инкубация происходит не в фиксированном объеме инкубационной смеси ("batch"-процесс), а в протоке питательного раствора через бесклеточный экстракт [1-3].

Реактор. Простейшим техническим решением для реализации непрерывного проточного процесса для бесклеточной трансляции или сопряженной транскрипции — трансляции является камера (ячейка), ограниченная ультрафильтрационной мембраной и помещенная в термостатируемый бокс. Инкубационная смесь, содержащая рибосомы, матричный полинуклеотид, тРНК и все необходимые белковые факторы и ферменты, помещается в камеру. Тип ультрафильтрационной мембраны, от РМ-10 или ХМ-30 до УМ-100 или ХМ-300 (Amicon), может быть выбран в зависимости от размера синтезируемого полипептида так, чтобы позволить ему проходить через мембрану. В процессе инкубации питательный раствор, содержащий субстраты (аминокислоты и нуклеозидтрифосфаты) в соответствующем буфере, подается в камеру, а фильтрат, содержащий продукт синтеза, откачивается с той же скоростью в коллектор фракций. Резервуар с питательным раствором и коллектор содержатся на холоду (во льду или в рефрижераторном боксе). Если объем инкубационной смеси составляет 1 мл, скорость протока должна быть от 1 до 3 мл в 1 ч. Во время инкубации должно обеспечиваться медленное перемешивание смеси. Стерильность инкубационной смеси и питательного раствора является важным условием. Процесс может продолжаться от 20 до 100 ч. Схема реактора показана на рис. 1.

В практической работе может быть использована стандартная коммерческая микроультрафильтрационная камера Amicon 8 MC. Другой вариант проточной камеры основан на хроматографической микроколонке, оснащенной ультрафильтрационной мембраной на выходе и стандартным колоночным адаптером на входе (рис. 2). Колонка снабжена рубашкой водяного охлаждения, обеспечивающей желательное термостатирование реакционной смеси. Объем инкубационной смеси в колонке устанавливается с помощью адаптера, так что воздушного слоя не существует, и не возникает проблем с поддержанием постоянства объема инкубационной смеси. Колонку располагают так, что мембрана находится наверху, а адаптер внизу. Таким образом, более легкий питательный раствор входит в более тяжелую инкубационную смесь со дна, и это приводит к конвекционному перемешиванию; в этом случае не требуется механического перемешивания.

Инкубационная смесь в камере содержит в основном клеточный экстракт (так называемый экстракт S30) или клеточный лизат с добавлением экзогенной матричной РНК или плазмидной ДНК. Могут быть использованы, кроме того, более очищенные смеси, например комбинация очищенных рибосом, тРНК и экстракта S100. Подходят и коммерческие

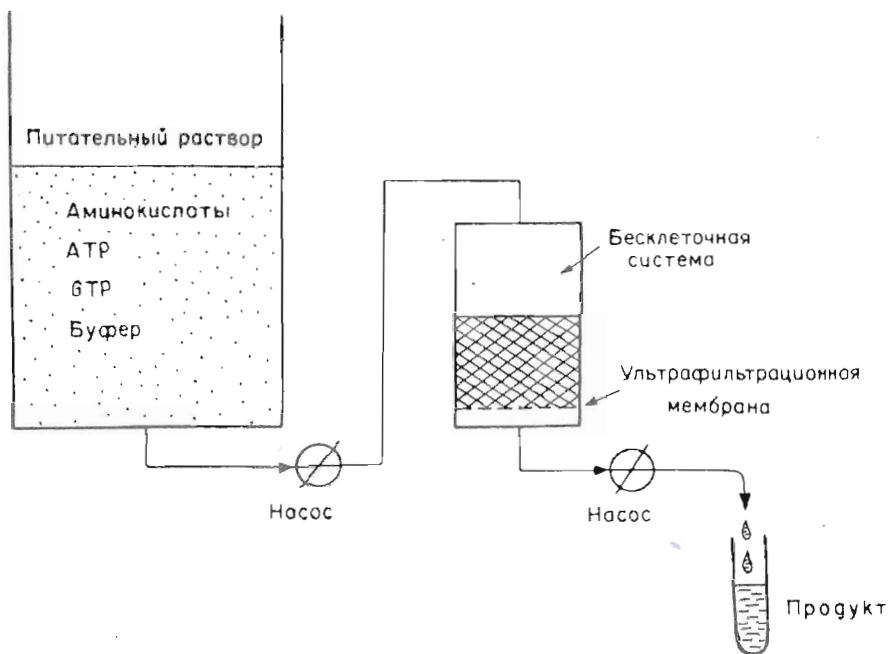


Рис. 1. Схема биореактора на основе ультрафильтрационной камеры Amicon 8MC

экстракты. Надо выбирать экстракты с высокой трансляционной активностью, низкой нуклеазной активностью и низким уровнем эндогенной трансляции. В наших экспериментах использовались экстракт S30 *E. coli*, комбинация 70S рибосом *E. coli*, тРНК и экстракта S100, экстракт зародышей пшеницы и лизат ретикулоцитов кролика.

Система трансляции с использованием мРНК

Первые эксперименты были проведены по трансляции вирусной РНК. При трансляции РНК бактериофага MS2 в экстрактах из *E. coli*, не содержащих эндогенных ДНК и РНК, синтез белка оболочки шел линейно более 20 ч при 37°C; продукт элюировался через мембрану PM-30 как основной белок (рис. 3). Количество синтезированного белка составляло 100 копий белка на молекулу MS2-РНК, т.е. 6 нмоль, или 0,1 мг белка из 1 мл инкубационной смеси. В случае трансляции РНК-4 вируса мозаики костра (ВМК) в экстракте из зародышей пшеницы синтез также шел более 20 ч линейно, и выход составил 10 нмоль, или 0,2 мг белка оболочки ВМК. В этом случае использовалась мембрана XM-50.

Тот же биореактор был использован для синтеза немодифицированного полипептида кальцитонина как в прокариотической (*E. coli*), так и в эукариотической (зародыши пшеницы) бесклеточных системах [1]. мРНК были синтезированы путем транскрипции *in vitro*

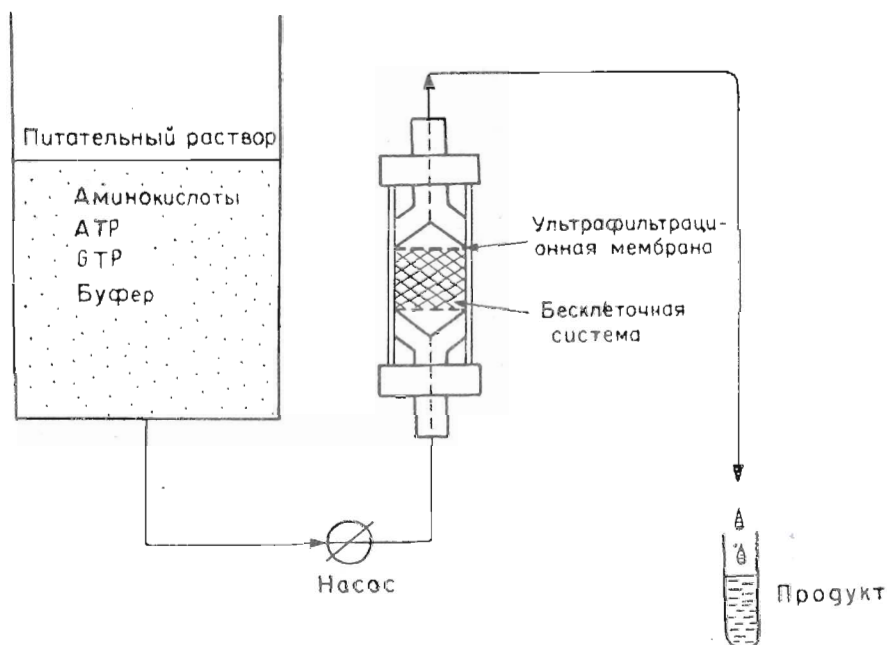


Рис. 2. Схема биореактора на основе микроколониальной техники

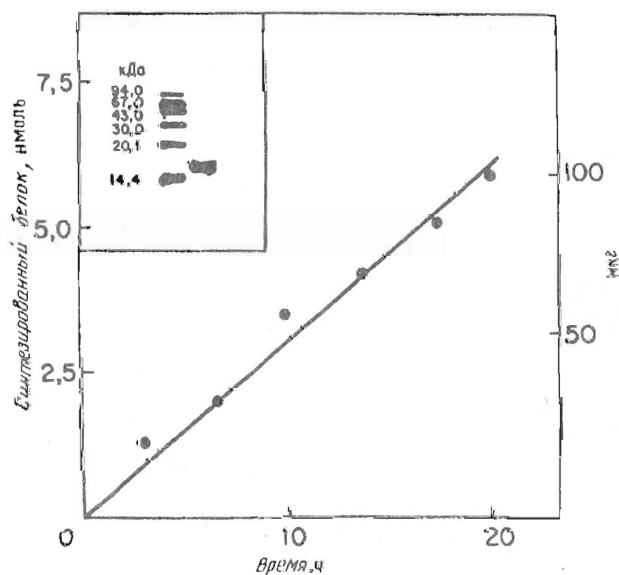


Рис. 3. Синтез белка оболочки фага MS2 в проточной системе трансляции с экстрактом *E. coli*. Вставка (здесь и далее) — электрофоретический анализ продуктов трансляции; слева — маркерные белки и их молекулярные массы

синтетического гена [Val⁸]кальцитонина с помощью SP6-РНК-полимеразы и соответственно содержали или не содержали участки Шайна – Дальгарно. Синтез продолжался 40 ч при 37°C (в случае экстракта *E. coli*) или при 27°C (в случае экстракта из зародышей пшеницы). Выход составил около 300 копий полипептида на молекулу РНК (18 нмоль, или 60 мкг продукта) или около 10 копий полипептида на молекулу РНК (9 нмоль, или 30 мкг продукта) соответственно. Синтезированный продукт был основным белком, проходящим через мембрану РМ-10.

Тот же принцип протока применялся для трансляции мРНК глобина в бесклеточной системе трансляции из ретикулоцитов кролика [2]. В лучшем эксперименте, при увеличении скорости протока до 3 мл/ч, выход достиг 100 нмоль, или 1,5 мг, белка из 0,5 мл инкубационной смеси за 100 ч при 30°C.

Сопряженная бесклеточная система транскрипции – трансляции с использованием плазмидной ДНК

Описанная выше бесклеточная система трансляции нуждается в очищенной индивидуальной мРНК. Альтернативный подход применялся для сопряженной бесклеточной системы транскрипции – трансляции. Как известно, бактериальный экстракт содержит ДНК-зависимую РНК-полимеразу, необходимую для транскрипции. Применение принципа протока к сопряженной бесклеточной системе транскрипции – трансляции с использованием эндогенной РНК-полимеразы и экзогенной ДНК (гена или плазмиды) имело все преимущества проточной бесклеточной системы трансляции, давая в результате препаративные количества белков [3].

На рис. 4 показан ДНК-зависимый синтез β -лактамазы и дигидрофолатредуктазы в сопряженной бесклеточной системе транскрипции – трансляции в экстракте S30. Плазмида рDF34, содержащая два соответствующих гена, экспрессировалась 50 ч при 37°C [4] с использованием ультрафильтрационной мембраны ХМ-100. Питательная смесь, содержащая все четыре нуклеозидтрифосфата и 20 аминокислот, пропускалась через инкубационную смесь с разной скоростью. Было показано, что скорость синтеза зависит от скорости протока: изменение скорости от 3 до 2 мл/ч уменьшает скорость синтеза более чем в 2 раза и последующее переключение скорости с 2 до 3 мл/ч восстанавливает скорость синтеза. Суммарный выход белка был более чем 0,2 мг из 1 мл инкубационной смеси. Две полосы, соответствующие β -лактамазе и дигидрофолатредуктазе, присутствовали приблизительно в эквимольных количествах.

Имеется несколько лимитирующих факторов в использовании эндогенной РНК-полимеразы в бактериальном экстракте. Главные из них – это проблемы регуляции транскрипции; свойства промоторов, терминация транскрипции и т.д. Как правило, кольцевая плазмида содержит интересующий ген, ген селекции и все необходимые регуляторные элементы. Ген селекции также транскрибируется и транслируется. К тому же такая система применима только для бактериального экстракта. Эти лимитирующие факторы могут быть обойдены использованием сопряженной системы транскрипции – трансляции с экзогенной бактериофаговой РНК-полимеразой вместо эндогенной клеточной РНК-полимеразы. Фаговые РНК-полимеразы SP6 или T7 сейчас широко используются для синтеза мРНК *in vitro* путем транскрипции плазмидной ДНК или синтетического гена. Найдено, что обе РНК-полимеразы (T7 и SP6) могут эффективно транскрибировать мРНК с ДНК в проточной системе как в прока-

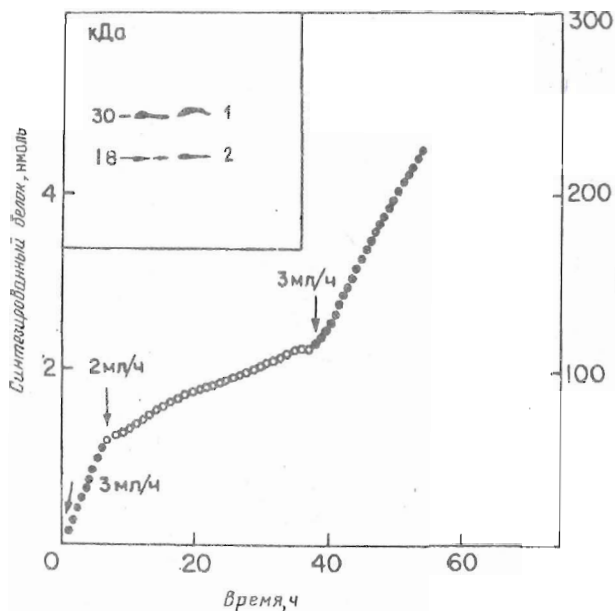


Рис. 4. Экспрессия генов β -лактамазы (1) и дигидрофлат-редуктазы (2) в проточной системе с экстрактом *E. coli*, содержащим эндогенную РНК-полимеразу

прокариотических, так и в эукариотических экстрактах. Таким образом, вместо получения мРНК можно прямо использовать плазмидную ДНК для экспрессии гена в непрерывной проточной системе, основанной на бесклеточных экстрактах из различных типов клеток.

Рисунок 5 иллюстрирует экспрессию плазмиды рSP65, содержащей ген дигидрофлат-редуктазы под контролем SP6-промотора, в экстракте из зародышей пшеницы, в который была добавлена РНК-полимераза SP6. На выходе из реакционной камеры стояла ультрафильтрационная мембрана УМ-100. Питательная смесь содержала все 4 нуклеозидтрифосфата и 20 аминокислот. Белковый синтез продолжался около 24 ч при 24°C. При этом суммарный выход белка составил около 0,09 мг (5 нмоль) при объеме инкубационной смеси 1 мл. Электрофоретический анализ продукта с последующей автордиографией обнаруживает единственную основную полосу, соответствующую дигидрофлат-редуктазе. Все время эксперимента параллельно измерялась ферментативная активность дигидрофлат-редуктазы, оказавшаяся равной около 25 ед./мкмоль.

Синтез другого белка — хлорамфеникол-ацетилтрансферазы в сопряженной системе транскрипции — трансляции из ретикулоцитов кролика с использованием РНК-полимеразы SP6 показан на рис. 6. В этом случае реакционная камера была оснащена ультрафильтрационной мембраной ХМ-300. Синтез белка продолжался около 35 ч при 34°C. При объеме инкубационной смеси 0,5 мл суммарный выход белка составил около 0,06 мг (2,5 нмоль). Параллельно измерялась ферментативная активность продукта.

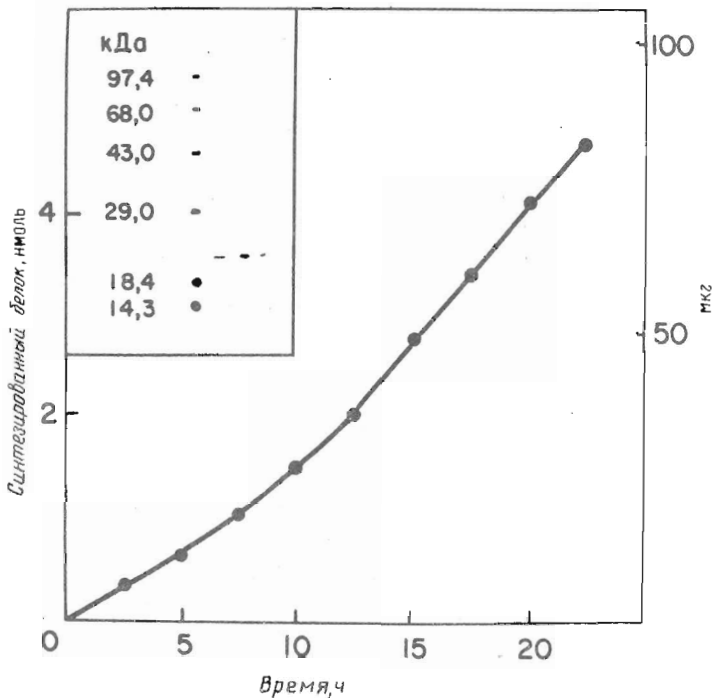


Рис. 5. Экспрессия гена дигидрофолатредуктазы в проточной системе с экстрактом из зародышей пшеницы, содержащим РНК-полимеразу флага SP6

Основные преимущества непрерывной проточной системы трансляции и некоторые перспективы

Первое и основное преимущество непрерывной проточной системы — это существенно большее время ее жизни по сравнению со стандартной бесклеточной системой. В непрерывной системе линейная кинетика полипептидного синтеза поддерживается десятки часов, что дает препаративный выход соответствующих белков и полипептидов. Наш опыт показывает, что при объеме инкубационной смеси в 1 мл можно получить от 20 мкг до 3 мг белка в зависимости от его молекулярной массы, растворимости, свойств матрицы, типа и качества экстракта и т.д.

Другое важное преимущество непрерывной проточной системы трансляции — относительная чистота получаемого продукта, так как в этом случае продукт находится в фильтрате, а не в сложной смеси клеточного экстракта и загрязнен только белками, вытекающими из инкубационной смеси. В случае хорошо экспрессируемых мРНК чистота продукта в фильтрате может достигать более 80%, особенно если исключить часть фильтрата, получаемого в первые часы. Например, в результате 20-часовой экспрессии мРНК интерлейкина-4 в большом экспериментальном реакторе с использованием экстракта из зародышей пшеницы было получено 50 мг белка 85% чистоты в 1 л фильтрата (Алахов,

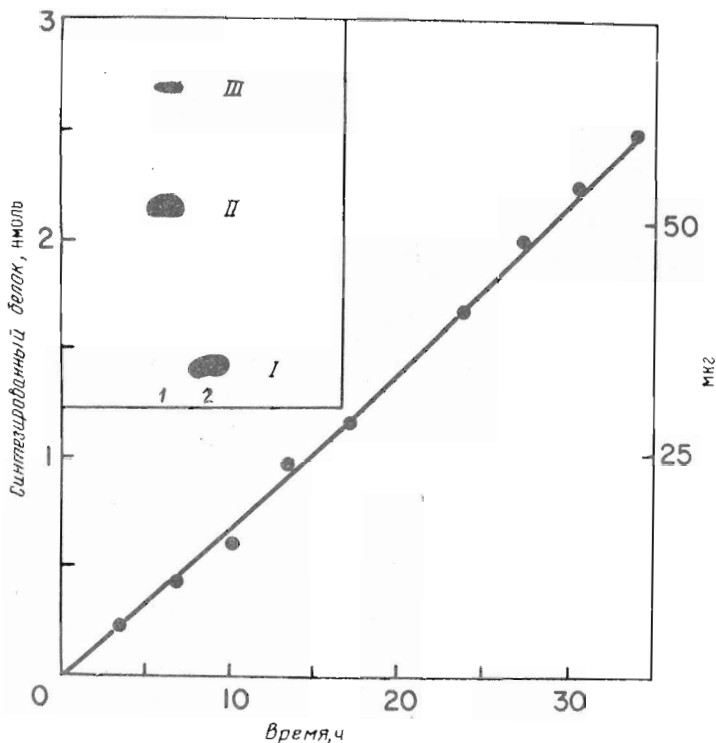


Рис. 6. Экспрессия гена хлорамфеникол-ацетилтрансферазы в проточной системе с лизатом ретикулоцитов кролика, содержащим РНК-полимеразу фага SP6. Вставка — тонкослойная хроматография продуктов действия хлорамфеникол-ацетилтрансферазы при нулевом времени инкубации (2) и после 12-часовой инкубации с хлорамфениколом (1). I — хлорамфеникол, II и III — его 3-ацетил- и 3-диацетилпроизводные

Оводов, Винокуров. Институт белка, Пушкино. Неопубликованные данные).

Непрерывная проточная система трансляции, по-видимому, наиболее перспективна в случае препаративного синтеза тех полипептидов и белков, которые плохо экспрессируются *in vivo*. Это касается в первую очередь цитотоксичных продуктов. Кроме того, нестабильные в условиях клетки белки и полипептиды лучше синтезировать в бесклеточной системе.

Благодаря тому что продукт находится в фильтрате и может быть обнаружен как единственный синтезированный пептид, идентификация и выделение продуктов возможны даже без знания их свойств и функций. Поэтому непрерывная проточная система бесклеточного синтеза представляется идеальной при синтезе теоретически разработанных белковых конструкций или в случае экспрессии генов, для которых функция продукта неизвестна.

Одним из наиболее перспективных применений непрерывной проточной системы синтеза должна быть белковая инженерия *in vitro*. При этом можно прямо экспрессировать синтетические гены или природ-

ные гены с точечной мутацией, и все продукты, независимо от их функциональных и физических свойств, могут быть обнаружены и исследованы. Использование синтетических тРНК с измененными антикодонами и искусственно ацилированных тРНК при синтезе *in vitro* дает возможность получать различные варианты белка без сайт-специфического мутагенеза на уровне генов посредством сайт-специфического включения различных аминокислот. Используя этот же подход, можно получать белки, в которых в определенных положениях включены неприродные аминокислоты или аминокислоты, несущие специфические зонды (метки) (см. [5]).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Spirin A.S., Baranov V.I., Ryabova L.A., Ovodov S.Yu., Alakhov Yu.B.// Science. 1988. V. 242. P. 1162.
2. Ryabova L.A., Ortlepp S.A., Baranov V.I.// Nucl. Acids Res. 1989. V. 17. P. 4412.
3. Baranov V.I., Morozov I.Yu., Ortlepp S.A., Spirin A.S.// Gene. 1989. V. 84. P. 463.
4. Murzina N.V., Gudkov A.T.// Protein Engin. 1990. V. 3. P. 709.
5. Noren C.J., Anthony-Cahill S.J., Griffith M.C., Schultz P.G.// Science. 1989. V. 244. P. 182.

A.S.SPIRIN

GENE EXPRESSION IN CELL-FREE SYSTEMS ON A PREPARATIVE SCALE

*Institute of Protein Research, Russian Academy of Sciences,
Pushchino, Moscow Region*

In vivo expression of foreign or synthetic genes can be subject to certain restrictions such as protein aggregation, degradation and toxicity. Conventional *in vitro* systems can overcome these problems, but in turn suffer from other limitations, in particular short life-time and low protein yield. In this review, two types of gene expression system are described. Both are based on the novel concept of the enhanced expression from cell-free extracts where incubation is performed in the continuous flow of a feeding solution rather than in a fixed volume of a test-tube. The first type makes use of cell-free translation of mRNA templates in either prokaryotic or eukaryotic cell lysates. The second utilizes the coupled transcription — translation of DNA templates, with genes transcribed by either endogenous or bacteriophage RNA polymerases. In both systems, translation can be carried out over tens or hundreds of hours resulting in high protein yields.