



УДК 577.112.6:577.175.8'17

ГЕНО-ИНЖЕНЕРНЫЙ ОКСИТОЦИН: ВЫДЕЛЕНИЕ ОКСИТОЦИНОИЛЛИЗИНА

© 1995 г. Т. В. Овчинникова, Т. И. Муравьева, Л. А. Чупова,
А. А. Тагаев, Н. Ю. Мартынова, А. И. Мирошников*

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 06.03.95 г.

Из клеток штамма *E. coli* TG1/pTOTE_{ilo}x выделен гибридный белок II-Ох-К, N-концевая последовательность которого (63 аминокислотных остатка) представляет собой фрагмент человеческого интерлейкина-3, а C-концевая – аминокислотную последовательность окситоцина, фланкированную остатком лизина. После триптического гидролиза гибридного белка II-Ох-К, предварительно модифицированного с помощью сульфитолиза, выделен окситоциноил-Lys, содержащий остатки S-сульфоцистеина. Модифицированный окситоциноил-Lys переведен в форму с дисульфидной связью Cys¹Cys⁶. Фактом выделения генно-инженерного окситоциноил-Lys подтверждена возможность получения коротких пептидов микробиологическим синтезом.

Ключевые слова: нейрогормон; окситоцин; гибридный белок; выделение и очистка; аминокислотная последовательность.

Окситоцин – нейрогормон пептидной природы, продуцируемый нейросекреторными клетками гипоталамуса, накапливающийся в задней доле гипофиза и обладающий широким спектром биологического действия [1, 2]. Он вызывает сокращение гладких мышц матки и, в меньшей степени, мышц кишечника, желчного и мочевого пузыря, мочеточника, а также стимулирует лактацию [3, 4]. Имеются данные о влиянии гормона на углеводный, жировой и белковый обмен в печени и жировой ткани [5]. Окситоцин обладает также нейротропным действием [6]. Благодаря этим свойствам окситоцин находит широкое применение в медицине и ветеринарии [7].

Cys-Tyr-Ile-Gln-Asn-Cys-Pro-Leu-Gly-NH₂ (Ох)

Гормон состоит из 9 аминокислотных остатков, причем остатки цистеина образуют дисульфидную связь, а C-концевой остаток глицина амидирован [2]. Строение окситоцина было подтверждено химическим синтезом [8].

Окситоцин получают из гипофиза сельскохозяйственных животных. Однако трудности выделения и очистки природного гормона из дорогостоящего и дефицитного животного сырья делают его малодоступным. На практике чаще используется окситоцин, полученный химическим путем. Недостаток химического метода – его трудоем-

кость и необходимость очистки препарата от сопутствующих примесей, присутствие которых связано с незначительными выходами продуктов реакций на различных стадиях пептидного синтеза. По нашему мнению, более перспективен способ получения окситоцина, включающий в себя микробиологический синтез гибридного белка с последующей его трансформацией, что дает возможность выделения целевого продукта с высоким выходом из недорогого сырья.

Настоящая работа – часть проводимых в ИБХ РАН исследований по конструированию рекомбинатных плазмидных ДНК, кодирующих гибридные белки, содержащие аминокислотную последовательность окситоцина [9]. Предложен метод получения рекомбинатной плазмидной ДНК pTOTE_{ilo}x, содержащей синтетический ген гибридного белка, N-концевая последовательность которого (63 аминокислотных остатка) представляет собой фрагмент человеческого интерлейкина-3, а C-концевая часть – аминокислотную последовательность окситоцина (подчеркнута), фланкированную остатком лизина, что необходимо, имея в виду последующее получение tandemных Ох-К.

Таким образом, гибридный белок (II-Ох-К) должен состоять из 73 аминокислотных остатков:

1 MAPMTQTTS¹SLKTSWVNC²SNMIDE³II-
THLKQPPLPL⁴LLDFNNLNGEDQDILM-
51 ENNLRPNLEASKCYIQNCPLGK,

Сокращения: II-Ох-К – гибридный белок, Ох – окситоцин.

*Автор для переписки.

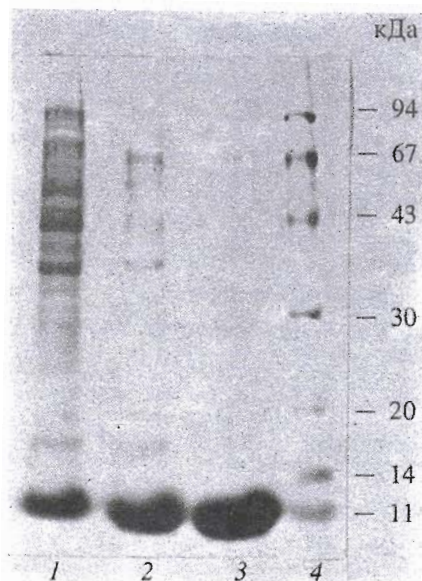


Рис. 1. Электрофорез в ПААГ клеточных белков штамма-продуцента *E. coli* TG1/pTOTEilox (1); гибридного белка II-Ох-К в экстракте с 4 М мочевиной (2); гибридного белка после хроматографии на DEAE-целлюлозе (3); маркеров молекулярных масс (4).

его молекулярная масса должна составлять около 9 кДа. Получен штамм *E. coli* TG1/pTOTEilox – продуцент гибридного белка, содержащего аминокислотную последовательность окситоцина.

Цель настоящей работы – выделение из клеток продуцента искомого гибридного белка, содержащего окситоциноил-Lys, его ферментативное расщепление, очистка генно-инженерного аналога окситоцина и изучение его свойств. Штамм-продуцент выращивали при 37°C в YT-бульоне, индуцировали изопропилтио-β-D-галактозидом и продолжали процесс до достижения оптического поглощения A_{550} 0.7 - 0.8. В этих условиях содержание целевого продукта в клетках продуцента достигает 20 - 25% суммарного клеточного белка. При индукции изопропилтио-β-D-галактозидом происходит эффективный биосинтез гибридного белка II-Ох-К, который накапливается в клетках в виде телец включения, что соответствует данным, полученным для других генно-инженерных гибридных белков [10].

После разрушения клеток с помощью проточного дезинтегратора при высоком давлении тельца включения отделяли центрифугированием с дальнейшей отмывкой примесей буфером, содержащим тритон X-100. Из 1 г биомассы клеток штамма-продуцента получали около 600 мг отмывтых телец включения. Содержание целевого гибридного белка и эффективность отмывок телец включения контролировали с помощью диск-электрофореза в ПААГ по методу Леммли [11]. Гибридный белок идентифицировали на эле-

ктрофореграмме по рассчитанной теоретически молекулярной массе. Сканированием электрофореграммы с помощью лазерного денситометра "Ultrascan 2202" (LKB) было показано, что содержание гибридного белка в тельцах включения после отмывок составляет около 30%.

Следующим этапом выделения гибридного белка II-Ох-К является его экстракция из телец включения, что наиболее просто осуществляется с использованием кипящей воды. После фильтрации горячего экстракта белок при медленном охлаждении выпадает в осадок. Однако при этом выход гибридного белка незначителен. С целью повышения выхода целевого продукта в опытах варьировали pH буферного раствора и содержание в нем мочевины, температуру и время экстракции. Наивысший выход гибридного белка был получен при экстракции 4 М мочевиной в буферном растворе с pH 8.0 в присутствии 5 мМ β-меркаптоэтанола в течение 20 мин при 80°C. Добавление β-меркаптоэтанола способствовало переходу гибридного белка в растворимое состояние, что, по-видимому, связано с восстановлением межмолекулярных дисульфидных мостиков [10]. При данных условиях экстракции 80 - 85% суммарного белка телец включения переходит в раствор. Присутствие в экстракте искомого гибридного белка было подтверждено методом электрофореза в ПААГ (рис. 1). Содержание II-Ох-К в экстракте по данным, полученным при сканировании геля на лазерном денситометре, составляет 60 - 65% суммарного белка.

Дальнейшая очистка гибридного белка проводилась методом ионообменной хроматографии на колонке с DEAE-целлюлозой при pH 6.5 в присутствии β-меркаптоэтанола. В выбранных условиях искомым белком не связывался с сорбентом, в то время как балластные белки сорбировались на колонке. Электрофорез выделенного гибридного белка в 15% ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия показал, что он содержит доминирующую зону с молекулярной массой около 9 кДа (рис. 1). Количество гибридного белка, определяемое с помощью лазерной денситометрии электрофореграммы, составляет около 90% суммарного белка. Для доказательства тождественности выделенного белка гибриднему белку II-Ох-К на автоматическом газофазном секвенаторе была определена его N-концевая аминокислотная последовательность (7 аминокислотных остатков), которая соответствовала N-концевой последовательности интерлейкина-3 человека [12].

Выделению окситоциноил-Lys предшествовал триптический гидролиз гибридного белка II-Ох-К.

С целью повышения растворимости гибридного белка и во избежание образования межмолекулярных дисульфидных связей в отсутствие восстанавливающих агентов перед трипсинолизом был

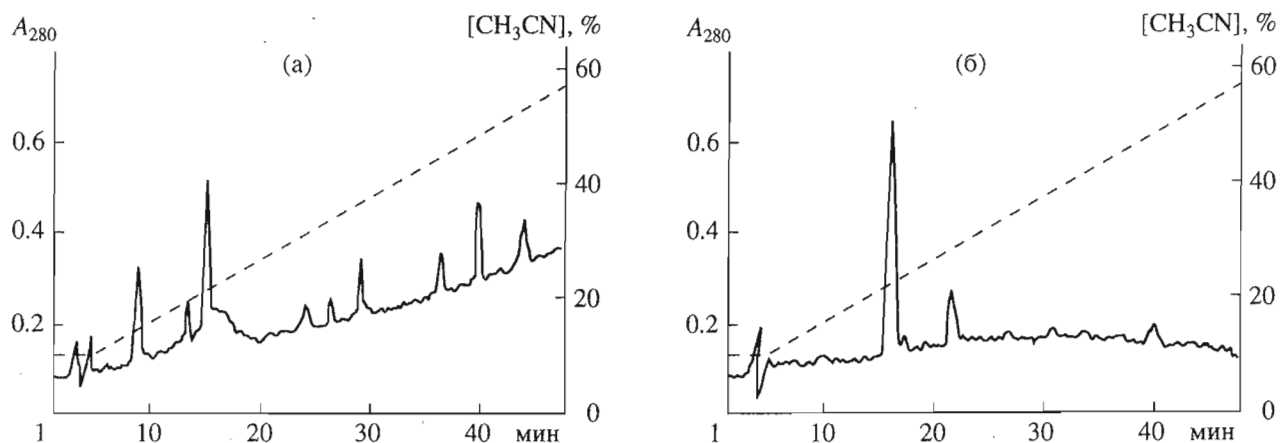


Рис. 2. Обращенно-фазовая ВЭЖХ на колонке SGX RPS (Separon, Чехо-Словакия) триптического гидролизата гибридного белка II-Ох-К (а) и синтетического окситоциноил-Lys (б), модифицированных с помощью сульфитолиза.

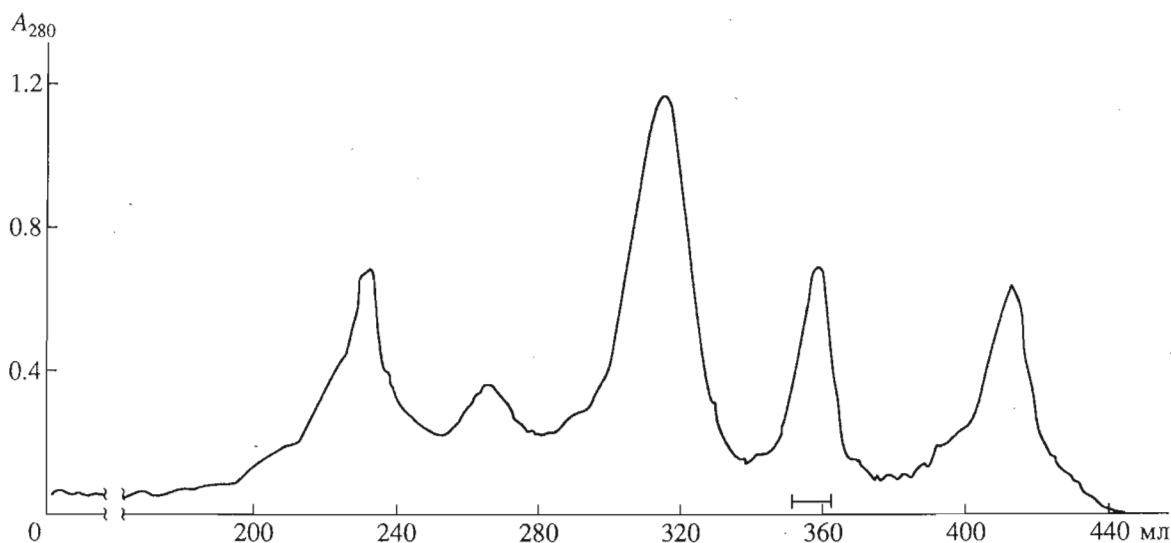


Рис. 3. Гель-фильтрация триптического гидролизата гибридного белка II-Ох-К на сефадексе G-50 (тонкий). Указаны границы объединения фракции, обогащенной окситоциноил-Lys.

проведен сульфитолиз с образованием S-сульфо-производного гибридного белка, в котором остаток цистеина превращены в остатки S-сульфоцистеина. Сульфитолиз проводили путем обработки белка Na_2SO_3 в присутствии тетрагидрата натрия [13]. Контроль за ходом реакции вели с помощью электрофореза в 15% ПААГ в отсутствие додецилсульфата натрия и β -меркаптоэтанола. Через 15 ч зона исходного гибридного белка II-Ох-К исчезала полностью.

На основании результатов ряда аналитических опытов были предложены следующие оптимальные условия триптического гидролиза гибридного белка, модифицированного с помощью сульфитолиза: концентрация белка в растворе 5 - 10 мг/мл; соотношение фермент-субстрат 1 : 50; pH 8.5; время 5 ч; температура 37°C. Электрофорез в 15% ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия показал, что в полученном таким образом

гидролизате отсутствует исходный модифицированный продукт. Наличие в гидролизате искомого модифицированного окситоциноил-Lys было подтверждено с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке SGX RPS (Separon), причем в качестве стандарта использовали синтетический окситоциноил-Lys, предварительно подвергнутый сульфитолизу (рис. 2). Присутствие модифицированного окситоциноил-Lys в соответствующей стандарту фракции триптического гидролизата было подтверждено N-концевым и аминокислотным анализом, а также определением аминокислотной последовательности пептида на автоматическом газофазном секвенаторе.

Для препаративного выделения целевого продукта нами была предложена следующая схема: гель-фильтрация триптического гидролизата на сефадексе G-50F (тонкий) (рис. 3), а затем очистка фракции, обогащенной модифицированным

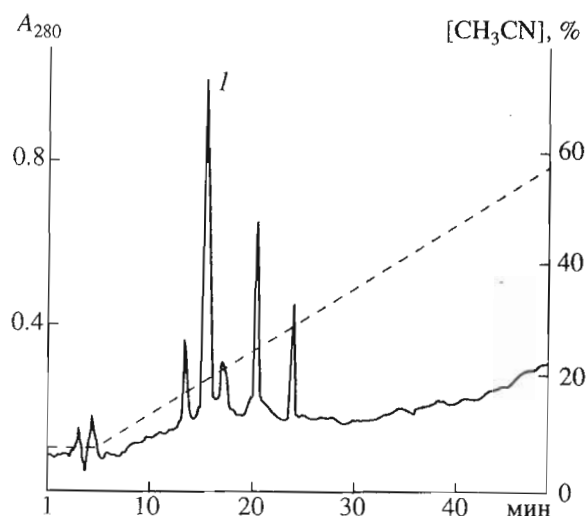


Рис. 4. Обратенно-фазовая ВЭЖХ фракции, обогащенной окситоциноил-Lys после гель-фильтрации, на колонке SGX C-18 (Separon, Чехо-Словакия). Пик 1 – модифицированный окситоциноил-Lys.

окситоциноил-Lys, с помощью обратенно-фазовой ВЭЖХ на колонке SGX C-18 (Separon, Чехо-Словакия) в градиенте концентрации ацетонитрила (рис. 4), причем искомый пептид содержался

во фракции, соответствующей основному пику на хроматограмме. Чистота препарата составляла не менее 95%.

С целью образования дисульфидной связи полученный модифицированный окситоциноил-Lys выдерживали при pH 10.0 в присутствии избытка цистеина [14]. В течение 5 ч значительная часть модифицированного пептида переходит в форму с дисульфидной связью Cys^1Cys^6 . Контроль за ходом реакции осуществляли с помощью обратенно-фазовой ВЭЖХ (рис. 5). В качестве стандарта использовали синтетический окситоциноил-Lys.

Таким образом, выделен генно-инженерный окситоциноил-Lys, что доказывает возможность получения такого короткого пептида микробиологическим синтезом в бактериальной клетке. Строение выделенного окситоциноил-Lys подтверждено аминокислотным анализом, а также определением аминокислотной последовательности на автоматическом газофазном секвенаторе. Удаление С-концевого лизина из окситоциноил-Lys с помощью карбоксипептидазы В с последующим химическим амидированием С-концевого глицина – следующий этап работы по получению генно-инженерного окситоцина.

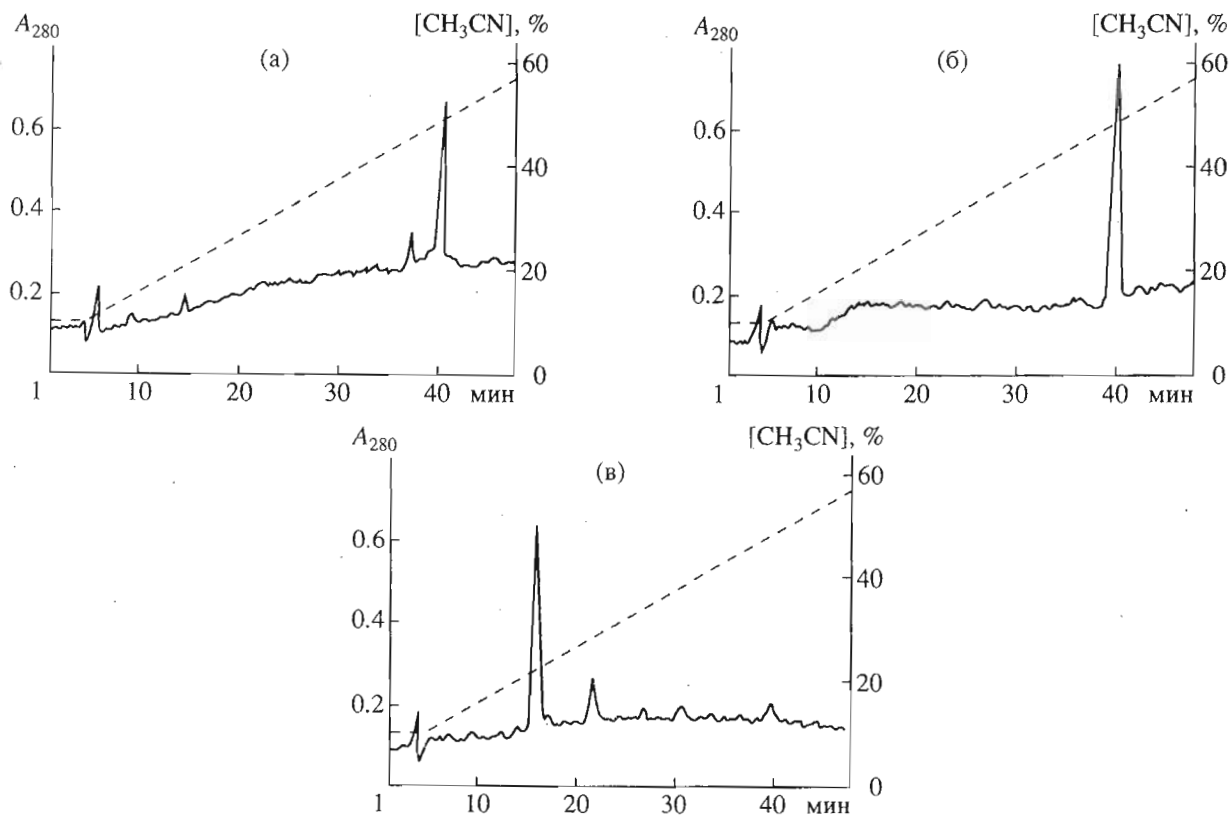


Рис. 5. Обратенно-фазовая ВЭЖХ на колонке SGX C-18 (Separon, Чехо-Словакия) препарата окситоциноил-Lys после образования дисульфидной связи Cys^1Cys^6 (а). В качестве стандартов использованы синтетический окситоциноил-Lys, содержащий дисульфидную связь (б) и модифицированный с помощью сульфитолиза (в).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали следующие реактивы: β-меркаптоэтанол, персульфат аммония, N,N'-метиленбисакриламид, TEMED (Bio-Rad, США); тритон X-100, трис (Merck, Германия); Na₃-EDTA, акриламид, додецилсульфат натрия, трипсин (Serva, Германия); стандарты молекулярных масс для электрофореза, сефадекс G-50F (Pharmacia, Швеция); DEAE-целлюлозу DE-52 (Whatman, Англия); сульфит натрия, бикарбонат аммония, глицин, цистеин, ацетонитрил (все х. ч.); NaCl, мочевины (оба ос. ч.), тетрагидрат натрия (синтезирован).

Условия культивирования штамма-продуцента *E. coli* TG1/pTOTE10x. Клетки выращивали при 37°C в YT-бульоне (0.5% дрожжевой экстракт, 0.8% триптон, 0.5% NaCl, pH 7.0) с 50 мкг/мл ампициллина в течение 2 ч до оптического поглощения A₅₅₀ 0.7 - 0.8, прибавляли изопропилтио-β-D-галактозид до концентрации 0.2 мМ и продолжали процесс культивирования еще 6 ч, после чего клетки осаждали центрифугированием при 6000 об/мин.

Электрофорез белков в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия проводили по методу Леммли [10] на пластинах размером 9 × 8 см при толщине геля 1.2 мм с использованием 5% формирующего геля и 15% рабочего геля при силе тока 10 - 20 мА. Денситометрию геля осуществляли на лазерном денситометре "Ultrascan 2202" (LKB, Швеция).

Концентрацию белка в растворах определяли по методу Лоури [15]. При высоких концентрациях β-меркаптоэтанол в растворе белки предварительно осаждали 12.5% трихлоруксусной кислотой.

Выделение гибридного белка: сырую биомассу (200 г) суспендировали в буферном растворе А (50 мМ трис-HCl, pH 8.0, 200 мМ NaCl, 1 мМ EDTA) в соотношении 1 : 100 (вес/объем) и разрушали в проточном дезинтеграторе Gaulin (США). Для этого суспензию пропускали 4 - 5 раз через дезинтегратор при давлении 800 атм, предварительно каждый раз охлаждая суспензию до 4°C. После дезинтеграции клеточную суспензию центрифугировали с охлаждением 45 мин при 15000g (центрифуга Beckman G-21). Осадок суспендировали в буферном растворе Б (буферный раствор А, 1% тритон X-100) и вновь центрифугировали в тех же условиях. Затем повторяли ту же операцию с буферным раствором А.

Экстракцию гибридного белка проводили в течение 20 мин буферным раствором А, содержащим 3 мМ β-меркаптоэтанол, 4.0 М мочевины, при 80°C; соотношение осадка и буферного раствора 1 : 10 (вес/объем). После экстракции суспензию центрифугировали 45 мин при 50000g (центрифуга Beckman G-21). Полученный супернатант разбавляли в 4 раза буферным раствором pH 6.5, содержащим 20 мМ трис-ацетат, 3 мМ

β-меркаптоэтанол, 1 мМ EDTA, наносили на колонку (3 × 40 см) с DEAE-целлюлозой DE-52 и собирали фракцию, не адсорбированную ионообменником.

Сульфитолиз. Гибридный белок, полученный после DEAE-целлюлозы, осаждали сульфатом аммония (50% насыщения). Осадок растворяли в 7.5 М мочевины, содержащей 50 мг/мл Na₂SO₃ и 25 мг/мл тетрагидрата натрия, и доводили pH до 9.0 с помощью 5 н. NaOH. Концентрация белка в растворе составляла 10 - 15 мг/мл. Суспензию интенсивно перемешивали 15 ч при 20°C. После окончания реакции смесь разбавляли в 3 - 4 раза дистиллированной водой и белок повторно осаждали сульфатом аммония.

Гидролиз гибридного белка трипсином. После сульфитолиза гибридный белок растворяли в 0.1 мМ аммоний-бикарбонатном буферном растворе (pH 8.5), добавляли трипсин в 2 приема с интервалом 1 ч до конечного соотношения фермент-субстрат 1 : 50, выдерживали 5 ч при 37°C. Реакционную смесь разбавляли в 2 раза 10 мМ трис-ацетатным буфером (pH 6.5), и упаривали на роторном испарителе досуха.

Фракционирование продуктов триптического гидролиза. Полученный сухой остаток растворяли в буферном растворе В (20 мМ трис-ацетат, pH 6.5, 200 мМ NaCl) и наносили на колонку (1 × 100 см) с сефадексом G-50 (тонкий), уравновешенную буферным раствором В. Элюировали тем же буфером со скоростью 20 мл/ч. Фракцию, обогащенную окситоциноил-Lys, собирали и хроматографировали на колонке (8 × 250 мм) SGX C-18 (7 мкм; Serapop, Чехо-Словакия), уравновешенной буферным раствором Г (5% ацетонитрила, 0.1% TFA в воде). Разделение проводили в градиенте концентрации ацетонитрила (от 10% буферного раствора Г до 70% буферного раствора Д (80% ацетонитрила, 0.1% TFA в воде)). Скорость потока 1.6 мл/мин.

Образование дисульфидной связи. Раствор пептида упаривали досуха на роторном испарителе, растворяли в 0.05 М трис-глициновом буферном растворе, pH 10.0 (концентрация пептида 50 - 60 мкг/мл), добавляли раствор цистеина до концентрации 2 мМ и выдерживали 5 ч при 4°C и pH 10.0.

Анализ образцов на содержание окситоциноил-Lys проводили с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке (8 × 250 мм) SGX RPS (7 мкм; Serapop, Чехо-Словакия), уравновешенной буферным раствором Г. Разделение проводили в градиенте концентрации ацетонитрила от 10% буферного раствора Г до 70% буферного раствора Д. Скорость потока 2 мл/мин.

N-Концевые аминокислотные остатки определяли дансильным методом [16]. Аминокислотный состав окситоциноил-Lys устанавливали с

помощью аминокислотного анализатора Biotropic-6000 (Германия). Аминокислотную последовательность определяли на автоматическом газожидком секвенаторе Applied Biosystems 470A (США).

Настоящая работа выполнена в рамках государственной научно-технической программы РФ "Новейшие методы биоинженерии".

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lederis K. // Gen. Compar. Endocrinol. 1961. V. 1. P. 80 - 86.
2. Du Vigneaud V. // Science. 1956. V. 123. P. 9657 - 9674.
3. Du Vigneaud V., Ressler Ch., Trippet S. // J. Biol. Chem. 1953. V. 205. P. 949 - 957.
4. Dale H.H. // Biochem. J. 1909. V. 4. P. 427 - 447.
5. Петерсоне О.С., Чипенс Г.И., Михайлова С.В. Нейрогипофизарные гормоны. Рига: Зинатне, 1986. С. 52 - 63.
6. Бахарев В.Д., Тихомиров С.М., Ложникова Т.К. // Проблемы эндокринологии. 1984. Т. XXX. С. 37 - 41.
7. Машковский М.Д. Лекарственные средства. Т. 2. М.: Медицина, 1985. С. 72.
8. Du Vigneaud V., Ressler Ch., Swan J.M., Roberts C.W., Katsoyannis P.G. // J. Amer. Chem. Soc. 1954. V. 76. P. 3115 - 3121.
9. Гуревич А.И., Качалина Т.А., Каюшин А.Л., Коростелева М.Д., Мирошников А.И. // Биоорганическая химия. 1993. Т. 19. С. 629 - 632.
10. Fisher B., Sumner J., Goodenough P. // Biotechnol. Bioeng. 1993. V. 43. P. 3 - 13.
11. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680 - 685.
12. Гуревич А.И., Скапцова Н.В., Луценко С.В., Смирнов В.А., Куркин А.Н., Ажаев А.В. // Биоорганическая химия. 1991. Т. 17. С. 647 - 652.
13. Bailey J.L., Coll R.D. // J. Biol. Chem. 1959. V. 234. P. 1733 - 1739.
14. Furman T.C., Epp J.H., Hoskins J.A., Long G.L., Mendelsohn L.G., Schoner B., Smith D.P., Smith M.C. // Bio Technol. 1987. V. 5. P. 1047 - 1051.
15. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. P. 265 - 275.
16. Hartley B.S. // Biochem. J. 1970. V. 119. P. 805 - 822.

Genetic Engineering Preparation of Oxytocinoyllysine

T. V. Ovchinnikova, T. I. Murav'eva, L. A. Chupova,
A. A. Tagaev, N. Yu. Martynova, and A. I. Miroshnikov¹

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117871 Russia*

Abstract – A hybrid protein, II-Ox-K, was obtained from cells of *E. coli* TG1/pTOTEilox strain. The N-terminal sequence of this protein (63 amino acid residues) is a fragment of human interleukin-3, and the C-terminal sequence represents the full amino acid sequence of oxytocin flanked by a lysine residue. The modified oxytocinoyl-Lys containing S-sulfocysteine residues was isolated after tryptic digestion of S-sulfoderivative of the hybrid protein. The modified peptide was converted into the cyclic form containing the disulfide bonds Cys¹Cys⁶. Obtaining the oxytocinoyl-Lys proves the possibility of preparing short peptides using the micro-biological synthesis.

Key words: neurohormone; oxytocin; hybrid protein; isolation and purification; amino acid sequence.

¹ To whom correspondence should be addressed.