



УДК 577.213:577.113.6

ХИМИКО-ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ, КЛОНИРОВАНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА АНАЛОГА ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО АНАФИЛАТОКСИНА C5a

© 1995 г. И. Н. Бабкина, С. В. Серегин, Н. К. Данилюк, А. Н. Синяков, С. Е. Гладкова, С. Г. Поздняков

Научно-исследовательский институт молекулярной биологии, НПО "Вектор", пос. Кольцово Новосибирской обл., 633159

Поступила в редакцию 29.03.94 г. После доработки 25.11.94 г.

Осуществлен химико-ферментативный синтез и клонирование гена аналога человеческого анафилатоксина C5a. Получена рекомбинантная плаزمиды pRC5a, обеспечивающая в клетках *E. coli* экспрессию синтетического гена. Биологическая активность продукта экспрессии искусственного гена доказана тестированием хемотаксической активности и выхода миелопероксидаз из перитонеальных клеток крысы под воздействием лизатов бактериальных клеток, содержащих рекомбинантный белок.

Ключевые слова: система комплемента; анафилатоксин C5a; ген аналога человеческого анафилатоксина C5a, химико-ферментативный синтез; клонирование; экспрессия.

Одним из белков системы комплемента, играющих важную роль в регуляции иммунного ответа и воспалительном процессе, является анафилатоксин C5a. В отличие от другого, наиболее изученного анафилатоксина C3a, который обладает иммуносупрессорными свойствами, C5a усиливает иммунный ответ организма. Активация системы комплемента классическим либо альтернативным путем приводит к различному количественному соотношению в организме между вышеназванными белками, что и определяет развитие иммунологических реакций при аутоиммунных заболеваниях или защите от бактериальных инфекций [1].

Участие C5a в процессе воспаления опосредовано медиаторами, секретируемыми различными клетками крови. К медиаторам относятся гистамин, выделяющийся из тучных клеток, а также серотонин, лизосомные ферменты (миелопероксидазы), лейкотриены и простагландины, секретируемые полиморфно-ядерными лейкоцитами и моноцитами. Анафилатоксин C5a вызывает направленное движение этих клеток (хемотаксис), которые обладают в свою очередь предпочтительной адгезией к эндотелию сосудистой стенки [2]. Таким образом возникает локальное увеличение проницаемости сосудистой стенки, отек ткани, накопление клеток крови в просвете сосуда, т.е. картина, присущая воспалительной реакции.

Высокая биологическая активность анафилатоксина C5a в процессе активации системы комплемента привлекает к нему в последнее десятилетие пристальное внимание исследователей, работающих в области иммунохимии, молекулярной

биологии и иммунопатологии, а также представляет несомненный интерес для практической медицины.

Ввиду того что донорская кровь человека является весьма ограниченным источником анафилатоксина C5a, а также учитывая трудоемкость методов выделения и очистки природного белка [3, 4], наиболее перспективным представляется генно-инженерный способ его получения.

С этой целью нами осуществлен химико-ферментативный синтез гена аналога человеческого анафилатоксина C5a. Целевая последовательность гена C5a была произвольно разделена на три фрагмента, кодирующие аминокислотные последовательности 1 - 37 (I), 38 - 62 (II) и 63 - 74 (III) аналога C5a. 5'-Концевая часть гена ограничена сайтом рестрикции *Bam*HI, а 3'-концевая – кодонной термации трансляции и сайтами *Bam*HI и *Sal*GI (рис. 1). Искусственный ген кодирует белок, который отличается от природного C5a [5] лишь двумя аминокислотными заменами: Met вместо Thr в положении 1 и Ser вместо Cys в положении 27 (рис. 1). По данным Моллисона с соавт. [6], эти замены не изменяют специфическую активность белка C5a. Первая замена произведена для обеспечения прямой экспрессии гена в клетках *E. coli*, вторая – исходя из особенностей структурно-функциональной организации молекулы: три внутримолекулярные дисульфидные связи образованы шестью остатками Cys, тогда как аминокислотный остаток Cys в положении 27 единственный, несущий свободную SH-группу. Это при экспрессии в гетерологичной системе может приводить к

<i>Bam</i> HI	(T)	L	Q	K	K	I	E	E	I	A	A	K	Y	14
GATCCAGT	ATG	TTG	CAA	AAA	AAA	ATT	GAA	GAA	ATT	GCT	GCT	AAA	TAT	AAA
											(C)			30
H	S	V	V	K	K	C	C	Y	D	G	A	S	V	N
CAT	TCT	GTT	GTT	AAA	AAA	TGT	TGT	TAT	GAT	GGA	GCT	TCT	GTT	AAT
														46
D	E	T	C	E	Q	R	*A	A	R	I	S	L	G	P
GAT	GAA	ACC	TGC	GAA	CAA	CGC	GCT	GCT	AGA	ATT	TCT	TTG	GGA	CCT
														62
C	I	K	A	F	T	E	C	C	V	V	A	S	Q	L
TGT	ATT	AAA	GCA	TTT	ACA	GAA	TGT	TGT	GTT	GTT	GCT	TCT	CAA	TTG
														R *
														74
A	N	I	S	H	K	D	M	Q	L	G	R	Stop	<i>Bam</i> HI	
GCG	AAT	ATT	TCT	CAT	AAA	GAT	ATG	CAA	TTG	GGA	AGA	TAG	GATCCGTCGA	
														<i>Sal</i> GI

Рис. 1. Нуклеотидная и соответствующая ей аминокислотная последовательности синтетического гена аналога человеческого анафилатоксина С5а. В скобках над символами аминокислот указаны аминокислоты в природном белке С5а; звездочками отмечено разбиение гена на три фрагмента (пояснения в тексте).

образованию “неправильных” дисульфидных внутри- и межмолекулярных связей.

Общая схема конструирования рекомбинантной плазмиды рFHC5а/3, содержащей ген аналога человеческого анафилатоксина С5а, приведена на рис. 2. Дуплекс (фрагмент I), полученный лигированием шести олигонуклеотидов ((1) - (6)), клонировали в векторной плазмиде рFH123, аналогично клонировали фрагмент II, полученный в результате достройки ДНК-полимеразой I (фрагмент Кленова) двух частично комплементарных полинуклеотидов (7) и (8), после чего целевые фрагменты выделяли из рекомбинантных плазмид (см. рис. 2, табл. 1 и “Экспериментальную часть”) и клонировали совместно с олигонуклеотидным дуплексом ((9) и (10)), составляющим фрагмент III, в той же векторной плазмиде.

Для достижения экспрессии гена аналога С5а была сконструирована рекомбинантная плазида рRC5а, содержащая синтетический ген под контролем *recA*-промотора *Proteus mirabilis*. Для этого на первой стадии получали плазмиду рFHC5ад, в которой был смещен участок узнавания для рестриктазы *FokI* относительно 5'-конца гена (клонировали *FokI*-*SalGI*-фрагмент гена из плазмиды рFHC5а/3 в векторе рFH123/*EcoRI*-*SalGI* совместно с олигонуклеотидным дуплексом в качестве коннектора; см. рис. 3). На второй стадии была использована полученная нами ранее экспрессирующая ген человеческого интерлейкина-2 (IL-2) плазида рRIL3 [7], в которой ген IL-2 был заменен геном С5а из плазмиды рFHC5ад. Строение целевой рекомбинантной плазмиды рRC5а показано на рис. 4.

Таблица 1. Синтетические олигонуклеотиды, использованные для сборки гена аналога человеческого анафилатоксина С5а

Номер	Структура (5' - 3')	Кодируемая область (а/к)*	Длина цепи
1	GATCCAGTATGTTGCAAAAAAAAAATTGAAGAAATTGCTGCTAAATATAAACAT-TCTGTTGTTAAAAAATG	1 - 21 (+)	70
2	TTGTTATGATGGAGCTTCTGTTAATAAT	22 - 30 (+)	28
3	GATGAAACCTGCCGAACAACGCGC	31 - 37 (+)	23
4	TTTATATTTAGCAGCAATTTCTTCAATTTTTTTTGGCAACATACTG	1 - 14 (-)	46
5	TCCATCATAACAACATTTTTTAACAACAGAATG	15 - 25 (-)	33
6	GATCGCGCGTTGTTTCGCAGGTTCATCATTAATAACAGAAGC	26 - 37 (-)	42
7	CGCTGCTAGAAATTTCTTTGGGACCTAGATGTATTAAAGCATTACAGAA	38 - 53 (+)	49
8	CCTGTTCGACGCTCTCAATTGAGAAGCAACAACAACATTTCTGTAAATGCTTTA	49 - 63 (-)	54
9	AGCGAATATTTCTCATAAAGATATGCAATTGGGAAGATAGGATCCG	63 - 74 (+)	46
10	TCGACGGATCCTATCTTCCCAATGTCATATCTTTATGAGAAATAAT	64 - 74 (-)	46

* а/к - аминокислоты аналога С5а, (+) - кодирующая цепь, (-) - комплементарная ей.

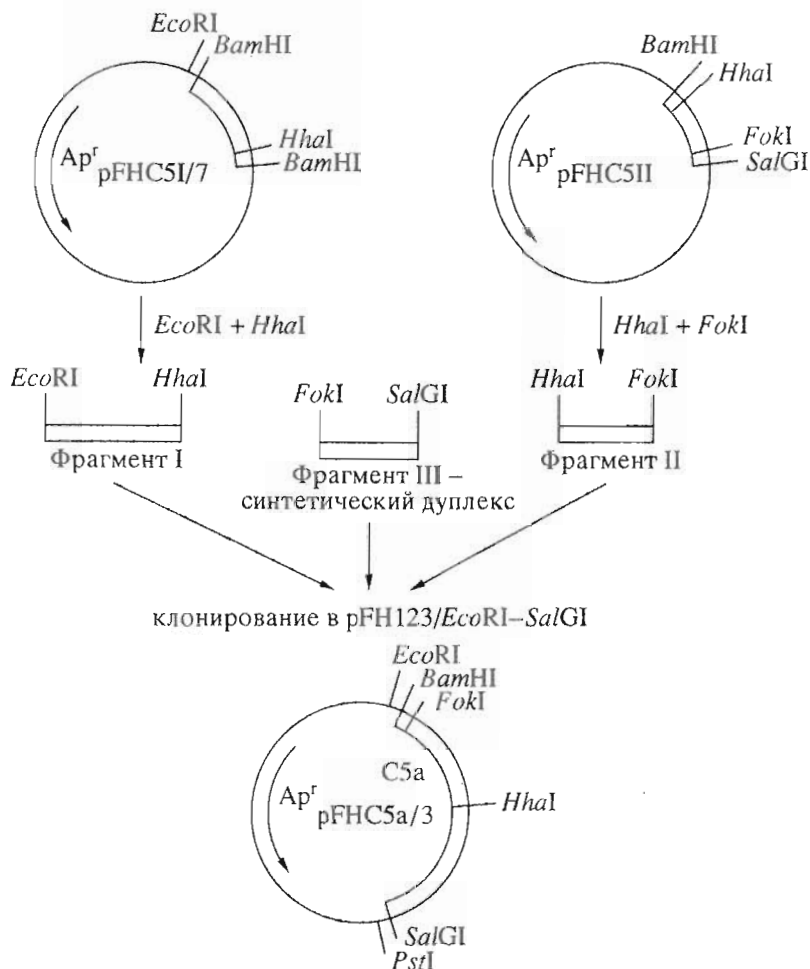


Рис. 2. Общая схема конструирования рекомбинантной плазмиды pFHC5a/3, содержащей ген аналога человеческого анафилатоксина C5a.

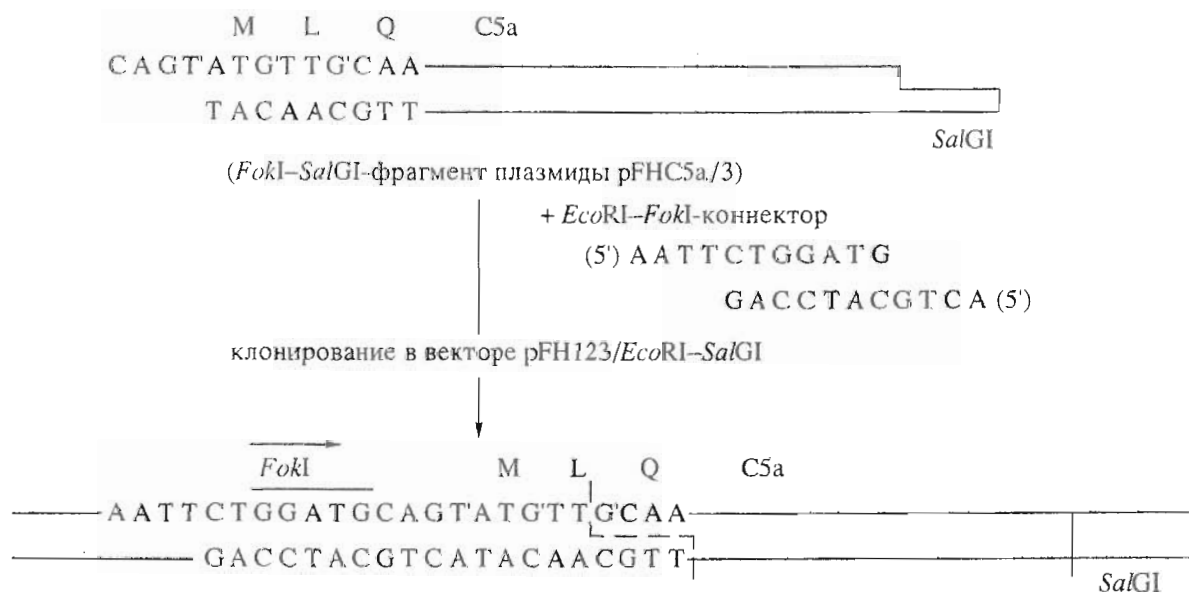


Рис. 3. Схема смещения участка узнавания для рестриктазы *FokI* относительно 5'-конца гена C5a и строение района, прилегающего к 5'-концу гена C5a в плазмиде pFHC5ad. Штриховой линией обозначено место расщепления рестриктазой *FokI*.

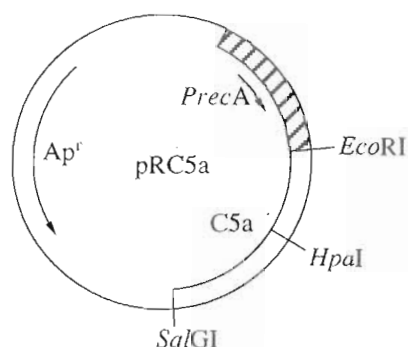


Рис. 4. Рекombинантная плазмида pRC5a, экспрессирующая ген аналога анафилатоксина C5a под контролем индуцибельного промотора белка гесA *Proteus mirabilis* (выделен штриховкой).

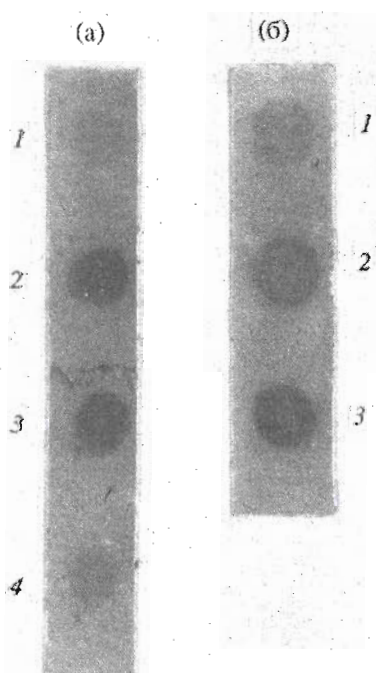


Рис. 5. Оценка уровня экспрессии рекомбинантного белка C5a методом радиоиммунного анализа. Радиоавтограф дот-блоттинга: а – лизаты клеток *E. coli* VL1222 (pRC5a), по 10 мкл на точку (сконцентрированы в 100 раз): 1 – в момент внесения индуктора митомидина С, 2 – 4 – 6, 12 и 18 ч индукции соответственно; б – человеческий C5a, выделенный из плазмы доноров: 1 – 0.25, 2 – 0.5, 3 – 1 мкг.

Штаммы-продуценты рекомбинантного белка аналога C5a получали путем трансформации плазмидой pRC5a бактериальных штаммов *E. coli* JM103 и VL1222 (последний обладает пониженной способностью к внутриклеточному протеолизу). Условия культивирования бактериальных клеток и индукции синтеза рекомбинантного белка были аналогичны описанным ранее [7]. Для оптимизации этих условий и сравнения уровней синтеза использовали дот-блоттинг. Для этого

клеточные лизаты наносили на нитроцеллюлозу в виде зон диаметром 2 - 3 мм. Образцы, содержащие белок C5a, выявляли полученной нами козьей поликлональной сывороткой к человеческому анафилатоксину C5a, выделенному из плазмы доноров, как описано ниже (рис. 5). Максимальный уровень экспрессии рекомбинантного белка достигался через 6 - 12 ч после внесения индуктора в ростовую среду и составлял около 1 мкг/мл бактериальной культуры, что соответствует не более 0.5% от суммарного клеточного белка, причем, как видно из рис. 5, дальнейшее увеличение времени культивирования приводило к существенному (в 4 - 5 раз) уменьшению количества тестируемого белка. Уровень экспрессии в клетках использованных нами штаммов *E. coli* практически одинаков.

Тот факт, что продолжительное культивирование существенно снижает количество тестируемого рекомбинантного белка C5a даже в случае использования штаммов *E. coli* с пониженной протеолитической активностью, ранее был также отмечен Мандеки с соавт. [8]. Видимо, скорость протеолитической деградации не является основным фактором, определяющим низкий уровень экспрессии рекомбинантного белка, а снижение сигнала при использовании иммунологических методов тестирования, возможно, связано с конформационными изменениями рекомбинантного белка в бактериальных клетках.

Для определения биологической активности рекомбинантного аналога человеческого анафилатоксина C5a использовали тесты *in vitro*: клеточный хемотаксис и высвобождение миелопероксидаз из перитонеальных клеток крысы. Положительным контролем в этих экспериментах служил человеческий белок C5a, выделенный из плазмы доноров с использованием комбинации описанных в литературе методов очистки анафилатоксинов [3, 4]. Полученный таким образом белок C5a обладал присущими ему биологическими свойствами, и в процессе его тестирования была подобрана оптимальная концентрация белка для максимальной индукции хемотаксиса и выброса миелопероксидаз (10^{-8} М). В качестве отрицательного контроля в биотестах использовали раствор Эрла и лизаты клеток *E. coli*, не содержащие рекомбинантного белка.

Хемотаксическая активность продукта экспрессии синтетического гена оценивалась в подagarозном тесте [9] путем определения коэффициента хемотаксиса $K_x = A/B$ (A – диаметр зоны клеток; (мм), мигрирующих в течение 24 ч при 37°C во влажной камере по направлению к лунке с хемоаттрактантом, B – диаметр зоны клеток, движущихся в направлении лунки с раствором Эрла). Выход миелопероксидаз из перитонеальных клеток крысы оценивали по методу Вебстера и Хенсона [10]. Усредненные результаты трех экспериментов представлены в табл. 2. На

основании полученных результатов можно утверждать, что лизаты индуцированных клеток *E. coli* содержат белок, обладающий биологической активностью анафилатоксина С5а.

Таким образом, нами синтезирован ген аналога человеческого анафилатоксина С5а и показана биологическая активность продукта его экспрессии в клетках *E. coli*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали эндонуклеазы рестрикции (КФ 3.1.23.х), Т4-полинуклеотидкиназу (КФ 2.7.1.78), фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli* (КФ 2.7.7.7) и Т4-ДНК-лигазу (КФ 6.5.1.1) производства НПО "Ферментас" (Вильнюс) и НИКТИ БАВ (Бердск), митомицин С, фенилметилсульфонилфторид, цитоколазин В, 3,3'-диметоксибензидин, dNTP (Sigma, США), [γ - 32 P]АТР и [α - 32 P]dNTP (1000 - 4000 Ки/ммоль) производства НПО "Изотоп" (Ташкент), меченый 125 I (0.1 Ки/мг) белок А *Staphylococcus aureus* производства НПО "Вектор" (пос. Кольцово Новосибирской обл.), рекомбинантные плазмиды рFH123 и рRIL3, полученные нами ранее [7, 11]. Химический синтез олиго- и полинуклеотидов (все относится к дезоксирияду) проводили так, как описано ранее [12]. Ферментативные реакции, выделение плазмидных ДНК, электрофорез в ПААГ и агарозном геле, трансформацию клеток *E. coli*, гибридизацию ДНК на нитроцеллюлозных фильтрах осуществляли аналогично ранее описанному [11, 12] и в соответствии с работой [13]. Микробиологическую часть работы проводили согласно рекомендациям Миллера [14]. Структуру клонированных фрагментов подтверждали методом Максама и Гилберта [15].

Получение дуплекса I, кодирующего аминокислотный фрагмент 1 - 37 аналога человеческого анафилатоксина С5а. Для сборки верхней цепи дуплекса смешивали по 200 пмоль нефосфорилированных олигонуклеотидов (5) и (6) (табл. 1) и 5'-фосфорилированных олигонуклеотидов (2) и (3), проводили отжиг и лигировали 3 ч при 20°C. Затем в реакционную смесь добавляли по 200 пмоль нефосфорилированных олигонуклеотидов (1) и (4) и продолжали реакцию при 10°C в течение 14 ч. Сборку нижней цепи дуплекса осуществляли аналогичным образом с использованием нефосфорилированных олигонуклеотидов (1) и (2), 5'-фосфорилированных (4) и (5), с добавлением на второй стадии нефосфорилированных олигомеров (3) и (6). Целевые фрагменты выделяли так, как описано ранее [12]. Лигазной смесью, приготовленной из 5 пмоль синтетического дуплекса и 1 пмоль *Vat*HI-линеаризованной векторной плазмиды рFH123, трансформировали клетки *E. coli* JM103 и из клонов с *lac*⁻-фенотипом с помощью гибридизации (зонд - 32 P-меченый олигонуклеотид (5))

и рестрикционного анализа плазмидных ДНК отобрали целевой клон с плазмидой рFHC51/7. Из этой плазмиды выделяли необходимый для сборки полного гена *Eco*RI-*Hha*I-фрагмент с 5'-концевой частью гена С5а.

Дуплекс II, кодирующий аминокислотный фрагмент 38 - 62 аналога человеческого анафилатоксина С5а, получали аналогично описанному ранее для фрагментов гена интерлейкина-2 человека [11]. При этом использовали полинуклеотиды (7) и (8) (табл. 1). Скрининг гибридных клонов проводили аналогично вышеописанному. Дуплекс, пригодный для сборки полного гена, получали в виде соответствующего *Fok*I-*Hha*I-фрагмента целевой плазмиды рFHC5а/2.

Получение рекомбинантной плазмидной ДНК рFHC5а/3, содержащей полный ген аналога С5а, осуществляли путем клонирования вышеуказанных двух фрагментов совместно с дуплексом III, составленным из полинуклеотидов (9) и (10), в векторе рFH123/*Eco*RI-*Sal*GI.

Для получения рекомбинантной плазмиды рFHC5аd выделяли *Fok*I-*Sal*GI-фрагмент гена С5а из плазмиды рFHC5а/3 и клонировали его совместно с олигонуклеотидным дуплексом, указанным на рис. 3, в векторе рFH123/*Eco*RI-*Sal*GI.

Для конструирования плазмиды рRC5а, экспрессирующей ген С5а, из плазмиды рFHC5аd выделяли *Fok*I-*Sal*GI-фрагмент, лигировали его с векторным *Eco*RI-*Sal*GI-фрагментом плазмиды рRIL3 совместно с коннектором (5')AATTTCATGTT

GTACAACATG (5') и трансформировали клетки *E. coli* JM103. Скрининг клонов проводили рестрикционным анализом с использованием рестриктаз *Eco*RI, *Sal*GI, *Bsp*RI, *Fok*I.

Экспрессия рекомбинантного белка С5а была достигнута в клетках штаммов *E. coli* JM103 и *E. coli* VL1222 (*htp*Ram; *Sup*C; *lon*⁻) аналогично описанному нами ранее для других белков [7].

Таблица 2. Тестирование биологической активности анафилатоксина С5а, содержащегося в лизате клеток *E. coli* VL1222 (рRC5а)

Тестируемый препарат	Хемотаксис ($K_x = A/B$)	Выход миелопероксидаз, ОЕ ₄₅₀
Раствор Эрла ("-"-контроль)	1	0.173 ± 0.006
Лизат <i>E. coli</i> VL1222 (контроль)	1.15 ± 0.03	0.165 ± 0.030
Лизат <i>E. coli</i> VL1222 (рRC5а)	1.24 ± 0.03	0.297 ± 0.030
Человеческий С5а, 10 ⁻⁸ М ("+"-контроль)	1.90 ± 0.04	0.445 ± 0.007

Клеточные лизаты для тестирования биологической активности получали следующим образом: 0.3 - 0.4 г клеток (вес влажного осадка) ресуспендировали в 5 мл буфера PBS, в который добавляли фенолметилсульфонилфторид (20 мкг/мл) для предотвращения деградации рекомбинантного белка, клетки разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе, как было описано нами ранее [7], лизат осветляли центрифугированием.

В качестве тестов биологической активности рекомбинантного C5a человека *in vitro* были использованы клеточный хемотаксис и высвобождение миелопероксидаз из перитонеальных клеток крысы. Клетки перитонеальной жидкости, 90% которых составляют гранулоциты, получали многократным промыванием брюшной полости крысы раствором Эрла. Количество жизнеспособных клеток, не поглощающих трипановый синий, составляло 5×10^8 клеток на 1 мл. Хемотаксическая активность продукта экспрессии синтетического гена оценивалась в подагарозном тесте [9]. При определении выхода миелопероксидаз из перитонеальных клеток крысы использовали метод Вебстера и Хенсона [10]. Клетки, обработанные цитохалазином В, инкубировали с тестируемыми образцами. Активность миелопероксидазы в среде определяли спектрофотометрически после добавления перекиси водорода и 3,3'-диметоксибензидина. Анализ проводили в иммунологических планшетах с помощью спектрофотометра Minireader II (Dynatech, США) при длине волны 450 нм.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Morgan E.L., Weigle W.O., Hugli T.E. // J. Exp. Med. 1982. V. 155. P. 1412 - 1426.
2. Bult H., Herman A.G. // Agent and Action. 1983. V. 13. № 5 - 6. P. 405 - 413.
3. Fernander H.N., Hugli T.E. // J. Immunol. 1976. V. 117. № 4. P. 1688 - 1697.
4. Renfer L., Frank M.M., Hammer C.H., Harvath L., Lawley T., Yancey K.B. // J. Immunol. Meth. 1986. V. 88. P. 193 - 205.
5. Mandecki W., Mollison K.W., Bolling T.J., Powell B.S., Carter G.W., Fox J.L. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. № 11. P. 3533 - 3548.
6. Mollison K.W., Mandecki W., Zuiderweg E. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. № 1. P. 292 - 296.
7. Серегин С.В., Данилюк Н.К., Сinyaков А.Н., Камынина Т.П., Ильюкова Л.В., Сахно Л.В. // Молекуляр. биология. 1993. Т. 27. № 1. С. 72 - 80.
8. Mandecki W., Powell B.S., Mollison K.W., Carter G.W., Fox J.L. // Gene. 1986. V. 43. № 1 - 2. P. 131 - 138.
9. Gerard C., Chenoweth D.E., Hugli T.E. // J. Immunol. 1981. V. 127. № 5. P. 1978 - 1982.
10. Webster R.O., Henson P.M. // Rapid Inflammation. 1978. V. 3. № 2. P. 129 - 133.
11. Данилюк Н.К., Серегин С.В., Сinyaков А.Н., Серпинский О.И., Бабкина И.Н., Урманова М.А., Рябинин В.А., Поздняков С.Г. // Биоорган. химия. 1991. Т. 17. № 6. С. 779 - 788.
12. Серегин С.В., Рябинин В.А., Сinyaков А.Н., Данилюк Н.К., Поздняков С.Г. // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. № 6. С. 759 - 764.
13. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984.
14. Миллер Д. Эксперименты в молекулярной генетике. М.: Мир, 1976.
15. Maxam A.M., Gilbert W. // Meth. Enzymol. 1980. V. 65. P. 499 - 560.

Chemical-Enzymatic Synthesis, Cloning, and Expression of a Gene Coding for a Human Anaphylatoxin C5a Analog

I. N. Babkina, S. V. Seregin, N. K. Danilyuk, A. N. Sinyakov,
S. E. Gladkova, and S. G. Pozdnyakov

Institute of Molecular Biology, Vector NPO, pos. Kol'tsovo, Novosibirskaya oblast', 633159 Russia

Abstract – Chemical-enzymatic synthesis and cloning of a gene for a human anaphylatoxin C5a analog were carried out. Recombinant plasmid pRC5a providing the expression of the synthetic gene in the *Escherichia coli* cells was obtained. The biological activity of the expression product was demonstrated by the chemotaxis activity test and by the release of myeloperoxidases from rat peritoneal cells that was induced by bacterial cell lysates containing the recombinant protein.

Key words: complement system, anaphylatoxin C5a, gene for human anaphylatoxin C5a analog, chemical-enzymatic synthesis, cloning, expression.