



УДК 547.963.320.57:577.214.622

© 1992 г. В. Г. Горобко, Е. Ф. Болдырева, [С. А. Филиппов],
Н. Д. Беркова, В. Н. Добрынин, В. А. Шмелев,
С. Г. Попов, С. И. Евсегнеев, Л. Ю. Носова

СИНТЕЗ ИСКУССТВЕННОГО ГЕНА, КОДИРУЮЩЕГО ТИМОЗИН α_1 , И ЕГО ЭКСПРЕССИЯ В *Escherichia coli* В СОСТАВЕ ГИБРИДОВ С ФАКТОРОМ НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ ЧЕЛОВЕКА

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина РАН, Москва

Осуществлен химико-ферментативный синтез и клонирование в *Escherichia coli* искусственного гена, кодирующего иммунорегуляторный пептид тимозин α_1 . Скопированы рекомбинантные плазмиды, содержащие гибридные гены, в которых кодирующая тимозин α_1 последовательность соединена с С- или N-концевой частью полусинтетического гена фактора некроза опухолей α человека (TNF). В случае С-концевого гибрида аминокислотная последовательность TNF соединена с последовательностью тимозина α_1 через остаток метионина, что позволяет отщепить пептид от гибридного белка действием бромциана. В случае N-концевого гибрида последовательность тимозина α_1 присоединена к N-концу TNF через кислотолабильный дипептид Asp-Pro. Изучены экспрессия полученных гибридных генов в *E. coli* и свойства кодируемых ими белков. Обнаружено, что С-концевой гибрид синтезируется в клетках бактерий в виде нерастворимых агрегатов в противоположность N-концевому гибриду, который секретируется в периплазматическое пространство *E. coli*. Разработан способ выделения гибридных белков из бактериальной массы. Показано, что N-концевой гибрид обладает полной биологической активностью TNF в цитотоксическом тесте на мышинных фибробластах линии L-929, тогда как С-концевой гибрид оказался в 10 раз менее активным. Обработка бромцианом гибридного белка TNF-тимозин α_1 привела к смеси двух полипептидов, из которой тимозин α_1 был выделен в индивидуальном виде при помощи простых хроматографических процедур.

Тимозин α_1 , один из более чем 30 пептидов низкой молекулярной массы (1000–15 000), выделяемых из тимуса [1], обладает мощной общей иммуностимулирующей активностью. Тимозин α_1 синтезируется в организме в виде предшественника, от которого отщепляется и затем подвергается N-концевому ацетилированию. Однако найдено, что N-деацетилтимозин α_1 также обладает полным набором биологических активностей нативного пептида [2].

Показано, в частности, что тимозин α_1 стимулирует лимфоциты, индуцируя биосинтез интерлейкина-2 [3] и его рецептора [4, 5], интерлейкина-3 [6], лимфотоксина, α -, γ -интерферонов и макрофагингибирующего фактора [7], а также фактора роста В-клеток — интерлейкина-4 [3]. Установлено также, что тимозин α_1 способствует созреванию и пролиферации T_{CD4^+} и T_{CD8^+} лимфоцитов [8] и модулирует общий иммунный ответ на антигены и митогены [9]. Кроме того, недавно было обнаружено, что тимозин α_1 обладает определенным структурным подобием фрагменту корбелка р17gag вирусов HTLV-III, LAV и ARV-2 [10], а антитела против тимозина α_1 эффективно нейтрализуют HIV и блокируют репликацию

В работе использовали только олигонуклеотиды, поэтому префикс «d» в формулах олигонуклеотидов для краткости опущен.

Сокращения: TNF — фактор некроза опухолей человека; Thy — тимозин α_1 ; SDS — додецилсульфат натрия.

вируса. Наконец, в опытах на иммуносупрессированных мышах показано, что тимозин α_1 защищает животных от оппортунистических инфекций, вызванных грибом *Candida albicans* [11], а также бактериями *Listeria*, *Pseudomonas* и *Serratia* [12], которые наиболее часто встречаются у больных СПИДом [13]. Таким образом, тимозин α_1 — чрезвычайно перспективное лекарственное средство, активирующее иммунную систему, эффективное против широкого ряда патологий, таких, как инфекционные, аутоиммунные и опухолевые заболевания.

В настоящее время основным источником тимозина α_1 является тимус теленка, из которого пептид выделяют при помощи многостадийной хроматографической очистки [14]. Альтернативой этому способу может быть химический синтез пептида или конструирование специального штамма *E. coli* для микробиологического синтеза. Биотехнологический путь получения тимозина α_1 представляется более предпочтительным, поскольку, несмотря на несомненные достижения последнего времени, крупномасштабный химический синтез 28-звенного пептида является весьма сложной задачей.

В 1980 г. группой фирмы Genentech (США) опубликован химический синтез гена тимозина α_1 и его экспрессия в бактериях в составе С-концевого гибрида с β -галактозидазой *E. coli* [2]. Однако описанная в этой работе конструкция обладает рядом недостатков. Во-первых, гибридный белок β -галактозидаза-тимозин α_1 содержит в своем составе 24 остатка метионина, что приводит после обработки бромцианом к сложной смеси продуктов, выделение из которой целевого пептида весьма затруднительно. Во-вторых, доля пептида в гибридном белке составляет менее 3%, что в значительной степени обесценивает высокий уровень экспрессии гибридного гена в клетках бактерий.

Избежать отмеченных выше недостатков возможно, если использовать при конструировании гибридного гена такой «носитель», который кодировал бы небольшой по размеру белок, не содержащий в своем составе остатков метионина, и хорошо экспрессировался в клетках бактерий. Всем перечисленным требованиям удовлетворял полусинтетический ген мутантного фактора некроза опухолей человека (TNF) в плазмиде pTNF3314 [15], использованный нами ранее при конструировании гибридов с антигенными детерминантами вируса ящура [16] и содержащий подходящий для конструирования гибридного гена уникальный сайт рестриктазы *Bam*HI в С-концевой части.

На рис. 1 представлена нуклеотидная последовательность двухцепочечной ДНК, кодирующей тимозин α_1 . Искусственный ген фланкирован сайтами рестриктаз *Eco*RI и *Hind*III для промежуточного клонирования. Перед иницирующим кодоном ATG введен сайт рестриктазы *Cl*aI для клонирования в экспрессионные плазмиды, разработанные в нашей лаборатории.

Для получения искусственного гена, кодирующего тимозин α_1 , синтезировали фосфонатным твердофазным методом восемь олигодезоксирибонуклеотидов величиной от 21 до 29 нуклеотидных звеньев. Лигазные шивки осуществляли в два этапа: на первом этапе проводили две четырехкомпонентные шивки, причем все олигонуклеотиды перед шивкой фосфорилировали, за исключением 5'-концевого олигонуклеотида I из сегмента А и олигонуклеотида VIII из сегмента Б. На втором этапе сшивали Т4-ДНК-лигазой сегменты А и Б, которые предварительно очищали электрофорезом в 15% ПААГ, содержащем 7 М мочевины. Получившуюся в результате 101-звенную двухцепочечную ДНК очищали электрофорезом в 8% ПААГ и клонировали в плазмиду pGEM4.

Для этого ДНК плазмиды pGEM4 гидролизовали рестриктазами *Eco*RI и *Hind*III и полученный таким образом вектор лигировали со 101-звенной

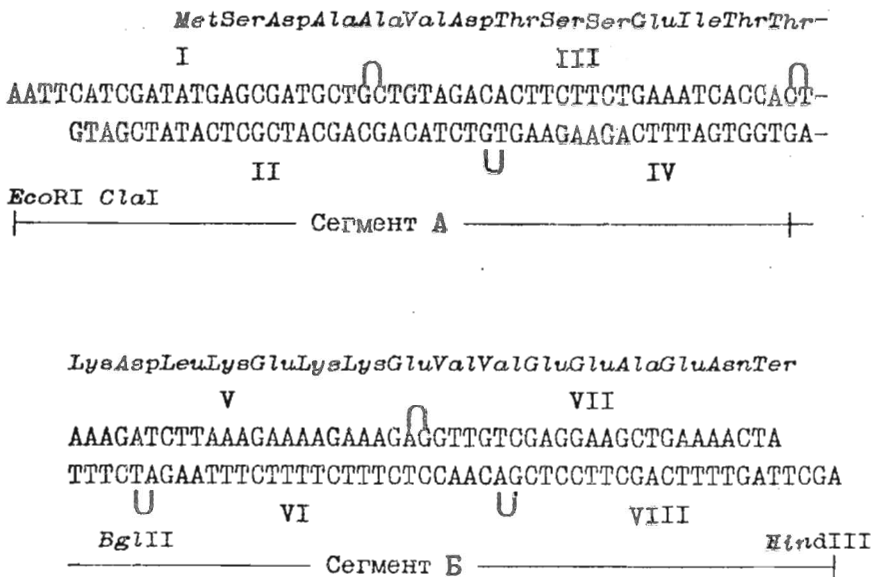


Рис. 1. Нуклеотидная последовательность двухцепочечной синтетической ДНК и кодируемая ею аминокислотная последовательность тимозина α₁. Указаны сайты эндонуклеаз рестрикции. Дугами обозначены места соединения синтезированных олигонуклеотидов (I)–(VIII) в лигазных сшивках

синтетической ДНК. После трансформации лигазной смесью компетентных клеток *E. coli* HB101 скрининг клонных клонов проводили гибридной колонией *in situ* с ³²P-мечеными олигонуклеотидами I и VIII. Из клонов, гибридизующихся с обоими радиоактивными зондами, выделяли плазмидную ДНК, обозначенную рТНУ1-4, которую анализировали рестриктным анализом с помощью рестриктаз *Hae*III и *Msp*I, после чего структуру вставки подтверждали определением нуклеотидной последовательности модифицированным методом Максама – Гилберта [17]. Полученная таким образом рекомбинантная плазмидная ДНК рТНУ1-4 содержит искусственный ген тимозина α₁ (*thy*), который способен транскрибироваться SP-6 РНК-полимеразой, и может быть использована для паративной наработки РНК для бесклеточной трансляции с использованием лизатов ретикулоцитов кролика или экстрактов из проростков пшеницы.

Плазмиду, содержащую ген С-концевого гибрида TNF-тимозин α₁, далее конструировали как показано на рис. 2. Для этого сначала проводили промежуточное клонирование синтетического гена в плазмиду рСРG.2 [18] по сайтам *Cla*I и *Hind*III. В результате получили новую рекомбинантную плазмиду рТНУ12, которая в дальнейшем была использована для конструирования обоих описанных в этой работе гибридных генов. Следует отметить, что эта плаزمидка содержит ген тимозина α₁, которому предшествует последовательность сайта инициации трансляции (последовательность Шайн – Дальгарно), причем транскрипция гена тимозина α₁ обеспечивается тандемом сильных промоторов A2 и A3 бактереофага T7.

Для дальнейшего конструирования мы использовали упомянутую выше плазмиду рTNF3314, которая содержит ген *thy* человека с измененной с помощью сайт-направленного мутагенеза С-концевой частью. В резуль-

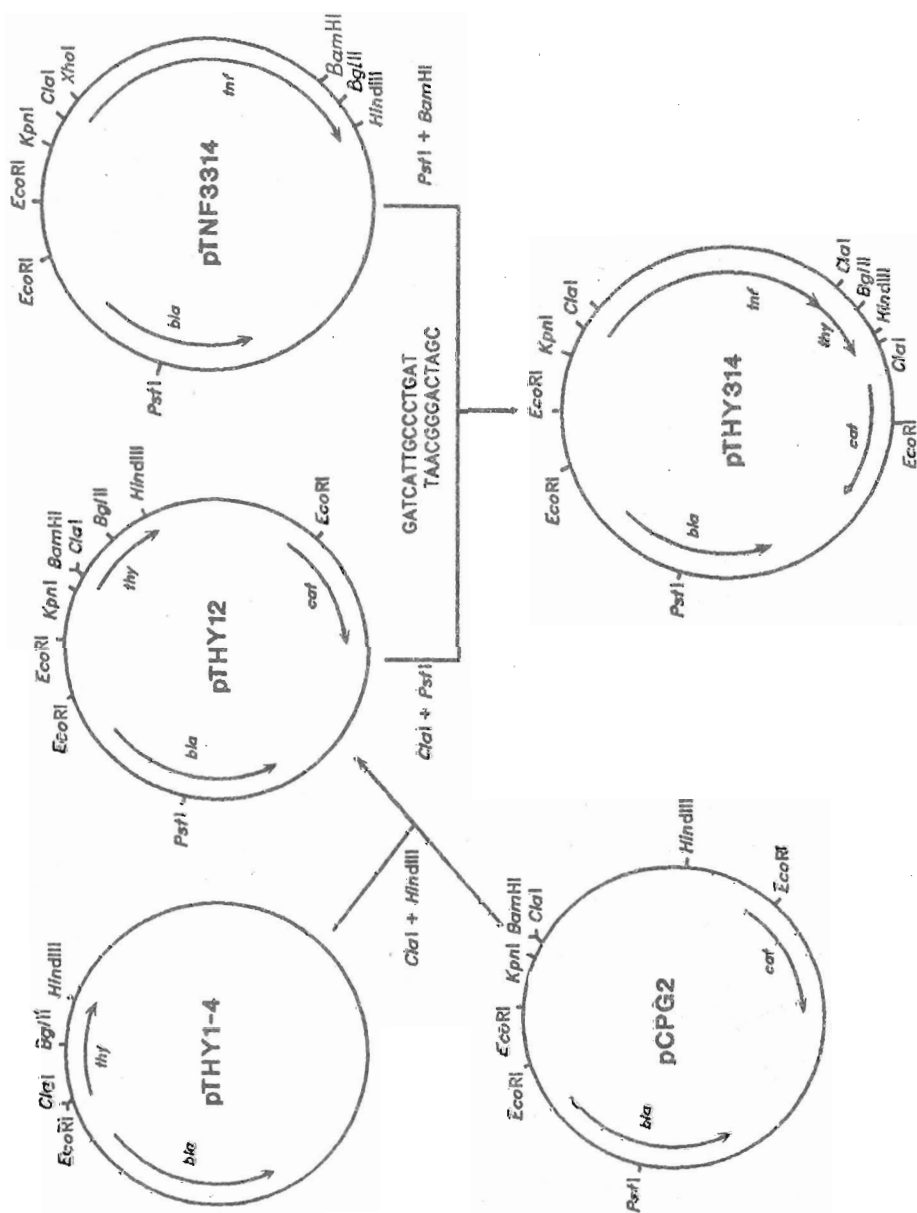


Рис. 2. Схема конструирования плазмиды pTNF314; *bla*, *cat*, *thy* и *tnf* — гены, кодирующие β-лактамазу, хлорамфениколацетилтрансферазу, Thy и TNF

тате такого мутагенеза Leu^{155} был заменен на остаток Leu, а в ген *tnf* введен уникальный сайт рестриктазы *Bam*HI. ДНК плазмиды pTNF3314 подвергали совместному гидролизу рестриктазами *Bam*HI и *Pst*I и выделяли векторный фрагмент. С другой стороны, гидролизовали ДНК плазмиды pTHY12 эндонуклеазами *Cla*I и *Pst*I, после чего электрофорезом в 1% агарозе выделяли фрагмент величиной 2,5 т. п. о., который затем лигировали с *Cla*I/*Pst*I-фрагментом плазмиды pTHY12 в присутствии синтетического дуплекса

GATCATTGCCCTGAT

TAACGGGACTACG,

обеспечиваю-

щего единую рамку считывания генов *tnf* и тимозина α_1 . После трансформации компетентных клеток *E. coli* HB101 скрининг клонов, содержащих целевую плазмидную ДНК pTHY314, проводили гибридизацией колоний с ^{32}P -меченым олигонуклеотидом GATCATTGCCCTGAT. Из гибридизующихся клонов выделяли плазмидную ДНК pTHY314 и ее строение подтверждали рестриктным анализом с помощью рестриктаз *Hae*III и *Msp*I, а также определением нуклеотидной последовательности части плазмиды в районе вставки синтетического дуплекса.

Исследование экспрессии гибридного гена в различных штаммах показало, что наибольший уровень биосинтеза химерного белка TNF—тимозин α_1 наблюдался в клетках *E. coli* штамма SG20050, являющегося мутантом по La-протеиназе. Действительно, при SDS—ПААГ-электрофорезе суммарного белка бактерий можно наблюдать после прокрашивания геля кумасси интенсивную полосу белка с молекулярной массой около 21 кДа (рис. 3а). Этот белок в иммуноблоте реагирует как с моноклональными антителами E7H2, так и с поликлональной антисывороткой против рекомбинантного TNF, а также с поликлональной антисывороткой против синтетического фрагмента 17—28 пептида тимозина α_1 (рис. 3б—г).

Следует отметить, что рекомбинантный гибридный белок TNF—Thy образует в клетках бактерий нерастворимый агрегат, что в значительной степени упрощает процедуру его очистки. Поэтому тельца включения очищали после лизиса клеток последовательной отмывкой 1, 2 и 3 М раствором мочевины. В результате получали препарат, содержащий, по данным SDS—ПААГ, 60—70% гибридного белка. Для дальнейшей очистки этот препарат растворяли в 7 М мочеvine и хроматографировали сначала на DEAE-целлюлозе, а затем на голубой агарозе «супер», в результате чего получали белок TNF—Thy $\approx 95\%$ чистоты (анализ SDS—ПААГ).

Для выщепления N-деацетилтимозина α_1 препарат гибридного белка TNF—Thy обрабатывали бромцианом в 70% муравьиной кислоте при комнатной температуре в течение суток. Реакционную смесь разбавляли водой и упаривали; операцию повторяли дважды. Выпавший осадок отделяли, а супернатант после обессоливания на колонке с сефадексом G-25 хроматографировали сначала на «Силасорбе DEA» (рис. 4а), а затем на «Диасорбе С-16» (рис. 4б). Полученный таким образом препарат пептида являлся гомогенным хроматографически (рис. 4в) и электрофоретически (рис. 5). Аминокислотный анализ выделенного таким образом рекомбинантного Thy подтвердил наличие на N-конце олигопептидной цепи остатка серина, а также соответствие аминокислотного состава ожидаемому. Выход очищенного пептида составлял 5—10 мг/л бактериальной культуры при плотности $5 \cdot 10^8$ клеток/мл.

Таким образом, полученная плазмидная конструкция обеспечивает высокий уровень биосинтеза гибридного белка, содержащего единственный остаток метионина между последовательностью TNF и Thy, что позволяет расщепить его на два полипептида при действии бромциана и значительно облегчает процесс выделения целевого пептида. В то же время сама по себе технология получения тимозина α_1 с использованием бромциана при крупномасштабном производстве может представлять определенную опас-

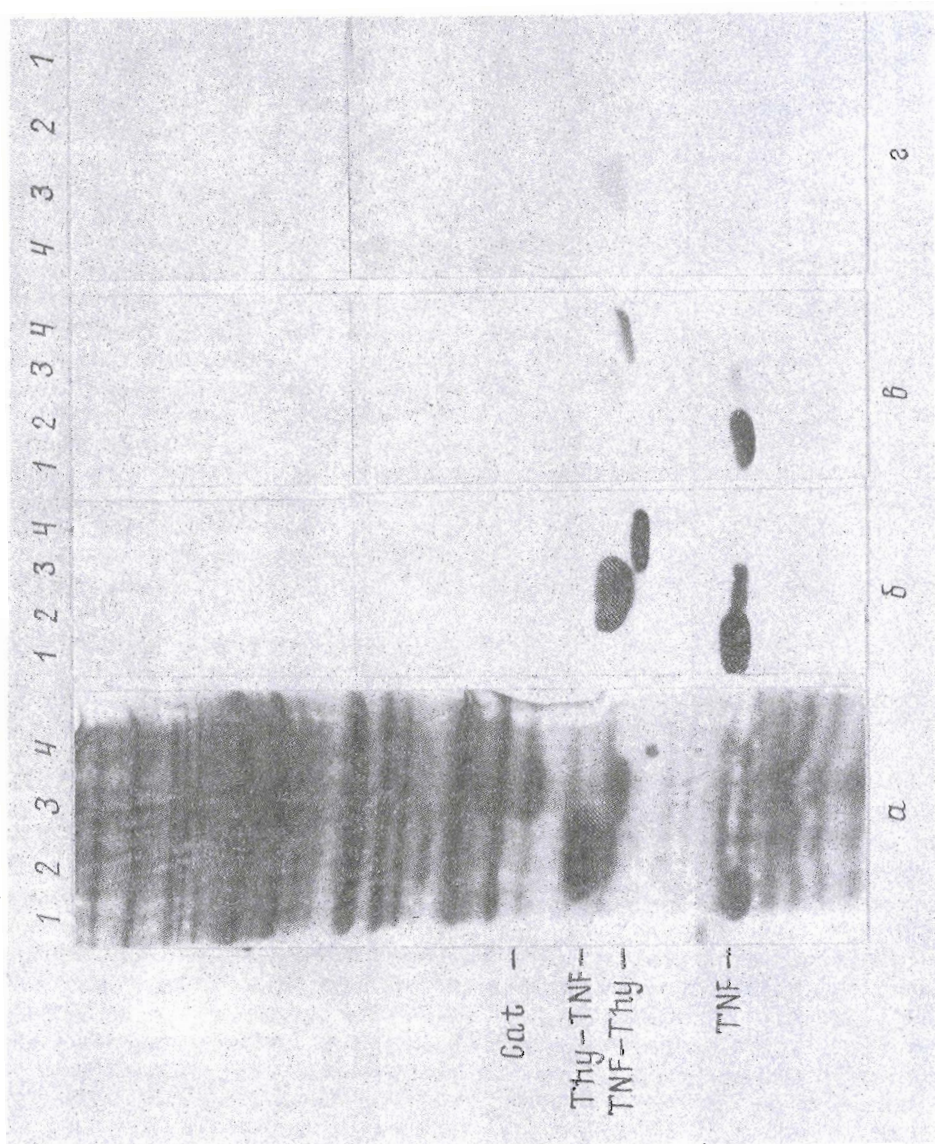


Рис. 3. Электрофорез (а) 13,5% SDS-ПААГ и иммунолоты с моноклональными антителами Е7Н2 против рекомбинантного TNF (б), поликлональными антителами против TNF (в) и синтетического фрагмента 17-28 гликозидной цепи (г) лизатов *E. coli* SC20050 с плазмидами рTNF331 (1), рГНУ230 (2) и рГНУ314 (3) и без плазмиды (4). Cat - хлорамфениколацетил - трансфераза

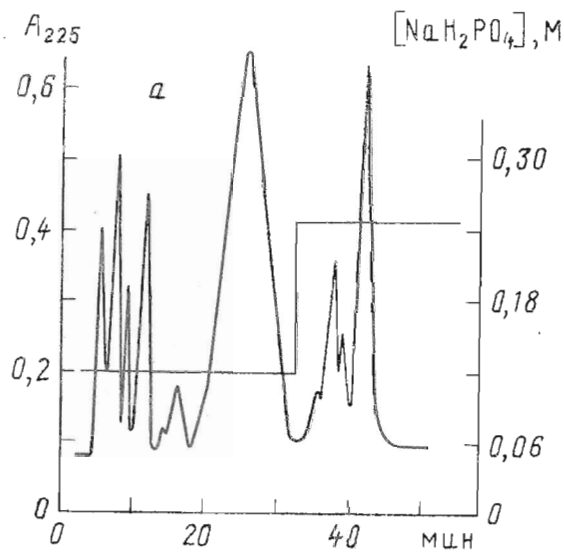


Рис. 4, а

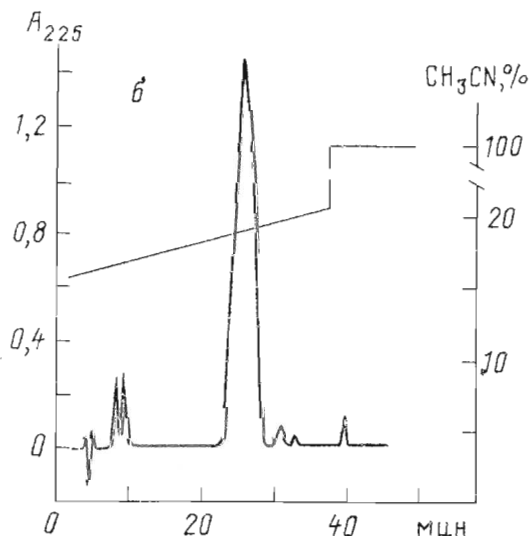


Рис. 4, б

ность для окружающей среды. В связи с этим целесообразно разработать альтернативную, экологически безопасную технологию получения тимозина α_4 .

Известно, что С-концевой аминокислотой тимозина α_4 является аспарагин. Допуская, что замена этого остатка в пептиде на остаток аспарагиновой кислоты не повлияет существенно на его биологическую активность (ср. [19]), мы предприняли конструирование гибридного гена, кодирующего гибридный белок, в котором аминокислотная последовательность тимозина α_4 соединена через дипептид Asp-Pro с N-концом TNF. Такой гибридный белок будет содержать в своем составе единственную кислотоплазмируемую пептидную связь, расщепление по которой приведет к дезаминаналогу тимозина α_4 .

С целью конструирования такого гибридного гена мы осуществили хи-

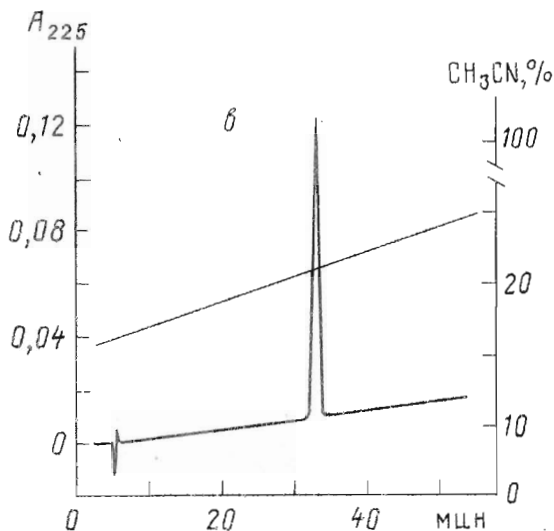


Рис. 4. Профили хроматографического выделения тимозина α_1 . а — препаративная анионообменная хроматография. Колонка 8×250 мм, носитель — «Силасорб DEA»; образец 0,9 мл. Скорость элюции 2 мл/мин; б — препаративная обращенно-фазовая хроматография. Колонка 4×250 мм, носитель — «Диасорб С-16», градиентная элюция 1 мл/мин раствором ацетонитрила в присутствии 0,4% трифторуксусной кислоты; образец 0,5 мл; в — аналитическая хроматография конечного продукта в тех же условиях; образец 20 мкл (30 мкг)

мико-ферментативный синтез двухцепочечной ДНК (сегмент В, рис. 6), кодирующей С-концевой фрагмент тимозина и фланкированной сайтами рестриктаз *Bgl*III и *Xho*I для соединения с N-концевой частью синтетического гена тимозина α_1 и геном *tnf* соответственно. В качестве источника гена *tnf* использовали плазмиду pTNF331, являющуюся производной плазмиды pTNF186 [20] с полусинтетическим геном, который содержит в N-концевой части уникальный сайт рестриктазы *Xho*I, и кодирующую делеционный вариант TNF без двух N-концевых аминокислот. Конструирование плазмиды с гибридным геном проводили как показано на рис. 7.

Для этого ДНК плазмиды pTHY12 гидролизovali рестриктазами *Pst*I и *Bgl*III и выделяли фрагмент величиной около 1,1 т. п. о., содержащий N-концевую половину гена тимозина α_1 . С другой стороны, плазмиду pTNF331 расщепляли смесью рестриктаз *Pst*I и *Xho*I и выделяли фрагмент размером около 2,8 т. п. о., содержащий ген *tnf*. Этот фрагмент затем лигировали в присутствии избытка нефосфорилированного сегмента В с *Pst*I/*Bgl*III-фрагментом, полученным из плазмиды pTHY12. После трансформации компетентных клеток *E. coli* HB101 трансформанты скринировали при помощи гибридизации колоний с одним из 5'-³²P-меченых олигонуклеотидов, входящих в состав сегмента В. Из гибридизующихся клонов выделяли плазмидную ДНК pTHY229, строение которой подтверждали рестриктным анализом и определением нуклеотидной последовательности части плазмидной ДНК в области вставки синтетического фрагмента.

Для изучения экспрессии гибридного гена плазмидой pTHY229 трансформировали клетки *E. coli* SG20050 (*lon*⁻) и суммарный клеточный белок анализировали электрофорезом в SDS-ПААГ. При этом оказалось, что уровень биосинтеза гибридного белка Thy-TNF, контролируемого плазмидой pTHY229, оказался невысоким — по всей видимости, из-за не-

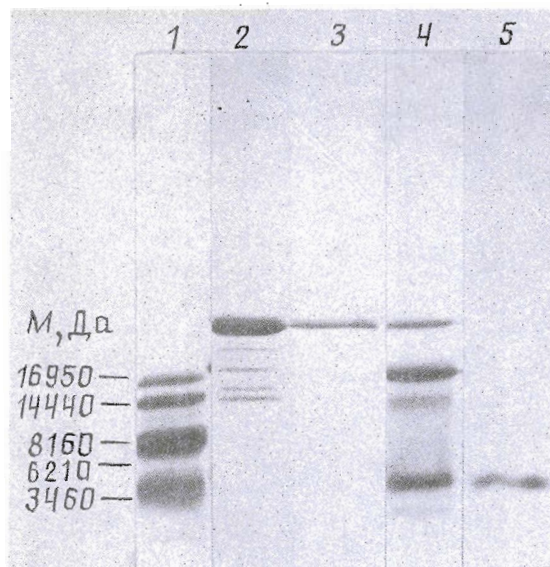


Рис. 5. Электрофорез в 20% ПААГ-SDS: 1 – маркеры молекулярной массы SDS-17 (Sigma, Германия); 2 – гибридный белок TNF-Thy после отмывки раствором 3 М мочевины; 3 – очищенный гибридный белок TNF-Thy; 4 – реакционная смесь после обработки гибридного белка бромцианом; 5 – образец очищенного рекомбинантного тимозина α_1 .

оптимального участка инициации трансляции (расстояние между последовательностью SD и иницирующим кодоном – 10 нуклеотидов) (см. рис. 8).

Поэтому для увеличения экспрессии *Cla*I-фрагмент плазмиды рТНУ229, содержащий гибридный ген без регуляторных участков, переклонировали по *Cla*I-сайту в плазмиду рТНФ331, содержащую оптимизированную последовательность SD. В результате получили плазмиду рТНУ230, которая, как показывает SDS-электрофорез суммарного белка, обеспечивает в клетках *E. coli* SG20050 высокий уровень экспрессии гибридного гена (рис. 3а). Как и ожидалось, гибридный белок Thy-TNF одинаково хорошо взаимодействует в иммуноблоте с поликлональной антисывороткой и моноклональными антителами Е7Н2 [20] против TNF и практически не взаимодействует с поликлональными антителами против синтетического фрагмента 17–28 пептида тимозина α_1 (рис. 3б–г). Это может свидетельствовать о том, что при иммунизации кроликов синтетическим пептидом антитела вырабатываются в основном против С-концевой его части, которая в гибридном белке Thy-TNF экранирована.

Интересно, что гибрид Thy-TNF синтезируется в бактериальной клетке как растворимый белок в отличие от химерного белка TNF-Thy, который в клетках бактерий образует нерастворимые агрегаты. Более того, дальнейшее исследование показало, что этот белок локализован в периплазматическом пространстве *E. coli*, т. е. транспортируется через цитоплазматическую мембрану, что значительно облегчает его выделение. Чем обусловлен транспорт гибридного белка Thy-TNF, остается пока неясным. В то же время было показано [21], что рекомбинантный интерлейкин-1 β также секретируется в периплазму *E. coli*.

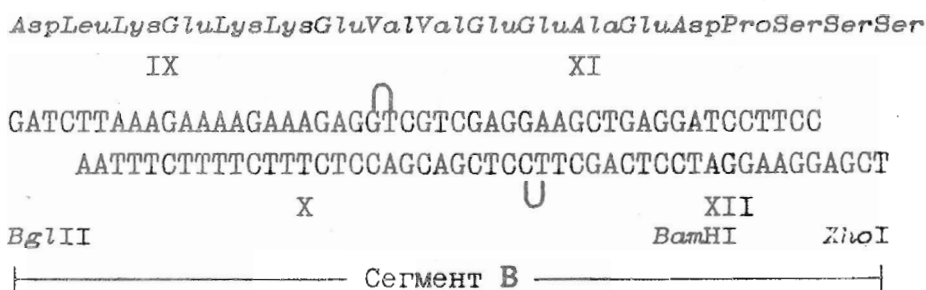


Рис. 6. Нуклеотидная последовательность двухцепочечной синтетической ДНК и кодируемая ею аминокислотная последовательность тимозина α_1 . Указаны сайты эндонуклеаз рестрикции. Дугами обозначены места соединения синтезированных олигонуклеотидов (IX)–(XII) в лигазных шпиквах

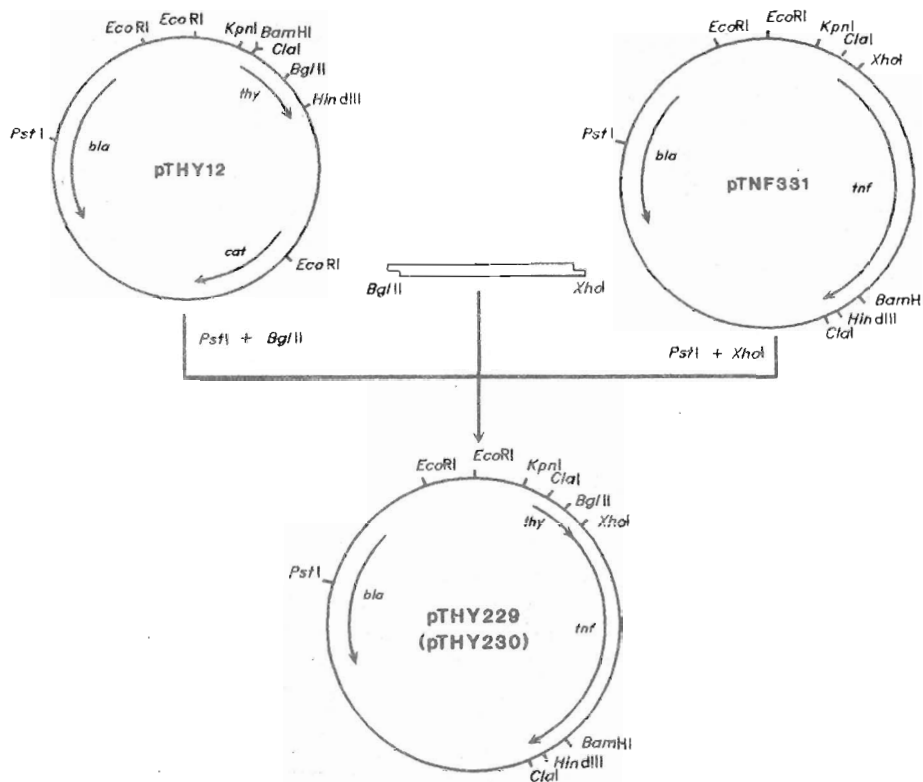


Рис. 7. Схема конструирования плазмиды pTHY230

Для выделения гибридного белка Thy–TNF сначала осмотическим шоком получали периплазматическую фракцию клеток *E. coli* SG20050, содержащих плазмиду pTHY230. После фракционирования сульфатом аммония гибридный белок очищали последовательно хроматографией на фенол-сефарозе и DEAE-целлюлозе (DE-52). В результате получили препарат белка более 95% чистоты (по данным SDS–ПААГ), который был устойчив длительное время при хранении в холодильнике при -20° .

Мы провели предварительное изучение биологических свойств рекомбинантных гибридных белков. При этом оказалось, что гибридный белок

...TAATTAATAAGGATATCATCGATATG... а

...TAATTTAATTTAAGGATTTATCGATATG... б

Рис. 8. Структура участков инициации трансляции гибридных генов в плаزمидах рТНУ229 (а) и рТНУ230 (б). Подчеркнуты последовательность Шайн - Дальгарно и иницирующий кодон

Thy-TNF обладал полной биологической активностью фактора некроза опухолей в цитотоксическом тесте [22] на трансформированных фибробластах мыши линии L-929 ($5 \cdot 10^7$ ед. акт./мг), в то время как гибридный TNF-Thy был значительно менее активным ($(1-2) \cdot 10^8$ ед. акт./мг). Полученные результаты подтверждают сделанные нами ранее выводы о важной роли С-концевой части TNF в проявлении биологической (цитотоксической) активности [15].

Таким образом, сконструированы искусственные гены, кодирующие гибриды TNF и тимозина α_1 , изучена экспрессия этих генов в *E. coli* и свойства кодируемых ими белков.

Авторы выражают благодарность В. Е. Жемчугову (Институт иммунологии госконцерна «Биопрепарат», п. Любучаны Московской обл.) за поликлональную кроличью антисыворотку против синтетического фрагмента 17-28 тимозина α_1 , О. А. Каурову и А. А. Колобову (ВНИИ ОЧБ госконцерна «Биопрепарат», Санкт-Петербург) за определение аминокислотного состава пептида, а также В. А. Куликову (Институт иммунологии госконцерна «Биопрепарат») за проведение N-концевого аминокислотного анализа.

Экспериментальная часть

В работе использовали дезоксинуклеозид-5'-трифосфаты (Pharmacia R-L, Швеция) и [γ - ^{32}P]гАТФ (5000 Ки/моль) фирмы Amersham (Англия); эндонуклеазы рестрикции *Bam*HI, *Bgl*II, *Cla*I, *Eco*RI, *Hind*III, *Pst*I, *Xho*I и ДНК-полимеразу I *E. coli* (фрагмент Кленова) производства НПО «Фермент» (Вильнюс), рестриктазы *Hae*III (*Bsp*I) и *Msp*I производства НПО «Вектор» (Бердск). ДНК-лигазу и полинуклеотидкиназу фага T4 выделили модифицированным способом [23]. Поликлональная кроличья антисыворотка против синтетического фрагмента 17-28 тимозина α_1 любезно предоставлена В. Жемчуговым (Институт иммунологии госконцерна «Биопрепарат», пос. Любучаны, Московская обл.); конъюгаты пероксидазы хрена с иммуноглобулинами лошади против кролика и мыши — производства фирмы «Агро-Био» (Москва). Моноклональные и поликлональные антитела против рекомбинантного TNF получали как описано в работе [20].

Синтез олигонуклеотидов выполняли твердофазным методом на автоматическом синтезаторе System 1 plus (Beckman, США) с использованием Н-фосфонатных синтонов, активируемых пивалоилхлоридом или адамантоилхлоридом, как описано в работе [24]. Олигонуклеотиды очищали с помощью электрофореза в ПААГ с последующей ВЭЖХ.

Лигирование олигонуклеотидов проводили по методике работы [20] с последующим выделением продуктов сшивки электрофорезом в денатурирующем ПААГ.

Клонирование и скрининг клонов осуществляли как описано в работе [25]. Нуклеотидную последовательность определяли твердофазным мето-

дом химических модификаций [17]. Белковый электроферез и иммуноблотинг выполняли по методикам, описанным в работах [26] и [20].

Выделение гибридных белков. Для выделения рекомбинантных белков клетки *E. coli* SG20050, содержащие соответствующую плазмиду, выращивали на богатой среде при 37°С в течение 18 ч. Клетки собирали центрифугированием в течение 20 мин при 6000 об/мин.

Для получения гибридного белка TNF-Thy клетки лизировали при помощи трехкратной процедуры замораживания при -70°С и оттаивания, затем центрифугировали 15 мин при 15 000 об/мин. Супернатант отбрасывали, а тельца включения очищали последовательной отмывкой 1, 2 и 3 М раствором мочевины. Полученный грубый препарат, содержащий, по данным SDS-ПААГ, 60-70% гибридного белка, растворяли в 7 М мочевины и хроматографировали на DEAE-целлюлозе (Merck, Германия) в 50 мМ Na-ацетатном буфере (рН 5,8) в присутствии 7 М мочевины; белок элюировали 150 мМ NaCl в том же буфере. Фракции, содержащие TNF - тимозин α_1 , наносили на колонку с голубой агарозой («Супер» (МП «Кемотех», Эстония) и элюировали градиентом рН от 5,8 до 7,8 в 30 мМ натрий-фосфатном буфере в присутствии 0,5 М NaCl и 7 М мочевины. В результате получали препарат гибридного белка $\approx 95\%$ чистоты (анализ SDS-ПААГ), который диализовали против 10 мМ натрий-фосфатного буфера (рН 7,2), содержащего 150 мМ NaCl.

Для получения тимозина α_1 препарат гибридного белка TNF-Thy растворяли в 70% муравьиной кислоте до концентрации 5-10 мг/мл и обрабатывали бромцианом (1 мг на 2 мг белка) при 20°С в течение 24 ч. Реакционную смесь разбавляли пятью объемами воды и растворитель упаривали на ротонном испарителе, повторяя разведение и упаривание 2-3 раза. Выпавший осадок отделяли центрифугированием и супернатант обессоливали на колонке с сефадексом G-25. Вещество первого пика собирали и наносили на высокоэффективную анионообменную колонку «Силасорб DEА» (СП «БиохимМак», Москва), уравновешенную 90 мМ натрий-фосфатным буфером, рН 6,8. Элюции проводили тем же буфером (рис. 4а). Фракции, содержащие тимозин α_1 , собирали, концентрировали упариванием в вакууме, обессоливали на колонке с сефадексом G-25 и полученный препарат дочичали на высокоэффективной колонке «Диасорб С-16» (СП «БиохимМак», Москва) в градиенте ацетонитрила в присутствии 0,1% трифторуксусной кислоты (рис. 4б). Фракции основного пика концентрировали упариванием в вакууме, растворяли в 50% уксусной кислоте и лиофилизировали. Гомогенность полученного препарата пептида проверяли аналитической ВЭЖХ (рис. 4в) и электрофоретически (рис. 5). Выход тимозина α_1 5-10 мг/л бактериальной культуры при плотности $5 \cdot 10^8$ клеток/мл.

Для выделения гибридного белка Thy-TNF сначала осмотическим шоком получали периплазматическую фракцию клеток *E. coli* SG20050, содержащих плазмиду рТНУ230. Затем к ней прибавляли сульфат аммония до 30% насыщения и выпавший осадок отделяли центрифугированием (10 мин при 8000g). К супернатанту прибавляли сульфат аммония до 45% насыщения, полученный раствор наносили на колонку с фенил-сефарозой (Pharmacia, Швеция), после чего колонку промывали обратным градиентом концентрации сульфата аммония (45-0%) в 20 мМ Na-фосфатном буфере (рН 6,0). Белок элюировали тем же буфером, содержащим 7 М мочевицу (буфер А). Фракции, содержащие гибридный белок, наносили на колонку с целлюлозой DE-52, уравновешенной буфером А (рН 7,2). Белок элюировали градиентом концентрации NaCl (0-250 мМ) в том же буфере. Фракции, содержащие белок Thy-TNF, диализовали против 150 мМ NaCl, 10 мМ Na-фосфатного буфера, рН 7,2, и хранили при -20°С.

Цитотоксичность гибридных белков определяли по методу [22].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hooper J. A., McDaniel M. C., Thurman G. B., Cohen G. H., Schulof R. S., Goldstein A. L. // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1975. V. 24. № 1. P. 125-127.
2. Wetzel R., Heyneker H. L., Goedel D. V., Jhurani P., Crea R., Low T. L. K., McClure J. E., Thurman G. B., Goldstein A. L. // Biochemistry. 1980. V. 19. № 26. P. 6096-6104.
3. Campbell N. M., Maizel A. L. // Immunopharmacology. 1988. V. 16. № 2. P. 97-105.
4. Serrate S. A., Schulof R. S., Leonardis L., Goldstein A. L., Sztein M. B. // J. Immunol. 1987. V. 139. № 7. P. 2338-2343.
5. Leihling K. D., Serrate S. A., Sztein M. B. // Int. J. Immunopharmacol. 1990. V. 12. № 1. P. 19-29.
6. Ohta Y., Tezuka E., Tamura S., Sugarawa M., Nihira M., Imai S., Yagi Y. // J. Biol. Resp. Modif. 1987. V. 6. № 2. P. 181-193.
7. Low T. L. K., Goldstein A. L. // Thymic Hormones, Lymphokines. Basic Chem. Clin. Appl. / Ed. A. L. Goldstein. New York, London: Plenum Press, 1984. P. 21-35.
8. Baxevasis C. N., Reulos G. J., Perez S., Kokkinopoulos D., Papamichail M. // Immunopharmacology. 1987. V. 2. № 2. P. 133-141.
9. Sztein M. B., Serrate S. A. // Int. J. Immunopharmacol. 1989. V. 11. № 7. P. 789-800.
10. Goldstein A. L., Wang S. S. // Eur. Pat. Appl. 1987. EP 246, 829.
11. Salvin S. B., Neta R. // Cell. Immunol. 1983. V. 75. № 1. P. 160-172.
12. Kaplan F. D., Wofsy C. B., Volberding R. A. // J. Amer. Med. Assoc. 1987. V. 257. № 8. P. 1367-1374.
13. Ishitsuka H., Umeda Y., Tezuka E., Ohta Y., Yagi Y. // Thymic Hormones Lymphokines Basis Chem. Clin. Appl. / Ed. A. L. Goldstein. New York, London: Plenum Press, 1984. P. 425-438.
14. Goldstein A. L., Low T. L. K., McAdoo M., McClure J., Thurman G. B., Rossio L. J., Lai C.-Y., Chang D., Wang S.-S., Harvey C., Ramel A. H., Meienhofer J. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. № 2. P. 725-729.
15. Gase K., Korobko V. G., Wisniewski H. G., Le J., Dobrynin V. N., Filippov S. A., Gutsche W., Maksimova Y. N., Schlott B., Shingarova L. N., Vilcek J., Behnke D. // Immunology. 1990. V. 71. № 3. P. 368-371.
16. Коробко В. Г., Болдырева Е. Ф., Некрасова О. В., Микутьский А., Филиппов С. А., Добрынин В. Н. // Биооргани. химия. 1991. Т. 17. № 4. С. 461-469.
17. Чувило С. А., Кравченко В. В. // Биооргани. химия. 1983. Т. 9. № 12. С. 1634-1637.
18. Добрынин В. Н., Калинин С. В., Фархутдинов М. Р., Филиппов С. А., Коробко В. Г. // Биооргани. химия. 1989. Т. 15. № 9. С. 1232-1238.
19. Doria G., Frasca D. // New Trends Aging Res. 1988. V. 15. № 1. P. 121-125.
20. Добрынин В. Н., Беркова Н. П., Болдырева Е. Ф., Быстров Н. С., Кравченко В. В., Филиппов С. А., Чувило С. А., Шамборант О. Г., Коробко В. Г. // Биооргани. химия. 1988. Т. 14. № 11. С. 1530-1537.
21. Yet A. W., Curry K. A., Tomich C. S.-C., Diebel M. R. // Immunol. Invest. 1988. V. 17. № 6-7. P. 551-559.
22. Meager A., Leung H., Woolley J. // J. Immunol. Meth. 1989. V. 116. № 1. P. 1-17.
23. Долганов Г. М., Chestukhin A. M., Shemyakin M. F. // Eur. J. Biochem. 1981. V. 114. № 2. P. 247-254.
24. Филиппов С. А., Есинов Д. С., Калинин С. В., Добрынин В. Н. // Биооргани. химия. 1989. Т. 15. № 4. С. 527-529.
25. Коробко В. Г., Добрынин В. Н., Северцова И. В., Болдырева Е. Ф., Шингарова Л. Н., Чувило С. А., Филиппова Л. Ю., Звонок Ч. М., Васильева Т. Е., Колосов М. Н. // Биооргани. химия. 1987. Т. 13. № 1. С. 69-81.
26. Laemmli U. K. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680-685.

Поступила в редакцию
29.X.1991

V. G. KOROBKO, E. F. BOLDYREVA, [S. A. FILIPPOV], N. P. BERKOVA,
V. N. DOBRYNIN, V. A. SHMELYOV, S. G. POPOV, S. I. EVSEGNIEV,
L. Yu. NOSOVA

SYNTHESIS OF ARTIFICIAL GENE ENCODING THYMOSIN α_1 AND ITS
EXPRESSION IN *ESCHERICHIA COLI* AS FUSION PROTEINS WITH
HUMAN TUMOUR NECROSIS FACTOR

M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
Moscow

Chemical-enzymatic synthesis and cloning in *Escherichia coli* of an artificial gene encoding the immunoreactive peptide thymosin α_1 have been carried out. Recombinant

plasmids were constructed which contain fusion genes coding for hybrids of human tumour necrosis factor (TNF) and thymosin α_1 as N- or C-terminal part of the hybrid protein. In the C-terminal hybrid protein, TNF and thymosin α_1 are linked through a methionine residue, thus allowing for thymosin α_1 to be cleaved off the rest of the hybrid protein with cyanogen bromide. In case of the N-terminal hybrid protein, the linker between the thymosin α_1 and TNF sequences is the acid-labile dipeptide Asp-Pro. Expression of the hybrid genes in *E. coli* and properties of the recombinant proteins were studied. The N-terminal hybrid protein was secreted into periplasmic space, in contrast with the C-terminal hybrid protein, which formed insoluble aggregates inside bacterial cells. Procedures for the isolation of both hybrid proteins were developed. The N-terminal hybrid protein displayed full biological activity in the cytotoxic assay on the mouse fibroblast L-929 whereas the C-terminal hybrid protein proved to be much less active. Treatment of the hybrid protein TNF-thymosin α_1 with cyanogen bromide lead to a mixture of two polypeptides, from which thymosin α_1 was purified to homogeneity by simple chromatographic procedures.