



УДК 547.963.32.057:577.213.3

РЕКОМБИНАНТНЫЕ БЕЛКИ, СОДЕРЖАЩИЕ ОЛИГОМЕРНЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ОКСИТОЦИНА

© 1996 г. А. И. Гуревич[#], Т. А. Качалина, А. Л. Каюшин, М. Д. Коростелева,
К. В. Мальцев, О. А. Миргородская*, А. И. Мирошников

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

* Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

Поступила в редакцию 16.06.95 г.

Сконструированы экспрессионные плазмиды с генами рекомбинантных белков ILOX3, ILOX6 и ILOX9, содержащими в С-концевой части структуры тримера, гексамера или нонамера окситоциноил-Lys. При экспрессии в *E. coli* всех трех генов образуются тельца включения, содержащие белковые продукты, близкие по размеру и негомогенные в С-концевом участке. При этом если продукт гена *ilox3* представляет собой, по-видимому, смесь белков, включающую полноразмерный продукт трансляции (С-концевой остаток Lys), то в случае генов *ilox6* и *ilox9* белковые продукты образуются, вероятно, в результате сайт-специфического протеолиза в пределах между второй и четвертой структурными единицами окситоцина.

Ключевые слова: экспрессия генов, рекомбинантные белки, сайт-специфический протеолиз.

Ранее мы сообщили о химико-ферментативном синтезе и клонировании искусственного гена тримера окситоциноил-Lys [1]. В полученной при этом плазмиде *pte2ilox3* ген *ilox3* кодировал рекомбинантный белок, аминокислотная последовательность которого включала N-концевой фрагмент (1 - 63) человеческого интерлейкина-3 и в С-концевой части – тример пептидного гормона окситоцина (I), фланкированного остатками лизина:



Высокого уровня экспрессии гена *ilox3* в *E. coli* удалось достигнуть в экспрессионной плазмиде *ptoteilox3* [2]. Полученный при этом рекомбинантный белок обладал аномально высокой электрофоретической подвижностью и при трипсинолизе расщеплялся с образованием окситоциноил-Lys [3]. С целью увеличения выхода этого продукта трипсинолиза и для сравнительного изучения свойств рекомбинантных белков, содержащих различные олигомерные последовательности окситоцина, мы предприняли химико-фермента-

тивный синтез генов белков ILOX6 и ILOX9. Этот синтез мы провели, используя последовательность гена *ilox3* в плазмиде *ptoteilox3* (рис. 1). Последовательность, кодирующую весь белок ILOX3, но лишённую терминирующих кодонов, мы выделили в результате ПЦР с использованием плазмиды *ptoteilox3* в качестве матрицы и праймеров А (идентичного участку перед сайтом рестриктазы *XbaI*, см. рис. 1б) и С (комплементарного 3'-концевой последовательности гена без терминирующих кодонов и содержащего 5'-концевой свисающий участок с сайтом рестриктазы *NcoI* – см. рис. 1в). С другой стороны, плазмиду *ptoteilox3* мы расщепили рестриктазой *HindIII* и затем лигировали с дуплексом, полученным при отжиге олигонуклеотидов D и фосфорилированного С, содержащих сайт *NcoI* (рис. 1г). Полученную линейную ДНК мы использовали в качестве матрицы для ПЦР с праймерами D (5'-конец) и Е, комплементарным последовательности в плазмиде после сайта рестриктазы *EcoRI*. Полученный фрагмент ДНК содержал последовательность гена тримера окситоциноил-Lys (ox3), включая терминирующие кодоны (рис. 1). Оба амплифицированных фрагмента ДНК мы расщепили рестриктазой *NcoI* и затем лигировали. Полученную лигазную смесь мы использовали в качестве матрицы для ПЦР с праймерами А и Е (см. рис. 1).

Сокращения: ПЦР – полимеразная цепная реакция, офВЭЖХ – обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография.

[#] Автор для переписки.

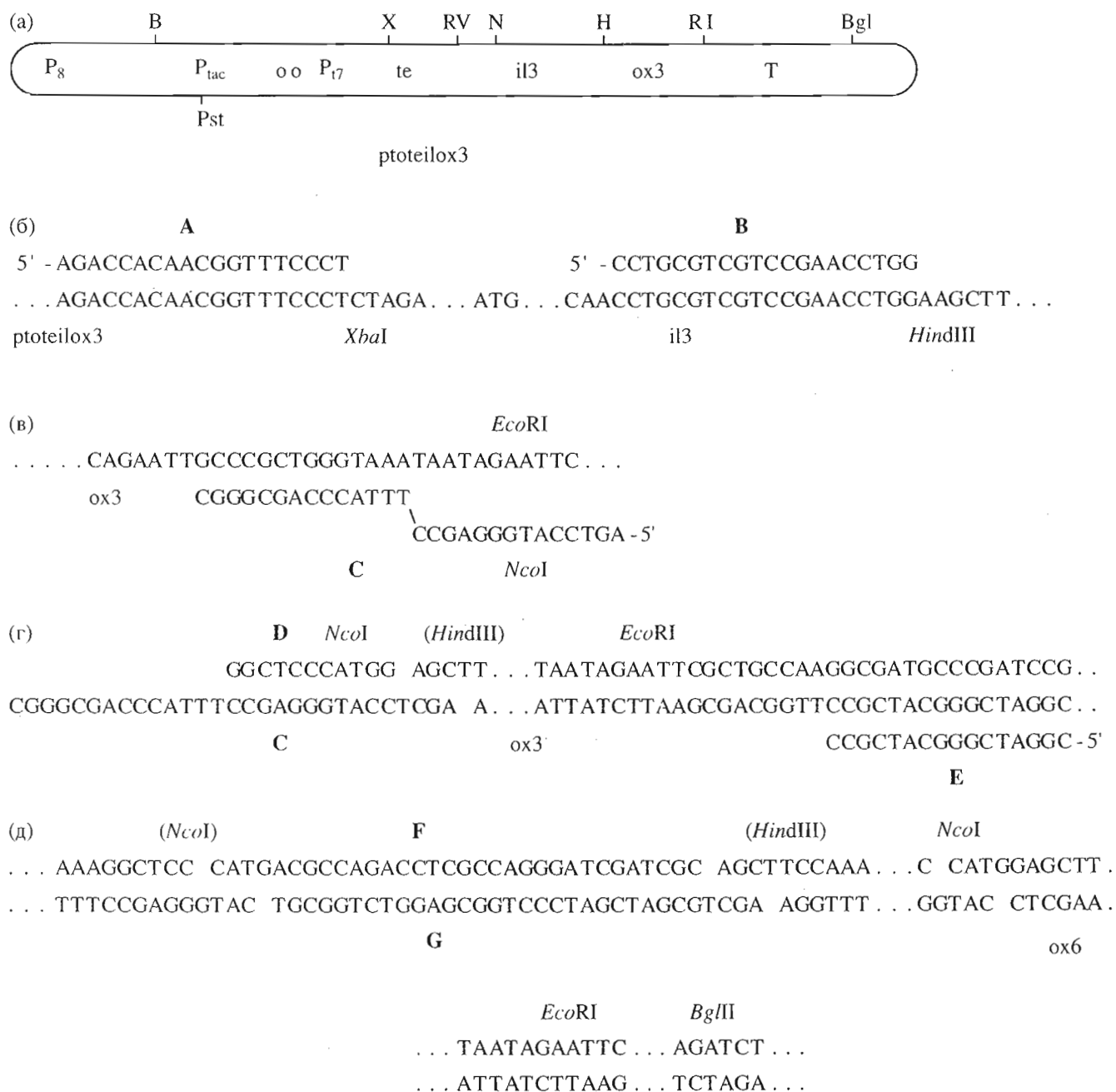


Рис. 1. Схема конструирования рекомбинантных плазмид с генами *ilox6* и *ilox9*. На схеме исходной плазмиды *pteilox3* (а) указаны сайты рестриктаз (B – *Bam*HI, Bgl – *Bgl*II, RI – *Eco*RI, RV – *Eco*RV, H – *Hind*III, N – *Nde*I, Pst – *Pst*I, X – *Xba*I), участки промоторов (P₈, P_{lac}, P₁₇), терминатора (T), усилителя трансляции (te), генов *il3* и *ox3*. Приведены расположение праймеров А – Е на соответствующих участках плазмиды (б – г), структура и расположение в плазмиде *Nco*I/*Hind*III-адаптера из олигонуклеотидов F и G (д), полусайты рестриктаз в лигируемых фрагментах (в скобках).

Из образовавшейся смеси амплифицированных фрагментов ДНК один, соответствующий по размеру (450 п. о.) гену *ilox6*, был выделен с помощью гель-электрофореза, расщеплен рестриктазами *Xba*I и *Eco*RI и клонирован в *Xba*I/*Eco*RI-векторе, полученном из плазмиды *ptote2il3* [4]. Отбор клонов проводили гибридизацией колоний с 5'-³²P-мечеными олигонуклеотидами В и С.

В результате была получена плазида *pteilox6*, структура гена *ilox6* в которой была доказана секвенированием по Сэнгеру с помощью праймеров А, В, С и Е.

Для того чтобы сконструировать плазмиду с геном *ilox9*, мы расщепили плазмиду *pteilox6* рестриктазами *Nco*I и *Bgl*III и в параллельном эксперименте *Hind*III и *Bgl*III. Большой фрагмент

1 MAPMTQTSSL KTSWVNCNSM IDEIITHLKQ PPLPLDFNN LNGEDQDILM ENNLRRPNLE
61 ASKCYIQNCP LGKCYIQNCP LGKCYIQNCP LGK

1 MAPMTQTSSL KTSWVNCNSM IDEIITHLKQ PPLPLDFNN LNGEDQDILM ENNLRRPNLE
61 ASKCYIQNCP LGKCYIQNCP LGKCYIQNCP LGKSGHGASK CYIQNCPLGK CYIQNCPLGK
121 CYIQNCPLGK

1 MAPMTQTSSL KTSWVNCNSM IDEIITHLKQ PPLPLDFNN LNGEDQDILM ENNLRRPNLE
61 ASKCYIQNCP LGKCYIQNCP LGKCYIQNCP LGKSGHDAR P RQGSIAASKC YIQNCPLGKC
121 YIQNCPLGKC YIQNCPLGKG SHGASKCYIQ NCPLGKCYIQ NCPLGKCYIQ NCPLGK

Рис. 2. Аминокислотная последовательность ILOX3, ILOX6 и ILOX9, вытекающая из нуклеотидной последовательности генов.

BglIII/NcoI-3193 содержал ген *ilox3* без терминирующих кодонов; малый фрагмент *HindIII/BglIII*-571 содержал ген гексамера окситоциноил-Lys (ох6) с терминирующими кодонами (см. рис. 1д). При лигировании этих двух фрагментов с *NcoI/HindIII*-адаптером F-G и последующем клонировании была получена плазида *ptoteilox9*. Отбор клонов проводили гибридизацией с 5'-³²P-меченым олигонуклеотидом F. Следует отметить, что плазмиду *ptoteilox9* удалось получить в результате лигирования с 5'-фосфорилированным адаптером. С не-

фосфорилированным адаптером были получены только укороченные плазмиды, в которых отсутствовали последовательности адаптера и части гена *ilox9*. Очевидно, что такие делеции происходят при наличии повторяющихся последовательностей и одноцепочечных разрывов в ДНК, как это было отмечено нами ранее [1]. Строение гена *ilox9* в плазмиде было доказано секвенированием по Сэнгеру с помощью праймеров В, Е, F и G.

В результате трансформации плазмидами *ptoteilox6* и *ptoteilox9* соответствующих штаммов *E. coli* были получены штаммы-продуценты белков ILOX6 и ILOX9. Уровень экспрессии генов *ilox6* и *ilox9* в клетках *E. coli* TG1 был существенно ниже, чем в случае гена *ilox3*, но штаммы-продуценты, полученные на основе *E. coli* BL21 (DE3), были достаточно высокопродуктивными.

Аминокислотные последовательности белков ILOX3, ILOX6 и ILOX9, вытекающие из нуклеотидных последовательностей генов, представлены на рис. 2.

При экспрессии генов трех гибридных белков, содержащих олигомерные последовательности окситоциноил-Lys, в плазмидных конструкциях *ptoteilox3*, *ptoteilox6* и *ptoteilox9* с использованием штаммов *E. coli* TG1 и *E. coli* BL21 (DE3) мы получили высокие выходы белковых продуктов в виде телец включения (20 - 30% суммарного белка клетки). При этом была отмечена аномально высокая электрофоретическая подвижность образующихся белков (см. рис. 3), которая соответствовала молекулярной массе 7 - 8 кДа для всех трех белковых продуктов при ожидаемых значениях: для ILOX3 - 10,5, ILOX6 - 14,5, ILOX9 - 19,5 кДа. Дальнейшее сравнительное изучение этих трех белковых продуктов показало, что почти по всем испытанным параметрам они очень близки. Так, найденное молярное соотношение остатков Tyr : Phe : His в них (ожидаемое для ILOX3 - 3 : 1 : 1, для ILOX6 - 6 : 1 : 1, для ILOX9 - 9 : 1 : 1) составило

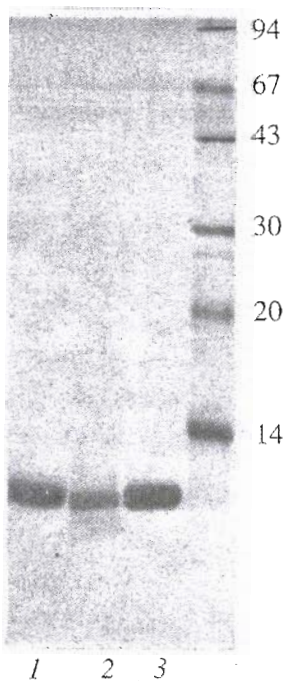


Рис. 3. Электрофорез в 15% ПААГ белковых продуктов, полученных при экспрессии генов *ilox3* (1), *ilox6* (2) и *ilox9* (3). Указаны стандарты молекулярных масс (кДа).

2 - 2.5 : 1.3 - 1.5 : 1. При их трипсинолизе были получены и идентифицированы с заведомыми образцами пептидные фрагменты hIL3 (I) и (II) и окситоциноил-Lys (III):

(I) TSWVNCNSNMIDEIPTHLK (12 - 29),

(II) QPPLPLLDFFNNLNGEDQDILMENNLR (30 - 55),

(III) CYIQNCPLGK (64 - 73, 74 - 83 или 84 - 93).

Определение С-концевой аминокислоты в полученных белках после их гидролиза карбоксипептидазой В показало, что в смеси белковых продуктов, составляющих препарат ILOX3, обнаруживается лизин (возможно, Lys-93), но в препаратах ILOX6 и ILOX9 этой аминокислоты обнаружить не удалось, а после их гидролиза карбоксипептидазой А в обоих препаратах были идентифицированы преимущественно С-концевые остатки Пе (возможно, Пе-86) и Ala (возможно, Ala-98).

Анализ N-концевых последовательностей белков ILOX3 и ILOX6 показал их гетерогенность. При этом в смеси обнаруживались в качестве N-концевых остатки Met и Ala (в примерно одинаковом количестве) и в незначительном количестве остаток Pro и прослеживались перекрывающиеся последовательности MAPMTQ, APMTQ, PMTQ и MTQ. Этот результат вполне обычен для рекомбинантных белков, продуцируемых в *E. coli* и образующих тельца включения. Он объясняется неполным гидролизом рекомбинантного белка при действии метионинаминопептидазы *E. coli* в условиях интенсивного синтеза в клетках продуцента.

При сравнительном масс-спектрометрическом изучении винилпиридилированных производных белков ILOX3 и ILOX6 оказалось, что оба продукта характеризуются наличием размытого пика молекулярного иона со средним значением M 9358 и 9407 Да соответственно. Регистрируемые пики ионов имеют на полувысоте ширину порядка 400 Да, что указывает на высокую гетерогенность анализируемых образцов.

Наконец, при масс-спектрометрическом изучении винилпиридилированных продуктов из триптических гидролизатов тех же белков были идентифицированы следующие пептидные фрагменты:

RPNLEASKCYIQNCPLG (56 - 72),

ASKCYIQNCPLGKCYI (61 - 76),

PLGKCYIQNCPLGKCY (70 - 85),

CYIQNCPLGKCYIQNC (64 - 79 или 74 - 89),

CYIQNCPLGKCYIQNCPLGKCY (64 - 85).

Все эти данные свидетельствуют о том, что белковые продукты представляют собой неомогенные в С-концевой последовательности вещества,

образовавшиеся в результате деструкции в пределах второй (74 - 83) или третьей (84 - 93) структурной единицы окситоциноил-Lys.

Поскольку, согласно установленной нуклеотидной последовательности генов *ilox3*, *ilox6* и *ilox9*, преждевременная терминация транскрипции либо трансляции в указанных пределах маловероятна, можно предположить, что образование укороченных белковых продуктов происходит в результате деградации либо мРНК, либо полноразмерных продуктов трансляции ILOX3, ILOX6 и ILOX9. Известно, что процессинг мРНК наблюдается в *E. coli* в результате десинхронизации трансляции и транскрипции с очень активного T7-промотора [5]. Этот фактор может служить, по крайней мере частично, причиной образования укороченных продуктов в препаратах ILOX6 и ILOX9, полученных при экспрессии в *E. coli* BL21 (DE3). Однако им нельзя объяснить возникновение таких укороченных продуктов в препаратах ILOX3, ILOX6 и ILOX9 при экспрессии в *E. coli* TG1 (транскрипция с промотора P_{lac}). Мы полагаем, что здесь наблюдается неизвестный ранее тип процессинга белка. Этот процесс, по видимому, связан со структурой фрагмента, соединяющего третью и четвертую структурные единицы окситоцина:

в ILOX6 - LGKGSNGASKCY (91 - 103),

в ILOX9 - LGKGSNDARPRQGSIAASKCY (91 - 111).

Общей частью этих структур, не повторяющейся в других участках аминокислотных последовательностей трех белков, является гексапептид LGKGSN (91 - 96). Можно предположить, что этот гексапептид - сайт узнавания протеиназы с невысокой специфичностью места расщепления, гидролизующей белок вблизи сайта узнавания. Возможно, в случае белка ILOX3 роль этого сайта частично выполняет С-концевой трипептид LGK.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали трис, акриламид, N,N'-метилэненбисакриламид, персульфат аммония (Merck); N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (Reanal); агарозу, АТФ, dNTP, бромистый этидий (Sigma); мочевины, ос. ч. ("Реахим"); агар, триптон, дрожжевой экстракт (Difco); [γ - 32 P]АТФ, [α - 32 P]dАТФ (2000 Ки/ммоль, Обнинск); T4-ДНК-лигазу (КФ 6.5.1.1), T4-полинуклеотидкиназу (КФ 2.7.1.78); Taq-ДНК-полимеразу, модифицированную T7-ДНК-полимеразу и ДНК-полимеразу Кленова (КФ 2.7.7.7); рестрикционные эндонуклеазы (КФ 32.1.23.x) *Nco*I, *Hind*III, *Eco*RI, *Bgl*II, *Xba*I (Fermentas, Вильнюс).

Защищенные олигонуклеотиды синтезировали традиционным фосфоамидитным методом на синтезаторе ASM-102U ("Биосер", Новосибирск)

и после полного деблокирования выделяли как описано в работе [1].

Условия экспериментов по получению рекомбинантных плазмид, трансформации компетентных клеток, клонированию, а также гель-электрофорезу и выделению ДНК из гелей приведены в работе [6].

Гидролиз рестриктазами проводили в универсальном буфере KGB [7].

ПЦР осуществляли на амплификаторе DNA Thermal Cycler (Perkin-Elmer-Cetus) в 100 мкл инкубационной смеси, содержащей 0.01 пмоль ДНК матрицы, по 100 пмоль соответствующих праймеров, сумму dNTP (каждый в концентрации 0.5 мМ), 67 мМ трис-НСl (рН 8.3), 6 мМ MgCl₂, 1 мМ дитиотреит, 17 мМ (NH₄)₂SO₄, 17 мкг желатина и 5 ед. акт. Taq-ДНК-полимеразы. Для предотвращения испарения на реакционную смесь наслаивали силиконовое масло. Инкубацию проводили в ДНК-амплификаторе в следующем режиме: денатурация – 30 с при 94°C, отжиг – 30 с при 52°C, элонгация – 30 с при 72°C. Продукты амплификации разделяли электрофорезом в 2.5% агарозном геле и фрагменты ДНК выделяли из легкоплавкой агарозы методом вымораживания агарозы [8].

Секвенирование ДНК проводили с дидезокси-терминаторами и секвеназой (модифицированной T7-ДНК-полимеразой).

Для анализа белков 1 мл бактериальной культуры центрифугировали, растворяли в лизирующем буфере [9], нагревали 5 мин при 100°C и белки разделяли в 15% ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия [9]. Гели прокрашивали кумасси R-250 и сканировали на хроматосканере CS-930 (Shimadzu, Япония).

Для выделения рекомбинантных белков PLOX3, PLOX6 и PLOX9 штаммы продуцентов выращивали в богатой среде, содержащей 50 мкг/мл ампициллина, в 10-литровом ферментере. Клеточную массу отделяли центрифугированием и суспензию клеток в буфере 30 мМ трис-НСl, рН 7.5, дезинтегрировали трехкратным пропусканием через проточный дезинтегратор (Gaulin, США) со скоростью 300 л/ч при 600 атм. Отмывку телец включения от водорастворимых примесей проводили в режиме диафильтрации на фильтрационной установке Pellikon (Millipore, США) с касетными фильтрами HVLP (0.2 мкм). Солюбилизацию телец включения проводили в растворе, содержащем 7.5 М мочевины, 30 мМ трис-НСl (рН 7.5), 1% 2-меркаптоэтанол, и отделяли от нерастворимых примесей на той же фильтрационной установке. Заключительную очистку рекомбинантных белков проводили с помощью офВЭЖХ

на колонке (21.2 × 150 мм) Beckman UltraPrep C18 при помощи системы Waters Delta Prep 3000 (США) в градиенте концентрации 30 - 60% ацетонитрила в 0.1% трифторуксусной кислоте.

Для полного трипсинолиза суспензию 100 мг рекомбинантного белка в 10 мл 0.1 М аммоний-карбонатного буфера, рН 8.5, обрабатывали 2 мг трипсина 6 ч при 37°C до полного растворения осадка. Полноту гидролиза белка контролировали с помощью ВЭЖХ, используя смолу Sepharon C-18, в градиенте концентрации 20 - 80% ацетонитрила в 0.1% трифторуксусной кислоте. Частичный трипсинолиз проводили в тех же условиях, но более короткое время.

Перед винилпиридинилированием рекомбинантные белки или их триптические гидролизаты обрабатывали восстанавливающим буфером (0.1 М трис-НСl, рН 7.8, 7 М мочевины, 0.3 М 2-меркаптоэтанол), затем к раствору прибавляли винилпиридин до концентрации 0.5 М и через 10 мин винилпиридинилированные продукты выделяли с помощью офВЭЖХ.

Масс-спектры винилпиридинилированных продуктов снимали на время-пролетном масс-спектрометре с электрогидродинамическим источником [10]. Для анализа фракции, собранные вблизи вершины хроматографического пика, разбавляли ацетонитрилом (1 : 1) и вводили в масс-спектрометр со скоростью 2 мкл/мин. Время записи одного спектра составляло 30 с.

Авторы выражают благодарность Н.И. Хорошиловой (ИБХ РАН) за С-концевой аминокислотный анализ белков, И.В. Назимову (ИБХ РАН) за определение N-концевых аминокислотных последовательностей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гуревич А.И., Качалина Т.А., Каюшин А.Л., Коростелева М.Д., Мирошников А.И. // Биоорганическая химия. 1993. Т. 19. С. 629 - 632.
2. Гуревич А.И., Есинов Р.С., Качалина Т.А., Каюшин А.Л. // Биоорганическая химия. 1995. Т. 21. С. 286 - 292.
3. Гуревич А.И., Мальцев К.В. // II Российский национальный конгресс "Человек и лекарство". Тез. докл. 1995. С. 149.
4. Луценко С.В., Гуревич А.И., Птицын Л.Р., Рязанова Л.А., Смирнов В.А. // Биоорганическая химия. 1992. Т. 18. С. 391 - 397.
5. Iost I., Dreyfus M. // EMBO J. 1995. V. 14. P. 3252 - 3261.
6. Гуревич А.И., Некрасова О.В. // Биоорганическая химия. 1988. Т. 14. С. 149 - 152.

7. McClelland M., Hanish J., Nelson M., Patel Y. // Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. P. 364.
8. Lian Qian, Wilkinson M. // BioTechniques. 1991. V. 10. P. 736 - 737.
9. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680 - 685.
10. Mirgorodskaya O.A., Shevchenko A.A., Dodonov A.F., Chernushevich I.V., Miroshnikov A.I. // Anal. Chem. 1994. V. 66. P. 99 - 107.

Recombinant Proteins Containing Oligomeric Sequences of Oxytocin

A. I. Gurevich*,¹ T. A. Kachalina*, A. L. Kayushin*, M. D. Korosteleva*,
K. V. Mal'tsev*, O. A. Mirgorodskaya**, and A. I. Miroshnikov*

* Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, V-437, GSP-7, 117871 Russia

** Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

Abstract—Expression plasmids were constructed with genes encoding the ILOX3, ILOX6, and ILOX9 recombinant proteins, which contain the C-terminal fragments of trimer, hexamer, or nonamer of oxytocinoyl-Lys. Upon expression in *E. coli*, all three genes yielded inclusion bodies containing protein products of similar length and heterogeneous in the C-terminal region. It is likely that in the case of the *ilox3* gene, the obtained protein mixture includes the full-length product of translation with the C-terminal lysine. In the case of the *ilox6* and *ilox9* genes, the protein products are formed as the result of a site-specific proteolysis in the regions between the second and the fourth oxytocin units.

Key words: gene expression, recombinant proteins, site-specific proteolysis.

¹ To whom correspondence should be addressed.