



УДК 577.113.4:577.112.5

## ХИМИЧЕСКИЙ СИНТЕЗ ГЕНА ИНГИБИТОРА ПРОТЕИНАЗ (ЭГЛИН С) БЕЗ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ Т4-ДНК-ЛИГАЗЫ И ЕГО ЭКСПРЕССИЯ В *E. coli*

© 1995 г. В. П. Вейко, А. С. Осипов, И. И. Шехтер, М. Т. Буленков, К. И. Ратманова, Л. Б. Гулько, Н. А. Чибискова, Л. Л. Эррайс, Е. Б. Деревщикова, В. Г. Дебабов

Научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Москва

Поступила в редакцию 21.12.94 г.

Синтетический ген ингибитора протеиназ (эглин С), полученный прямой амплификацией из олигонуклеотидов без использования ДНК-лигазы и полинуклеотидкиназы фага Т4, клонирован в экспрессионных векторах. Целевой полипептид выделен в гомогенном состоянии. Достигнут высокий уровень продукции (110 - 130 мг/л) полипептида в штаммах *E. coli*.

*Ключевые слова:* эглин С, амплификация, экспрессия, *Escherichia coli*.

Эглины В и С (70-звенные полипептиды, различающиеся только одной аминокислотной заменой Н35У) – белковые ингибиторы протеиназ, выделенные из пиявок *Hirudo medicinalis* [1]. Они эффективно ингибируют  $\alpha$ -химотрипсин, химазу, субтилизин, протеиназы нейтрофилов (эластазы и катепсин G). По своим ингибирующим свой-

ствам эглин С, аминокислотная последовательность которого приведена ниже [2], аналогичен эндогенным ингибиторам протеиназ человека –  $\alpha$ 2-макроглобулину и  $\alpha$ 1-антитрипсину, служащим в норме для защиты нижних дыхательных путей от протеолитического действия эластазы из нейтрофилов [3].

1                    10                    20                    30                    40                    50                    60  
TEFGSELKSFPEVVGKTVDQAREYFTLHYPQYHVYFLPEGSPVTLDLRYNRVRVFYNPQT  
70  
NVVNHVPHVG

Эглин С

В случае нарушения баланса эластазы и эндогенных ингибиторов, что может быть обусловлено генетически, развиваются воспалительные процессы в тканях легких, а также в печени, суставах, поджелудочной железе [4]. В экспериментах на животных с модельной эмфиземой или общим сепсисом показано, что эглин С является эффективным терапевтическим средством [5, 6]. Показано также, что рекомбинантный и аутентичный эглины С имеют идентичные физико-химические и биологические свойства [7].

Кроме того, эглин С, несмотря на отсутствие дисульфидных связей внутри молекулы, высокоустойчив к термо- и кислотной денатурации [8]. Это свойство эглина С, а также установленная на

основе рентгеноструктурного анализа третичная структура полипептида [9] позволяют использовать его в качестве модельной системы при проведении работ в белковой инженерии: мы предполагаем клонирование фрагментов структурной части гена  $\alpha$ 2-интерферона человека в составе гена эглина С. При этом достаточно устойчивая третичная структура эглина (как белка-носителя) должна обеспечить конформационное подобие нативному состоянию введенного фрагмента интерферона. Изучение свойств химерных белков может способствовать выяснению структурно-функциональных отношений в интерферонах.

В настоящей работе мы сообщаем о химическом синтезе гена ингибитора протеиназ (эглин С) и его экспрессии в *E. coli*.

Общая схема синтеза гена эглина С представлена на рис. 1, а структуры используемых синтетических олигонуклеотидов приведены ниже.

Символ "d" в формулах дезоксирибоолигонуклеотидов опущен.

Адрес для переписки: 113545, Москва, 1-й Дорожный пр., д. 1, Вейко В.П.

## Синтетические олигонуклеотиды, использованные в работе

1. TATGAATTCGAACAGGAGACTTCTGATGACTGAATTTGGTTCTGAGCTGAAATC-TTCCCGGAAG
2. TTGTTGGTAAAACSTGTTGACCAGGCTCGTGAATACTTCACTCTGCACTACCCGCA-GTACGACGTTTAC
3. TTCCTGCCGGAGGGTTCCTCCGGTTACTCTGGACCTGCGTTACAACCGTGTTCTGTG-TTTTCTACAAC
4. CCAGGTAATAACGTTAACCATGTACCGCACGTTGGTTAG
5. AACAGTTTTACCAACAACSTTCCGGGAAAGATTTCA
6. CCCTCCGGCAGGAAGTAAACGTCGTA CTGC
7. CTACGTTAGTACCTGGGTTGTAGAAAACACG
8. TTTTGGATCCCTAACCAACGTCGCGTAC
9. TTTTGGATCCATGACTGAATTTGGTTCTGAGCTGAAATCTTCCCGGAAG
10. TTTTTTCGAACTAACCAACGTCGCGG
11. TTTTGAGCTCCTGCAGAATGAAG
12. TTTTGGATCCCTCCTCTGTGAATC

Первым этапом работы являлся синтез гена эглина С, содержащего фланкирующие части, введение которых позволяло проводить конструирование целевых экспрессионных плазмид, несущих ген полипептида.

В литературе описаны варианты сборки синтетических структур ДНК либо "классическим" лигированием с применением Т4-ДНК-лигазы, либо с помощью амплификации предварительно обработанного лигазой дуплекса [10]. Оба варианта предполагают фосфорилирование соответствующих олигонуклеотидов Т4-полинуклеотидкиназой. В данной работе, аналогично работе [11], мы отказались от использования этих двух ферментов при сборке гена эглина С (рис. 1) и получали дуплексы ДНК прямой амплификацией смеси синтетических олигонуклеотидов.

В результате проведенных экспериментов было показано, что наиболее эффективно сборка дуплекса осуществляется при концентрациях до  $10^{-8}$  -  $10^{-7}$  М каждого из олигонуклеотидов. При более высоких концентрациях праймеров выход целевых дуплексов резко уменьшался (рис. 2).

Полученный в результате амплификации фрагмент ДНК I (олигонуклеотиды (1) - (8)) расщепляли соответствующими рестриктазами (рис. 1) и клонировали в составе мультикопийного экспрессионного вектора pPR-TGATG-1 [12]. Для клонирования фрагмента II в качестве мультикопийных векторов использовали плазмиды pUC18 и pUC19, в составе которых нами был дополнительно

клонирован промотор гена уридинфосфорилазы ( $P_{udp}$ , 169 п. о.) из *E. coli*, полученный амплификацией с плазмиды pUD7 [13] (олигонуклеотиды (11), (12)). При амплификации регуляторный элемент был искусственно фланкирован сайтами рестриктаз *SacI* и *BamHI*. Производные плазмид pUC18 и pUC19 назвали pUU18 и pUU19 (рис. 1).

Таким образом, были получены три варианта экспрессионных векторов (pTEG, pUEG18 и pUEG19), структуры которых приведены на рис. 1. Отбор рекомбинантных клонов после проведения трансформации *E. coli* проводили в случае pTEG гибридным скринингом *in situ* с использованием биотинилированного [14] олигонуклеотида (7), а при поиске целевых клонов, содержащих плазмиды pUEG18 и pUEG19, - прямой амплификацией ДНК клонов с использованием "универсального" (GTAAAACGACGGCCAGT) и "реверсивного" (CAGGAAACAGCTATGAC) синтетических праймеров. Соответствие полученных конструкций запланированным вариантам подтверждали определением первичной последовательности плазмид, выделенных из целевых клонов.

Среди штаммов-продуцентов, полученных трансформацией TG1, С600 и XL1 сконструированными экспрессионными плазмидами, наибольший уровень накопления эглина С наблюдался в штаммах С600 и XL1 Blue (см. таблицу); он достигал не менее 12 - 14 мг/г сырой биомассы (110 - 130 мг/л ферментационной культуры).

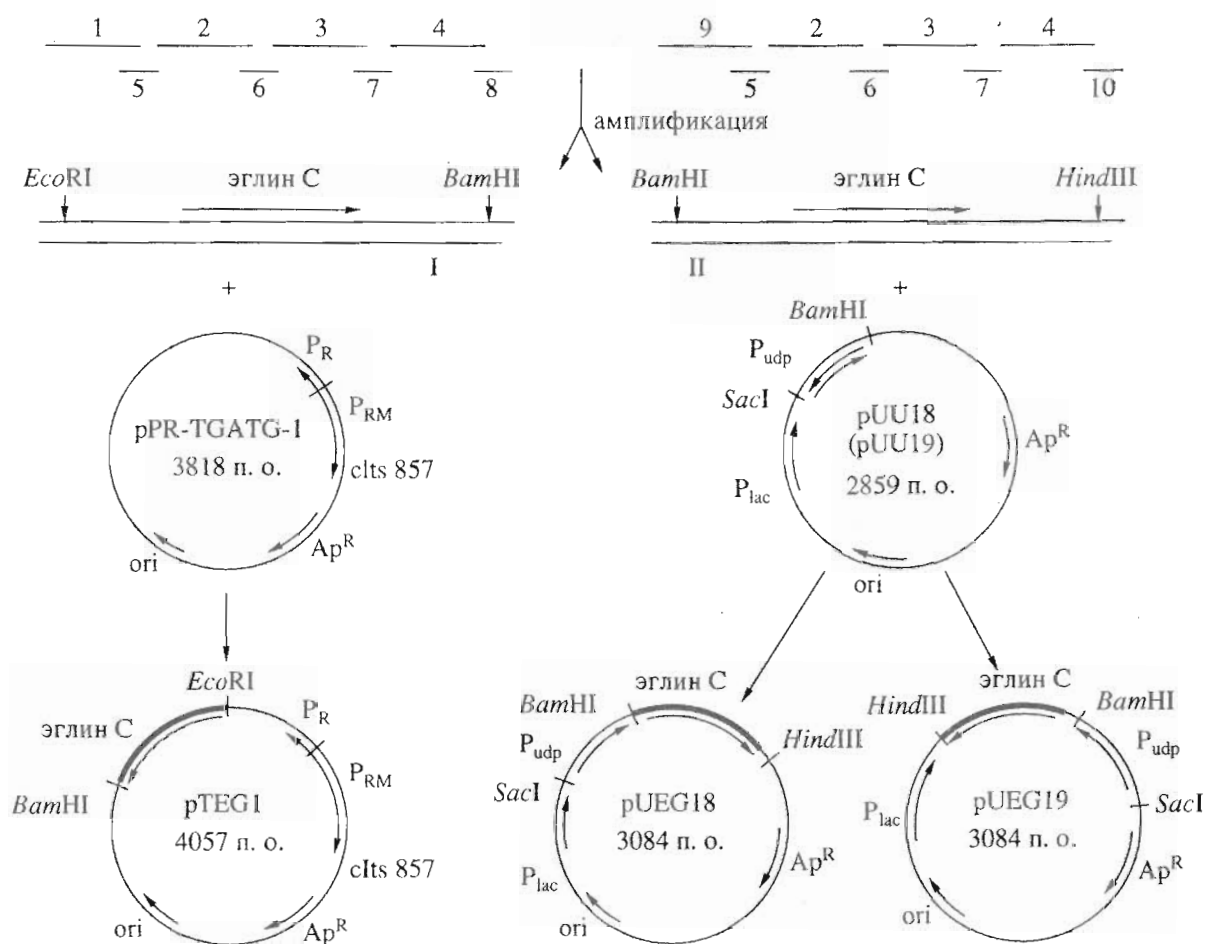


Рис. 1. Общая схема получения гена эглина С и конструирования экспрессионных векторов. 1 - 10 - номера олигонуклеотидов (см. текст),  $P_{udp}$  - промотор уридинфосфорилазы из *E. coli*.

Выделение эглина С проводили (после разрушения биомассы ультразвуком) в два этапа. На первом этапе осаждали балластные белки *E. coli* смесью этилового спирта с водой (10 : 1), эглин С оставался в растворе. На втором этапе, после концентрирования супернатанта, эглин С очищали гель-фильтрацией на носителе HW-55 (Тоуо

Soda, Япония). В качестве элюента использовали 10 мМ раствор уксусной кислоты в воде. Результаты анализа гомогенности выделенного препарата приведены на рис. 3. Исследование ингибирующей активности выделенного полипептида по отношению к  $\alpha$ -химотрипсину и эластазе показали его полную идентичность с образцами рекомбинантного эглина С фирмы "Sigma".

#### Биосинтез эглина С в *E. coli*

Штамм-продуцент	Накопление эглина С, мг/г сырой биомассы
C600 (pTEG)	14
C600 (pUEG18)	10
C600 (pUEG19)	11
TG1 (pTEG)	9
TG1 (pUEG18)	9
TG1 (pUEG19)	10
XL1 (pTEG)	14
XL1 (pUEG18)	12
XL1 (pUEG19)	14

Полученный штамм-продуцент высокоэффективного ингибитора протеиназ (эглина С) может быть использован для получения препарата, имеющего терапевтический эффект как при локальном, так и при общем воспалительном процессе (например, пневмония, эмфизема или общий сепсис).

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали ДНК-лигазу и полинуклеотидкиназу фага Т4, набор белков-стандартов для электрофореза (Pharmacia, Швеция), эндонуклеазы рестрикции фирмы Amersham (Англия), наборы "Аmplifikation" и "Сиквенс II"

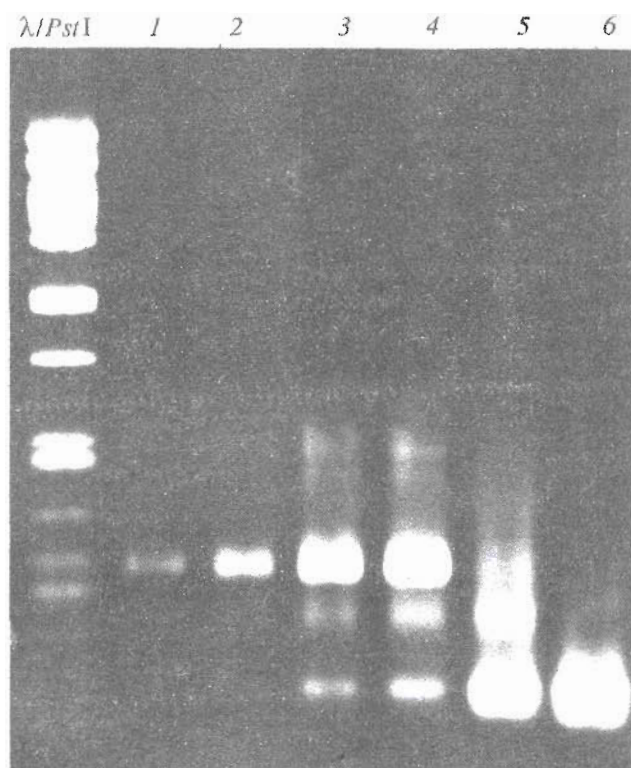


Рис. 2. Электрофоретический анализ продуктов амплификации олигонуклеотидов (фрагмент I, см. рис. 1) в 1.5% агарозном геле. Молярная концентрация каждого из олигонуклеотидов в реакционных смесях:  $1 \times 10^{-8}$  (1),  $3 \times 10^{-8}$  (2),  $5 \times 10^{-8}$  (3),  $1 \times 10^{-7}$  (4),  $2.5 \times 10^{-7}$  (5),  $5 \times 10^{-7}$  (6).

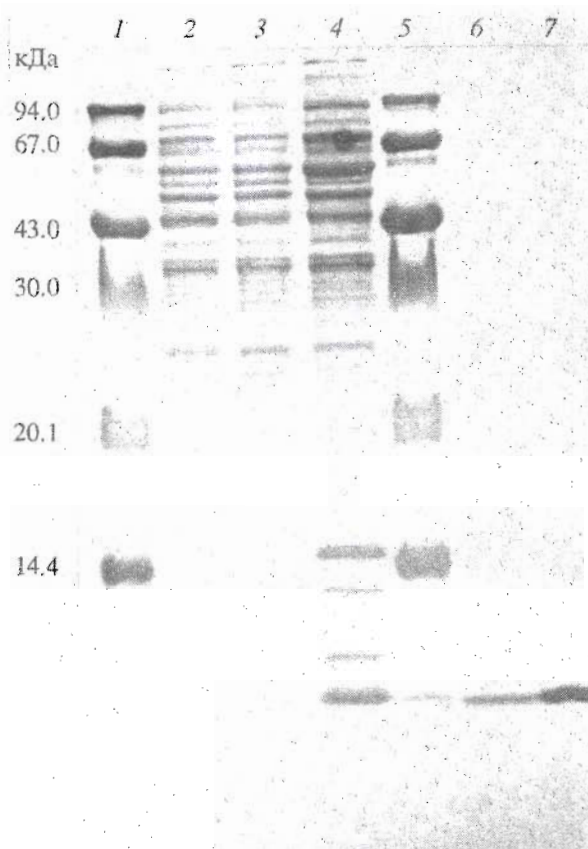


Рис. 3. Электрофоретическое разделение белков клеточных лизатов штамма-производителя эглина С С600 (рТЕG) до термоиндукции (2, 3) и после термоиндукции (4); 1, 5 – маркеры; 6 – рекомбинантный эглин С (Sigma, США); 7 – выделенный рекомбинантный эглин С.

производства НПО “Ферментас” (Литва). Определение первичной последовательности ДНК проводили по Сэнгеру [15] согласно рекомендациям фирмы-изготовителя. Трис, акриламид, N,N'-метиленабисакриламид, агароза, SDS, EDTA, кумасси R-250,  $\alpha$ -химотрипсин, эластаза, неорганические соли – препараты производства Sigma (США), 2-меркаптоэтанол – Fluka (Швейцария).

Химический синтез и выделение олигонуклеотидов осуществляли по ранее описанной методике [14].

Оптимизацию конструкций синтетических олигонуклеотидов проводили с использованием пакета программ “DNA-syn”, разработанного в секторе математического моделирования (ВНИИгенетика).

В работе использовали следующие штаммы *E. coli*: TG1 (*SupE*, *hsdΔ5*, *thi*,  $\Delta(lac-proAB)$ ,  $F[traD36, proA^+B^+, lacI^q, lacZ\Delta M15]$ ); С600 ( $F^-$ , *thi-1*, *thr-1*, *leuB6*, *lacY1*, *tonA21*, *supE44*,  $\lambda^-$ ); XL1 Blue (*RecA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi*, *hscR17* { $r_{17}^- m_{17}^+$ }, *supE44*, *relA1*,  $\lambda^-$  [*FproA1*, *lacI^q*, *lacZ\Delta M15*, Tn10(*tet*)<sup>r</sup>]).

Приготовление компетентных клеток *E. coli*, трансформацию, клонирование, выделение плазмидной ДНК проводили так, как описано в работе [16].

Уровень накопления эглина С в штаммах-производителях тестировали согласно [17] по ингибированию  $\alpha$ -химотрипсина с использованием *Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-NH-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-NO<sub>2</sub>-p* (Sigma, США) в качестве субстрата. Референс-стандартом являлся рекомбинантный эглин С фирмы Sigma (США).

Штаммы-производители культивировали на среде LB [16] с добавками соответствующих антибиотиков (см. генотип штамма-реципиента и конструкцию плазмиды). Продолжительность культивирования составляла 10 - 12 ч при 37°C для штаммов, содержащих плазмиды рUEG18 и рUEG19. Условия культивирования штаммов, содержащих плазмиду рТЕG, описаны в работе [12].

Пептидный полиакриламидный гель-электрофорез осуществляли согласно работе [18].

Амплификацию проводили по следующей схеме: смесь олигонуклеотидов (1 - 8 или 2 - 7, 9, 10) в 100 мкл реакционной смеси амплифицировали

по программе (°C/мин) 95/1, 42/1 и 72/1 (25 циклов). Амплифицированные фрагменты выделяли препаративным гель-электрофорезом в агарозе.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Seemueller U., Meier M., Ohlsson K., Mueller H.-P., Fritz H. // Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 1977. B. 358. S. 1105 - 1117.
2. Rink H., Liersch M., Sieber P., Meyer F. // Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. № 16. P. 6369 - 6387.
3. Kalsheker N. // Biosci. Rep. 1989. V. 9. P. 129 - 138.
4. Уорд А.М. Иммунохимия в клинической лабораторной практике. М.: Медицина, 1981. С. 186 - 196.
5. Welter H.F., Siebeck M., Wiesinger H., Seemueller U., Jochum M., Fritz H. // J. Cell. Biochem. 1986. Suppl. № 10. P. 273.
6. Esposito A.L., Quinn L.A., Lucey E.C., Snider G.L. // Amer. Rev. Resp. Dis. 1987. V. 135. № 3. P. 676 - 681.
7. Raschdorf F., Dahinden R., Domon B., Muller D., Richter W.J. // Mass Spectrometry in Analysis of Large Molecules / Ed. McNeal C.J. Chichester: Willey, 1986. P. 49 - 65.
8. Seemueller U., Eulitz M., Fritz H., Strobl A. // Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 1980. B. 361. S. 1841 - 1846.
9. Hipler K., Priestle J.P., Rahuel J., Grutter M.G. // FEBS. 1992. V. 309. № 2. P. 139 - 145.
10. Jajaraman K., Shah J., Fyles J. // Nucl. Acids Res. 1989. V. 17. № 11. P. 4403.
11. Prodromou C., Pearl L.H. // Prot. Eng. 1992. V. 5. № 8. P. 827 - 829.
12. Mashko S.V., Veiko V.P., Lapidus A.L., Lebedeva M.I., Mochulsky A.V., Shechter I.I., Trukhan M.E., Ratmanova K.I., Rebentish B.A., Kaluzhsky V.E., Debabov V.G. // Gene. 1990. V. 88. P. 121 - 126.
13. Брикун И.А., Миронов А.С., Суходолец В.В., Хурлес Е.М. // Генетика. 1989. Т. 25. № 3. С. 433 - 446.
14. Вейко В.П., Ратманова К.И., Осипов А.С., Буленков М.Т., Пугачев В.В. // Биоорганическая химия. 1991. Т. 17. № 5. С. 685 - 689.
15. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. № 12. P. 5463 - 5467.
16. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Молекулярное клонирование: М.: Мир, 1984.
17. Fink E., Nettelbeck R., Fritz H. // Biol. Chem. Hoppe-Seyler. 1986. V. 367. P. 567 - 571.
18. Schagger H., Jagow G. // Anal. Biochem. 1987. V. 166. P. 368 - 379.

## Chemical Synthesis of a Gene for the Proteinase Inhibitor Eglin C without Using T4 DNA Ligase and its Expression in *E. coli*

V. P. Veiko, A. S. Osipov, I. I. Shekhter, M. T. Bulenkov, K. I. Ratmanova, L. B. Gul'ko, N. A. Chibiskova, L. L. Erreis, E. B. Derevshchikova, and V. G. Debabov

*Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow, Russia*

**Abstract** – A synthetic gene for a proteinase inhibitor (eglin C) that was obtained by direct amplification with oligonucleotides without using DNA ligase and polynucleotide kinase of T4 phage was cloned into expression vectors. A high yield of the polypeptide (110 - 130 mg/l) was attained in *E. coli* strains.

*Key words:* eglin C, amplification, expression, *E. coli*.