



УДК 547.963.32+577.21

## МУТАНТЫ ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ ЧЕЛОВЕКА: ПОЛУЧЕНИЕ И НЕКОТОРЫЕ СВОЙСТВА

© 1996 г. Л. Н. Шингарова, Л. Н. Сагайдак, Р. Л. Турецкая\*<sup>+</sup>,  
С. А. Недоспасов\*<sup>+</sup>, Д. С. Есипов, В. Г. Коробко<sup>#</sup>

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

\* Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва;

<sup>+</sup> Национальный институт рака, Фредерик, Мэриленд, США

Поступила в редакцию 24.11.95 г.

С помощью полимеразной цепной реакции получены мутантные гены фактора некроза опухолей человека (TNF- $\alpha$ ), кодирующие белки с аминокислотными заменами и делециями (мутеины). Среди них мутанты R32H, A33S, F144L, I118M, I118A, двойной мутант R32H-F144L и мутант с делецией четырех аминокислотных остатков 67–70. Мутантные гены экспрессированы в *E. coli* под контролем конститутивных промоторов. Разработан простой метод выделения мутеинов и исследованы их физико-химические свойства. С помощью спектров КД и кросс-сшивок показано, что все полученные мутанты, за исключением F144L и I118A, образуют пространственную структуру, сходную с TNF- $\alpha$ . Исследованы биологические свойства мутеинов. Установлено, что мутеины R32H и A33S обладают пониженной цитотоксичностью в отношении мышечных фибробластов L929, в то время как мутант F144L и двойной мутант R32H-F144L оказались практически неактивными.

*Ключевые слова:* фактор некроза опухолей человека (TNF- $\alpha$ ), мутанты, полимеразная цепная реакция, экспрессия в *E. coli*.

Фактор некроза опухолей (TNF- $\alpha$ ), один из центральных белковых иммуномедиаторов и провоспалительный цитокин, продуцируемый в основном активированными макрофагами, был первоначально охарактеризован как белок, вызывающий некроз экспериментальных опухолей у мышей [1]. Противоопухолевое действие TNF- $\alpha$  представляет собой сложный процесс и может быть результатом воздействия фактора на клетки как сосудистого эндотелия, так и иммунной системы [2]. Собственно индуцированный TNF- $\alpha$  некроз опухолей происходит, по-видимому, в результате активации эндотелия и последующих прокоагуляторных эффектов [3]. С другой стороны, как центральный медиатор воспаления TNF- $\alpha$  вызывает сильные системные эффекты вплоть до септического шока [4], что ограничивает его применение для лечения опухолей [5]. В последние годы разработаны методы местного противоопухолевого применения TNF- $\alpha$ , причем наибольший успех был достигнут при лечении меланом и сарком конечностей комбинацией TNF- $\alpha$ ,

интерферона- $\gamma$  и химиотерапии при регионарной перфузии [6].

Разнообразие биологических свойств TNF- $\alpha$  опосредовано двумя высокоаффинными рецепторами, TNFR55 и TNFR75, которые являются также и рецепторами лимфотоксина- $\alpha$ , родственного TNF- $\alpha$  растворимого цитокина [7–9]. Один из рецепторов, TNFR55, универсален и представлен на поверхности практически всех клеток, тогда как другой, TNFR75, чаще встречается на поверхности гемопоэтических клеток [10, 11], а также на клетках эндотелия [12]. Существование двух рецепторов для одного белка позволило предположить, что они модулируют разные биологические свойства этого цитокина. В частности, сообщалось, что рецептор TNFR75 вносит основной вклад в развитие системной токсичности TNF- $\alpha$  [4, 13]. Перспективным подходом к выявлению функционально важных участков для лиганд-рецепторных взаимодействий является создание мутантов TNF- $\alpha$ , взаимодействующих специфически с одним из двух типов рецепторов [14]. Это может привести к получению новых форм цитокина, обладающих меньшей общей токсичностью, но сохраняющих высокую цитотоксичность по отношению к опухолевым клеткам. Настоящая работа

Сокращения: TNF- $\alpha$  – фактор некроза опухолей; TNFR – рецептор фактора некроза опухолей; PMSF – фенилметилсульфонилфторид; в формулах олигонуклеотидов префикс “d” для краткости опущен.

<sup>#</sup> Автор для переписки.

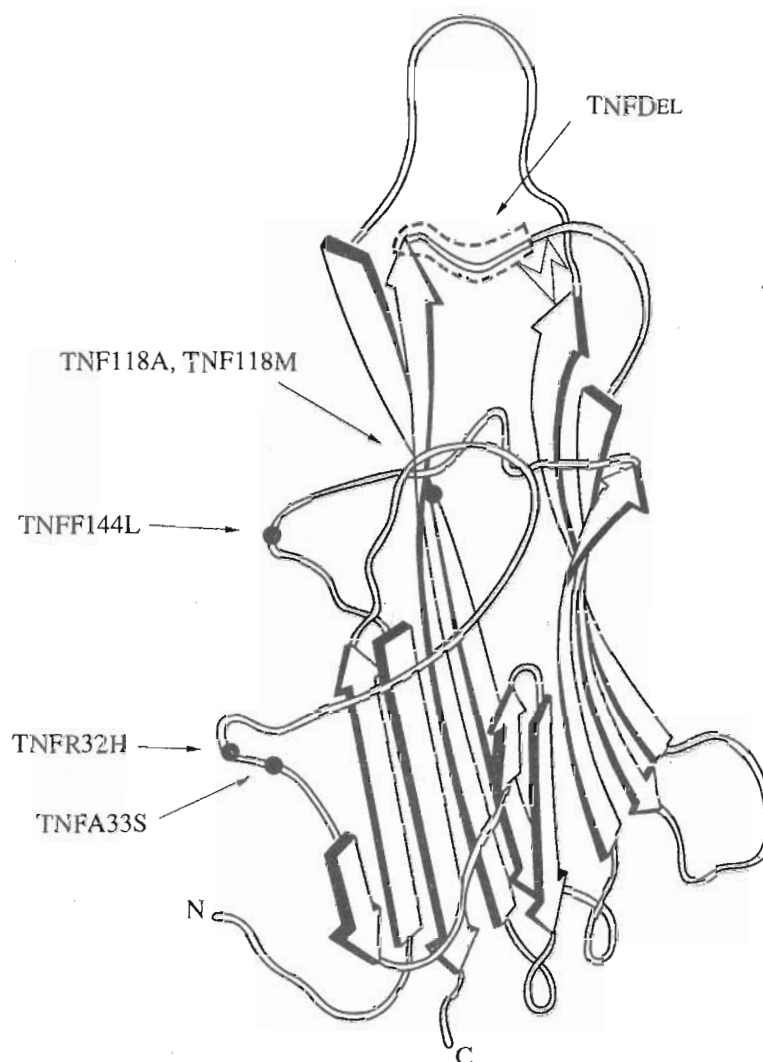


Рис. 1. Пространственная структура мономерной молекулы TNF- $\alpha$  в соответствии с работой [20]. Стрелками показано положение мутаций.

посвящена получению мутантов TNF- $\alpha$  (мутантов) с новыми свойствами.

Ранее нами был клонирован фрагмент генома человека, содержащий гены фактора некроза опухоли и лимфотоксина- $\alpha$  (TNF- $\beta$ ) [15]. На его основе был сконструирован полусинтетический ген, кодирующий TNF- $\alpha$  без двух N-концевых аминокислот [16]. Этот ген был помещен в плазмиде pTNF31 под контроль двух конститутивных промоторов, A2 и A3, из ранней области бактериофага T7 и синтетической последовательности Шайна-Дальгарно. Такая конструкция обеспечивала высокий уровень биосинтеза рекомбинантного TNF- $\alpha$  клетками *E. coli* штамма SG20050. Ранее были получены мутантные белки TNF- $\alpha$ , содержащие точечные замены в C-концевой части молекулы [17, 18]. Исследование биологических свойств мутантов показало важную роль этого участка в проявлении биологической активности

TNF- $\alpha$ . В то же время не удалось получить мутанты с пониженной общей токсичностью.

В настоящей работе продолжен поиск мутантов TNF- $\alpha$  с измененной биологической активностью. Выбор положения и типа мутации был сделан с использованием предсказательной компьютерной программы Pro\_Anal [19]. Эта программа, предназначенная для анализа связи между структурой и функцией белков и пептидов, учитывает вклад каждого аминокислотного остатка в формирование пространственной структуры функциональных доменов белка. Таким образом, были определены три участка молекулы TNF- $\alpha$ , мутации в которых предположительно должны изменить биологические свойства белка.

Наиболее интересная для мутагенеза область располагается в первой петле (рис. 1), которая принимает участие в связывании с рецептором TNFR55, как это было показано с помощью

мутационного анализа [21, 22]. Участие этого района молекулы лиганда во взаимодействии с TNFR55 было прямо подтверждено рентгеноструктурным анализом комплекса растворимого рецептора TNFR55 с лимфотоксином (TNF- $\beta$ ) [23], обладающим сходной с TNF- $\alpha$  пространственной структурой [24]. Мы запланировали получение двух мутантов по первой петле с заменами R32H и A33S.

Второй выбранный нами участок молекулы TNF- $\alpha$  располагается в последней петле, которая пространственно сближена с первой петлей. Согласно данным работы [23], аминокислотные остатки 155–159 TNF- $\beta$  участвуют в контактах с рецептором. Им соответствуют аминокислоты 139–144 TNF- $\alpha$ . Поэтому была выбрана мутация, приводящая к замене фенилаланина в положении 144 на лейцин (мутант F144L). Введение одновременно дополнительной мутации R32H предположительно должно усиливать влияние замены F144L.

Третий участок молекулы TNF- $\alpha$ , представляющий интерес для мутагенеза по данным компьютерного анализа, расположен в месте "пересечения" двух  $\beta$ -складок. Для мутагенеза был выбран остаток изолейцина в положении 118, который заменяли на метионин (I118M) или аланин (I118A).

Наконец, еще одна мутация (Del167–70) – делеция четырех аминокислотных остатков 67–70 (QGCP) из неупорядоченного участка между третьим и четвертым тяжами (рис. 1). По данным работы [23], соответствующий участок TNF- $\beta$  не вовлечен в контакты с рецептором TNFR55. С другой стороны, удаление этого фрагмента из молекулы лимфотоксина значительно увеличивало его цитотоксичность *in vitro* по отношению к линии клеток аденокарциномы кишечника и аффинность связывания с поверхностными рецепторами мышечных фибробластов и человеческой клеточной линии WiDR [25].

Мутагенез проводили с помощью двухступенчатой ПЦР. В качестве источника гена TNF- $\alpha$  использовали плазмиду pTNF331 (рис. 2) – производную плазмиды pTNF31 [16]. Например, для получения гена, кодирующего мутант R32H, на первом этапе проводили амплификацию 3'-концевой части гена при помощи якорного праймера ATATCACCAGCTCACCGT (XIV) (табл. 1), комплементарного участку плазмиды pTNF31 за терминирующим кодоном, и мутагенизирующего праймера CTGAACCGCCATGCCAATGCCCT (I) и амплификацию 5'-концевой части гена с помощью частичного комплементарного олигонуклеотида (I) праймера GGCATTGGCATGGCGGTTCAGCC (II) и второго якорного праймера TCGATAAATTCGGTACCTAA (XIII), соответствующего участку плазмиды pTNF331 непосредственно пе-

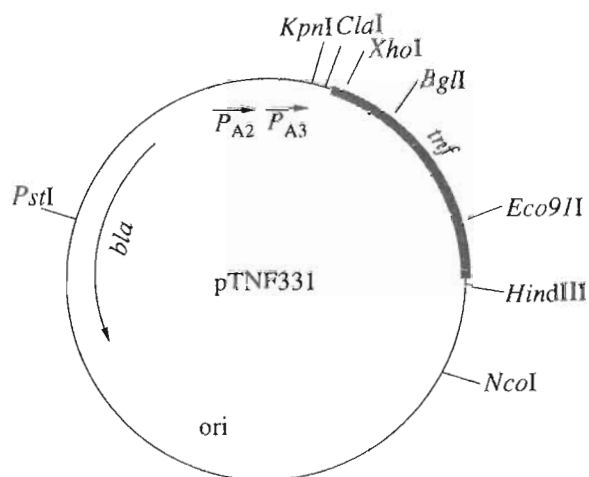


Рис. 2. Схема плазмиды для конструирования и экспрессии мутантных генов TNF- $\alpha$ : *inf* – ген TNF- $\alpha$ , *bla* – ген  $\beta$ -лактамазы,  $P_{A2}$  и  $P_{A3}$  – промоторы A2 и A3 ранней области фага T7.

ред участком инициации трансляции. На следующем этапе очищенные с помощью электрофореза в агарозном геле продукты первых реакций амплификации отжигали и проводили ПЦР с использованием только якорных праймеров. В результате получили фрагмент ДНК, содержащий мутантный ген TNF- $\alpha$ . На заключительном этапе продукты ПЦР гидролизовали рестриктазами *KpnI* и *BglII* и образовавшийся небольшой фрагмент клонировали в плазмиду pTNF331 по тем же сайтам с помощью мультikomпонентного лигирования.

Аналогичным образом были получены остальные мутантные гены. Следует отметить, что, выбирая последовательности изменяемого кодона в мутагенизирующих олигонуклеотидах, мы принимали во внимание, во-первых, частоту использования данного кодона в геноме *E. coli* и, во-вторых, возможность введения удобных рестриктных сайтов или уничтожения сайта в исходном векторе для упрощения последующего анализа. Так, плазмиды с генами, кодирующими мутанты R32H и A33S, содержат на один сайт *HaeIII* меньше, тогда как в плазмиде с геном мутанта F144L на один сайт *HaeIII* больше, чем в исходной плазмиде pTNF331.

Стратегия сборки рекомбинантных плазмид была направлена на использование максимально коротких фрагментов, образующихся после гидролиза продуктов ПЦР соответствующими рестриктазами (табл. 1). Это уменьшало вероятность появления ошибок при амплификации и облегчало последующее секвенирование встроенного фрагмента. Таким образом, были сконструированы плазмиды pTNFR32H, pTNFR33S, pTNFF144L, pTNFI118M, pTNFI118A и pTNFDel. Плазмиды



**Таблица 1.** Структуры мутагенизирующих и якорных олигонуклеотидных праймеров и сайты рестриктаз для клонирования мутантных фрагментов гена TNF- $\alpha$

Мутант	Олигонуклеотид 5'-----3'	Сайты рестрикции
R32H	CTGAACCGCCATGCCAATGCCCT (I) GGCATTTGGCATGGCGGTTTCAGCC (II)	<i>KpnI, BglII</i>
A33S	AACCGCCGGTCTAATGCCCTCCT (III) GAGGGCATTAGACCGGCGGTTCA (IV)	<i>KpnI, BglII</i>
F144L	TATCTCGACCTGGCCGAGTCTGG (V) AGACTCGGCCAGGTTCGAGATAGT (VI)	<i>Eco91I, HindIII</i>
I118M	TATGAGCCCATGTATCTGGGAG (VII) TCCCAGATACATGGGCTCATAС (VIII)	<i>BglII, Eco91I</i>
I118A	TATGAGCCCGCATATCTGGGAG (IX) TCCCAGATATGCGGGCTCATAС (X)	<i>BglII, Eco91I</i>
Del67-70	CCTCTTCAAGGGCTCCACCCATGTGC (XI) GCACATGGGTGGAGCCCTTGAAGAGG (XII)	<i>XhoI, HindIII</i>
Якорные праймеры	TCGATAAATTCGGTACCTAA (XIII) ATATCACCAGCTCACCGT (XIV)	

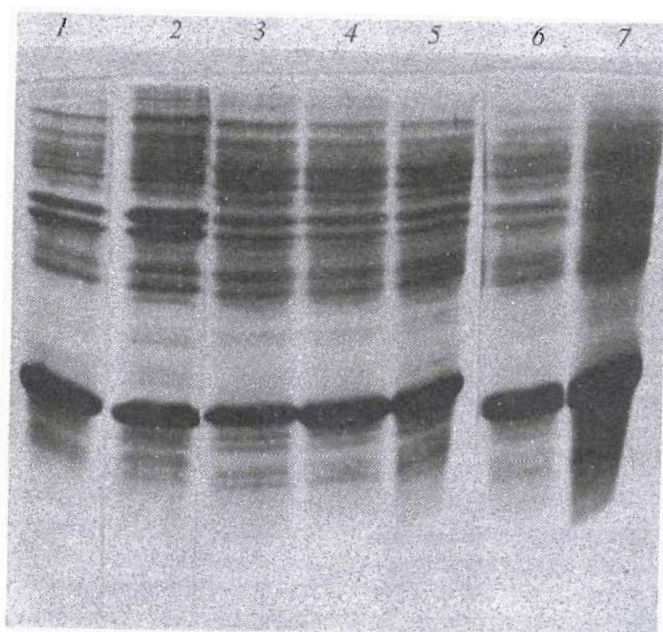
pTNF32-144, содержащая двойную мутацию в гене TNF- $\alpha$  с аминокислотными заменами R32H и F144L, была получена рекомбинацией между плазмидами pTNFR32H и pTNFF144L по сайтам рестрикции *Eco91I* и *PstI*. Структура рекомбинантных плазмид была подтверждена рестрикт-

ным анализом и секвенированием амплифицированных фрагментов.

Все плазмидные конструкции обеспечивали высокий уровень экспрессии мутантных генов в клетках *E. coli* штамма SG20050 (рис. 3). Мутантные белки выделяли разработанным ранее методом, который включает разрушение бактериальных клеток ультразвуком и последующую хроматографию осветленного лизата сначала на колонке с гидроксапатитом, а затем на колонке с DEAE-ToyoPearl. Этот метод обеспечивал высокую степень очистки мутеинов (рис. 4), которые были практически свободны от примесей бактериального эндотоксина [18].

Все полученные нами мутанты, за исключением двух, синтезировались в клетках *E. coli* как растворимые белки. Мутант F144L оказался лишь частично растворимым в цитоплазме бактерий (рис. 5). По всей видимости, замена ароматического фенильного остатка на изопропильный нарушает гидрофобные взаимодействия в С-концевой части мономера TNF- $\alpha$ , что затрудняет сворачивание белка в нативную конформацию. Замена Ile в положении 118 на Ala приводит к накоплению мутанта в виде нерастворимых частиц. В то же время замена того же Ile на Met никак не влияет на растворимость белка в цитоплазме бактерий.

Следует отметить, что остаток Ile<sup>118</sup> расположен в месте наибольшего сближения двух  $\beta$ -тяжей (рис. 1). Весьма вероятно, что боковая цепь этого аминокислотного остатка участвует в стабилизации такого расположения  $\beta$ -структур, и



**Рис. 3.** Электрофорез в 13% SDS-ПААГ суммарного клеточного лизата бактерий с плазмидами, кодирующими мутантные белки: 1 – pTNFR32H, 2 – pTNFA33S, 3 – pTNFF144L, 4 – pTNF32-144, 5 – pTNFI118A, 6 – pTNFI118M, 7 – pTNFDel.

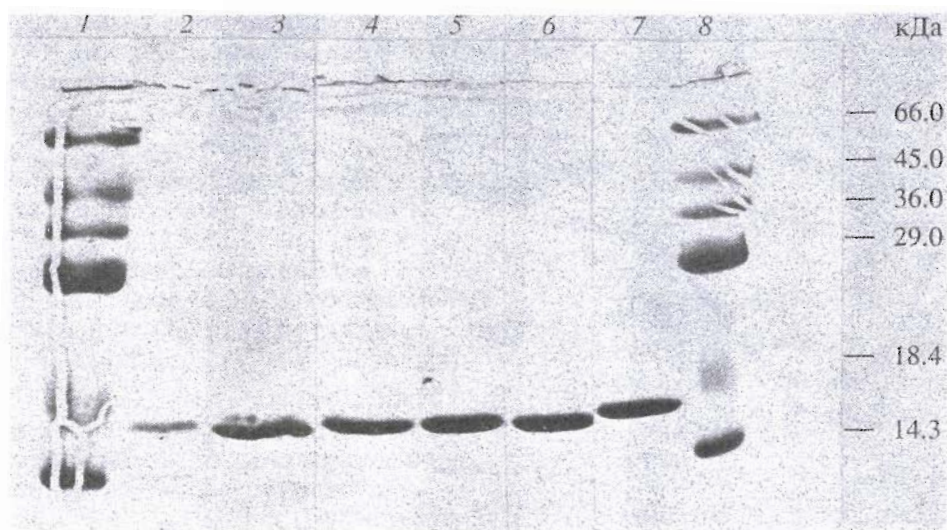


Рис. 4. Электрофорез в 13% SDS-ПААГ очищенных препаратов мутантных белков: 1, 8 – маркеры молекулярной массы, 2 – R32H, 3 – A33S, 4 – F144L, 5 – R32H-F144L, 6 – I118M, 7 – Del67-70.

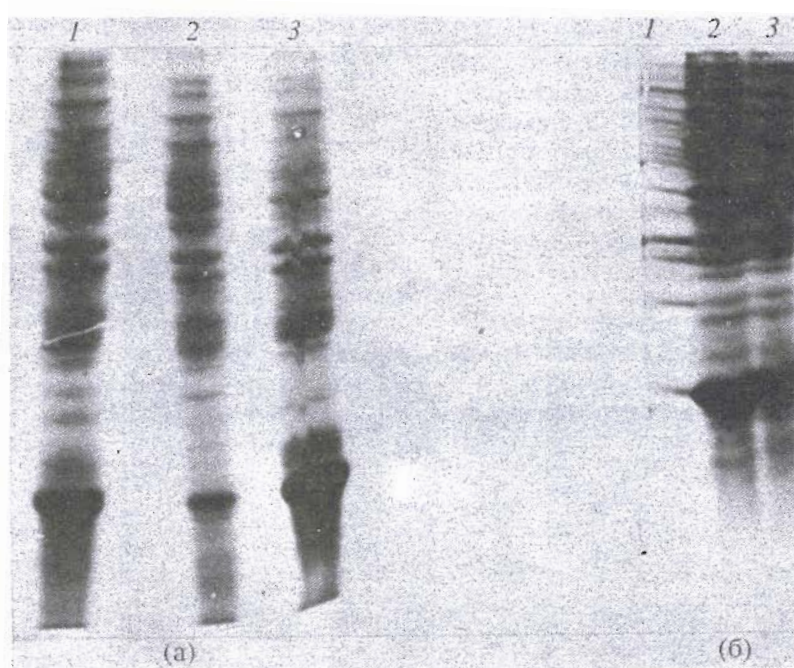


Рис. 5. Электрофорез в 13% SDS-ПААГ клеточных фракций *E. coli* SG20050, содержащих плазмиды pTNFF144L (а) и pTNFF118A (б): 1 – суммарный белок бактерий, 2 – супернатант, 3 – осадок после разрушения клеток ультразвуком.

уменьшение объема бокового радикала при замене изолейцина на аланин приводит к частичному нарушению пространственной структуры белка и образованию нерастворимых агрегатов. Замена же изолейцина на метионин не нарушает взаимодействия тяжей, по-видимому, вследствие того, что боковые радикалы этих остатков близки по объему. Следует также отметить, что плохо растворимый мутантный белок F144L переходит в полностью растворимое состояние при

введении второй мутации в положение 32 (мутант R32H-F144L). Рационально объяснить это наблюдение трудно, так как участки с этими мутациями хотя и сближены пространственно, но находятся в неупорядоченных петлевых участках молекулы TNF- $\alpha$ .

Очевидно, что нарушение сложной пространственной структуры молекулы TNF- $\alpha$  может влиять на биологическую активность. Чтобы проверить, не произошло ли нарушения вторичной



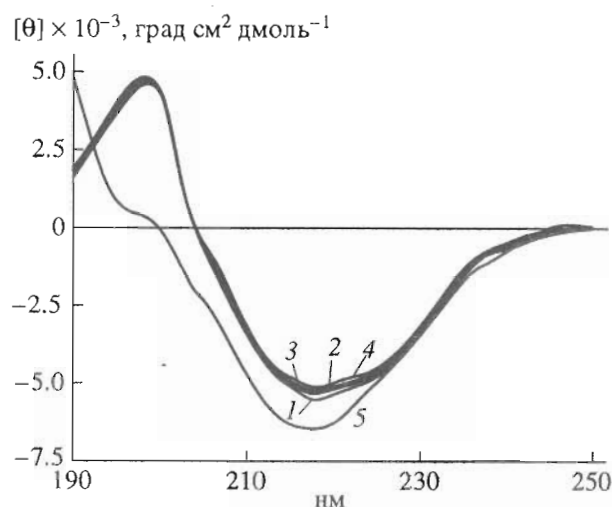


Рис. 6. Спектры кругового дихроизма TNF- $\alpha$  (1) и мутантов R32H (2), A33S (3), R32H-F144L (4), F144F (5).

структуры в мутантных вариантах по сравнению с исходным белком, мы измерили спектры КД всех выделенных белков (рис. 6). Оказалось, что спектры КД всех мутантных белков, за исключением мутанта F144L, и интактного TNF- $\alpha$  сходны. В спектрах всех белков имеется характерный минимум при 219 нм, тогда как спектр мутанта F144L несколько смещен в коротковолновую область, что свидетельствует о меньшей упорядоченности структуры этого мутеина.

Известно, что биологически активной формой TNF- $\alpha$  является тример [20, 26]. В связи с этим мы провели кросс-сшивку полученных белков с помощью бифункционального реагента и раздели-

ли продукты реакции в SDS-ПААГ. Оказалось, что как белок дикого типа, так и мутантные белки сшиваются с преимущественным образованием тримеров (рис. 7).

Биологическую активность очищенных белков исследовали в стандартном цитотоксическом тесте на линии L929 фибробластов мыши (табл. 2). Оказалось, что замена I118M лишь незначительно снижает биологическую активность, а делеция аминокислот 67–70 приводит к небольшому увеличению активности по отношению к фибробластам мыши.

Наиболее интересными оказались замены R32H и A33S, которые привели к значительному уменьшению цитотоксической активности. Еще большее падение активности наблюдалось у мутантов F144L и R32H-F144L. Как уже отмечалось, аминокислотные остатки 32 и 33 участвуют в контактах с рецептором TNFR55 [23]. Кроме того, показано, что мутант R32W избирательно связывается с рецептором TNFR55 [14].

Следует отметить, что аминокислотные остатки 32, 33 и 144 хотя и сближены в пространстве, но, возможно, взаимодействуют с разными рецепторами TNF- $\alpha$ . В частности, показано, что мутанты E146H и E146K более избирательно связываются с рецептором TNFR55, тогда как замены расположенного неподалеку остатка Asp<sup>143</sup> на Tyr, Phe или Lys приводят к предпочтительному связыванию с TNFR75 [27]. К настоящему времени получены данные о том, что цитотоксическая активность TNF- $\alpha$  обусловлена скорее всего его взаимодействием с рецептором TNFR55, в то время как провоспалительные свойства опосредуются связыванием с рецептором TNFR75 [28].

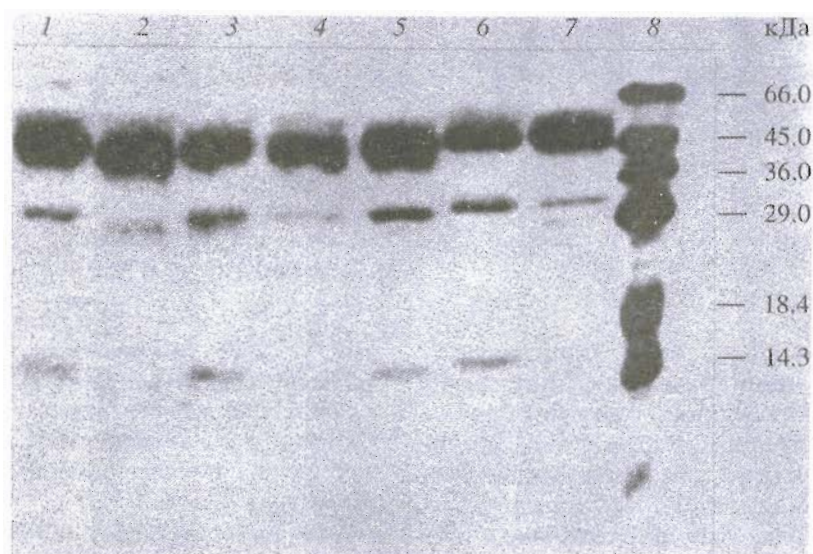


Рис. 7. Электрофорез в 13% SDS-ПААГ продуктов кросс-сшивки интактного TNF- $\alpha$  и мутантов: 1 – TNF- $\alpha$ , 2 –  $\Delta$ 67–70, 3 – R32H, 4 – A33S, 5 – R32H-F144L, 6 – F144L, 7 – I118M, 8 – маркеры молекулярной массы.

Исходя из этого можно предположить, что мутанты R32H и A33S обладают избирательностью к рецептору TNFR55, а двойной мутант R21H-F144L более избирателен для рецептора TNFR75. Окончательный ответ на этот вопрос может быть получен только после изучения связывания мутантных белков с рецепторами TNF- $\alpha$ .

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали акриламид, бисакриламид, меркаптоэтанол, персульфат аммония, трис-гидроксиметиламинометан (трис), N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (TEMED), хлорид магния (Merck, Германия); глицерин, додецилсульфат натрия (SDS), этилендиаминтетрауксусную кислоту (EDTA), борную кислоту (Serva, Германия); триптон, дрожжевой экстракт, агар (Difco, Англия); агарозу (FMC, США); эндонуклеазы рестрикции *Eco*91I, *Bgl*II, *Kpn*I, *Nco*I, *Hind*III, *Pst*I, *Xho*I, *Cl*aI, а также ДНК-полимеразу из *Thermus aquaticus* и ДНК-полимеразу фага T7 производства "Ферментас" (Вильнюс). ДНК-лигаза фага T4 выделена в лаборатории химии генов ИБХ РАН.

Бактериальные штаммы: *E. coli* XL1-Blue *recA*<sup>-</sup> (*recA*1, *lac*<sup>-</sup>, *endA*1, *gyrA*96, *thi*, *hsdR*17, *supE*44, *relA* (F<sup>-</sup>*proAB*, *lacI*<sup>q</sup>, *lacZ*ΔM15, *Tn10*)) фирмы Stratagene (США); *E. coli* SG 20050 *recA* (F<sup>-</sup>, *araD*139, Δ(*argF-lac*)U169, *flbB*5301, *deoC*1, *rpsL*150, *relA*1, Δ*lon*-100, *csp*-50::Mu dI) [29].

Плазмидную ДНК выделяли как описано в работе [30], *E. coli* выращивали в стандартных питательных средах, приготовление компетентных клеток и трансформацию проводили по протоколу [31], рестриктный анализ ДНК – согласно рекомендации фирмы "Ферментас" (Вильнюс).

Фрагменты ДНК лигировали как описано ранее [32].

Сайт-направленный мутагенез гена TNF- $\alpha$  проводили с помощью двухступенчатой ПЦР (20 циклов) в 100 мкл раствора, содержащего 8.25 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 27.5 мМ трис-НСl (рН 8.8), 1.65 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2.75 мМ меркаптоэтанол, от 50 до 100 пмоль каждого праймера, 50–200 нг матрицы и 2.5 ед. ДНК-полимеразы Taq в приборе Perkin-Elmer Cetus (США). Каждый цикл состоял из денатурации матрицы (94°C, 30 с), отжига праймеров (50 или 55°C, в зависимости от длины и состава олигонуклеотидов, 1 мин) и достройки цепей (72°C, 1 мин). Продукты амплификации выделяли с помощью электрофореза в 1% геле легкоплавкой агарозы, амплифицированные фрагменты обрабатывали соответствующими рестриктазами для получения липких концов и целевой продукт, выделенный электрофорезом в 1% легкоплавкой агарозы, клонировали в плазмиду pTNF331.

Так, например, для конструирования плазмиды pTNFR32H мутагенез осуществляли с помо-

Таблица 2. Цитотоксическая активность мутантных TNF- $\alpha$

TNF-мутанты	Цитотоксическая активность, ед./мг*	Относительная активность
TNF- $\alpha$ (дикий тип)	$3.3 \times 10^6$	1
R32H	$3.3 \times 10^4$	$1 \times 10^{-2}$
A33S	$4.3 \times 10^4$	$1.3 \times 10^{-2}$
I118A	–	–
I118M	$0.6 \times 10^6$	$2 \times 10^{-1}$
F144L	$2 \times 10^3$	$1.65 \times 10^{-3}$
R32H-F144L	$2 \times 10^3$	$1.65 \times 10^{-3}$
Del67-70	$5 \times 10^6$	1.51

\* Концентрацию белков определяли с помощью набора Bio-rad protein assay kit II.

щью мутагенизирующих праймеров I и II, якорных праймеров XIII и XIV (табл. 1), после чего продукт ПЦР обрабатывали рестриктазами *Kpn*I и *Bgl*II и лигировали с фрагментами *Bgl*-*Nco*I и *Nco*I-*Kpn*I исходной плазмиды pTNF331. Плазмиды pTNFA33S, pTNFF144L, pTNFI118M, pTNFI118A и pTNFDel получали аналогичным образом с использованием олигонуклеотидов и рестриктаз, перечисленных в табл. 1. Плазмиду pTNF32-144 реконструировали из малого *Pst*I-*Eco*91I-фрагмента плазмиды pTNFR32H и большого *Eco*91I-*Pst*I-фрагмента плазмиды pTNFF144L.

Анализ нуклеотидной последовательности ДНК проводили с помощью ПЦР, используя 5'-<sup>32</sup>P-меченые олигонуклеотиды (XIII) и (XIV) в качестве праймеров как описано в работе [33].

Мутантные белки выделяли по следующей схеме. Ночную культуру клеток *E. coli*, содержащих соответствующую плазмиду (250 мл), центрифугировали 10 мин при 4000 об/мин, осадок суспендировали в 10 мл буфера, содержащего 20 мМ трис-НСl (рН 7.5), 200 мМ NaCl, 0.1% меркаптоэтанол и 10 мкг/мл PMSF. Суспензию озвучивали импульсами по 10–15 с 10 раз при частоте 22 кГц. Осадок отделяли центрифугированием (15 мин при 15000 об/мин), супернатант диализовали против буфера А (50 мМ Na-фосфат, рН 7.5, 0.1% меркаптоэтанол, 10 мкг/мл PMSF). Диализат наносили на колонку (1.5 × 20 см) с гидроксиапатитом (Bio-Rad), предварительно уравновешенную этим же буфером. Разделение проводили в линейном градиенте концентрации фосфата натрия (50–300 мМ) в буфере А. Фракции, содержащие TNF- $\alpha$  (по данным электрофореза в SDS-ПААГ), диализовали против буфера Б (20 мМ трис-НСl, рН 7.5, 0.1% меркаптоэтанол, 10 мкг/мл PMSF) и наносили на колонку (1 × 20 см) с DEAE-Toyopearl



650 М (Тоюо Soda, Япония), уравновешенную буфером Б. Целевой белок элюировали линейным градиентом NaCl (0–0.15 М) в буфере Б и фракции анализировали с помощью электрофореза в SDS-ПААГ. Фракции, содержащие очищенный белок, объединяли, стерилизовали фильтрованием через фильтры с диаметром пор 0.2 мкм (Millipore) и хранили при 4°C. Концентрацию белка определяли, используя Protein assay kit II (Bio-Rad, США).

Электрофорез белков осуществляли по методу Лэммли [34] в 13% ПААГ.

Цитотоксическую активность мутантных белков определяли в стандартном тесте на линиях L929 фибробластов мыши в присутствии актиномицина D [35].

Кросс-сшивки TNF- $\alpha$  и мутеинов проводили, используя в качестве сшивающего реагента глутаровый альдегид [36]. К раствору белка в буфере А в концентрациях 0.1–0.3 мг/мл добавляли 25% водный раствор глутарового альдегида до конечной концентрации 0.1 М. Смесь выдерживали 1.5 ч при 20°C, избыток непрореагировавшего альдегида разрушали добавлением свежеприготовленного 1 М водного NaBH<sub>4</sub> до концентрации 0.1 М. Через 20 мин при 20°C образцы наносили на SDS-ПААГ и проводили электрофоретическое разделение.

КД-спектры TNF- $\alpha$  и мутантов измеряли в кювете с длиной оптического пути 0.01 см на спектрофотометре JASCO J-500С как описано в работе [21]. Белки (0.1–0.3 мг/мл) растворяли в буфере, содержащем 20 мМ трис-HCl (pH 7.5), 90 мМ NaCl и 0.1% меркаптоэтанол.

Авторы выражают благодарность А.М. Ерошкину (ГНЦ вирусологии “Вектор”, Новосибирск) за помощь в выборе мутантов TNF- $\alpha$  и И.А. Куделиной (ИБХ РАН) за измерение спектров КД.

Работа финансировалась грантами Международного научного фонда NF7000 и NF7300 и грантом № 3-3.27 в рамках ГНТП “Новейшие методы биоинженерии”, раздел “Белковая инженерия”.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Carswell E.A., Old L.J., Kassel R.L., Green S., Fiore N., Williamson B. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1975. V. 72. P. 3666–3670.
2. Sugarman B.J., Aggarwal B.B., Hass P.E., Figari I.S., Palladino M.A., Shepard H.M. // Science. 1985. V. 230. P. 943–946.
3. Fransen L., Van Der Heyden J., Ruyschaert R., Fiers W. // Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 1986. V. 22. P. 419–426.
4. Fiers W. // The Natural Immune System: Humoral Factors / Ed. S. Sim. Oxford: IRL Press, 1993. P. 65–119.
5. Bevilacqua M.P., Pober J.S., Majeau G.R., Fiers W., Cotran R.S., Gimbrone M.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. P. 4533–4537.
6. Taguchi T., Sohmura Y. // Biotherapy. 1991. V. 3. P. 177–186.
7. Loetscher H., Pan Y.-C.E., Lahm H.-W., Gentz R., Brockhaus M., Tabuchi H., Lesslauer W. // Cell. 1990. V. 61. P. 351–359.
8. Schall T.J., Lewis M., Koller K.J., Lee A., Rice G.C., Wong G.H.W., Gatanaga T., Granger G.A., Lentz R., Raab H., Kohr W.J., Goeddel D.V. // Cell. 1990. V. 61. P. 361–370.
9. Smith C.A., Davis T., Anderson D., Solam L., Beckmann M.P., Jerzy R., Dower S.K., Cosman D., Goodwin R.G. // Science. 1990. V. 248. P. 1019–1023.
10. Hohmann H.-P., Brockhaus M., Baeuerle P.A., Remy R., Kolbeck R., Van Loon A.P.G.M. // J. Biol. Chem. 1990. V. 265. P. 22409–22417.
11. Porteu F., Brockhaus M., Wallach D., Engelmann H., Nathan C.F. // J. Biol. Chem. 1991. V. 266. P. 18846–18853.
12. Mackay F., Loetscher H., Stueber D., Gerh G., Lesslauer W. // J. Exp. Med. 1993. V. 177. P. 1277–1286.
13. Brouckaert P., Everaerd B., Libert C., Takahashi N., Cauwels A., Fiers W. // Tumor Necrosis Factor: Molecular and Cellular Biology and Clinical Relevance / Eds W. Fiers, W.A. Buurman. Basel: Karger, 1993. P. 226–232.
14. Van Ostade X., Vandenbeeke P., Everaerd B., Loetscher H., Brockhaus W., Tavernier J., Brouckaert P., Fiers W. // Nature. 1993. V. 361. P. 266–269.
15. Nedospasov S.A., Shakhov A.N., Turetskaya R.L., Mett V.A., Azizov M.M., Georgiev G.P., Korobko V.G., Dobrynin V.N., Filippov S.A., Bystrov N.S., Boldyreva E.F., Chuvpilo S.A., Chumakov A.M., Shingarova L.N., Ovchinnikov Yu.A. // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1986. V. L1. P. 611–623.
16. Коробко В.Г., Добрынин В.Н., Филиппов С.А., Шингарова Л.Н., Чувпило С.А., Болдырева А.Ф., Кравченко В.В., Недоспасов С.А., Шахов А.И., Турецкая Р.Л. // Рос. пат. 1986. № 1438240.
17. Gase K., Korobko V.G., Wisniewski H.G., Le J., Dobrynin V.N., Filippov S.A., Gutsche W., Maksimova Yu.N., Schlott B., Shingarova L.N., Vilcek J., Behnke D. // Immunology. 1990. V. 71. P. 368–371.
18. Kircheis R., Milleck J., Korobko V.G., Shingarova L.N., Behnke D., Schmidt H.E. // Immunology. 1992. V. 76. P. 433–438.
19. Eroshkin A.M., Zhilkin P.A., Fomin V.I. // SABIOS. 1993. V. 9. P. 491–497.
20. Jones E.Y., Stuart D.I., Walker N.P.C. // Nature. 1989. V. 338. P. 225–228.
21. Van Ostade X., Tavernier J., Plange T., Fiers W. // EMBO J. 1991. V. 10. P. 827–836.
22. Loetscher H., Stueber D., Banner D., Mackay F., Lesslauer W. // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. P. 26350–26357.
23. Banner D.W., d'Arcy A., Janes W., Gentz R., Schoenfeld H.-J., Broger C., Loetscher H., Lesslauer W. // Cell. 1993. V. 73. P. 431–445.



24. Eck M.J., Ultsch M., Rinderknecht E., de Vos A.M., Sprang S.R. // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. P. 2119–2122.
25. Wakabayashi T., Asada M., Nagasu T., Iijima A., Hasegawa Y., Shikata Y., Kitoh K. // *J. Biol. Chem.* 1990. V. 265. P. 7604–7609.
26. Smith R.A., Baglioni C. // *J. Biol. Chem.* 1987. V. 262. P. 6951–6954.
27. Van Ostade X., Vandebaele P., Tavernier J., Fiers W. // *Eur. J. Biochem.* 1994. V. 220. P. 771–779.
28. Barbara J.A.J., Smith W.B., Gamble J.R., Van Ostade X., Vandebaele P., Tavernier J., Fiers W., Vadas M.A., Lopez A.F. // *EMBO J.* 1994. V. 13. P. 843–850.
29. Trisler P., Gottesman S. // *J. Bacteriol.* 1984. V. 160. P. 184–191.
30. Maniatis T., Fritsch E.E., Sambrook J. // *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* / Cold Spring Harbor. 1982. P. 368–369.
31. DNA Cloning. A Practical Approach. / Ed. D.M. Glover. Oxford, Washington DC: IRL Press, 1985. V. 1. P. 121.
32. Баренбойм М.Г., Шингарова Л.Н., Коробко В.Г. // *Биоорганическая химия.* 1995. Т. 21. С. 524–527.
33. Innis M.A., Myambo K.B., Gelfand D.H., Brow M.A.D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988. V. 85. P. 9436–9440.
34. Laemmli U.K. // *Nature.* 1979. V. 227. P. 680–685.
35. Kramer S.M., Carwer M.E. // *J. Immunol. Meth.* 1986. V. 93. P. 201.
36. Кузнецова Н.П., Мишаева Р.Н., Кольцова С.В., Гудкин Л.Р., Страгович Л.М., Большакова Е.Г. // *Биоорганическая химия.* 1993. Т. 19. С. 871–879.

## Mutants of Human Tumor Necrosis Factor: Preparation and Properties

L. N. Shingarova\*, L. N. Sagaidak\*, R. L. Turetskaya\*\*, S. A. Nedospasov\*\*,  
D. S. Esipov\*, and V. G. Korobko\*<sup>1</sup>

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

\*\* *Engelhardt Institute of Molecular Biology, ul. Vavilova 32, Moscow, GSP-1, 117984 Russia,  
and the National Cancer Institute, Frederick, MD, USA*

**Abstract**—Using polymerase chain reaction, a number of mutant genes encoding human tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) with amino acid substitutions and a deletion were obtained. The mutant proteins (muteins) contained point mutations R32H, A33S, F144L, I118M, and I118A; double mutation R32H–F144L; and deletion of four amino acid residues 67–70. The mutant genes were expressed in *E. coli* under the control of constitutive promoters. A simple purification method for the muteins was developed and their physicochemical properties were studied. All the muteins obtained, except F144L and I118A, were shown by CD and cross-linking to form a spatial structure similar to that of the native TNF- $\alpha$ . The collection of muteins was characterized by their biological activity. Mutants R32H and A33S exerted a decreased cytotoxicity against murine fibroblast cell line L929, whereas point mutant F144L and double mutant R32H–F144L were essentially inactive.

*Key words:* human tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ), mutants, polymerase chain reaction, expression in *E. coli*.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed.