



УДК 547.963.32.057:577.213.3

РЕКОМБИНАНТНЫЕ БЕЛКИ, СОДЕРЖАЩИЕ АМИНОКИСЛОТНЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ДВУХ ЦЕПЕЙ ЭКТАТОМИНА

© 1997 г. Р. С. Есипов[#], А. И. Гуревич, А. Л. Каюшин, М. Д. Коростелева, А. И. Мирошников, Л. В. Шевченко, К. А. Плужников, Е. В. Гришин

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

Поступила в редакцию 21.05.97 г. Принята к печати 22.08.97 г.

Искусственные гены цепей А и В эктатомина – токсина муравья *Ectatomma tuberculatum* – получены химико-ферментативным синтезом и клонированы в новых плазмидных векторах. В результате сконструированы экспрессионные плазмиды с генами гибридных белков, содержащих человеческий интерлейкин-3 (hIL3) или его N-концевой 63-звенный фрагмент, а также цепи А и В эктатомина, присоединенные через участок с сайтом расщепления специфической протеиназы – энтерокиназы (гибридные белки IL3ETOXA, IL3ETOXB, ILETOXA, ILETOXB). Получены штаммы-продуценты *Escherichia coli*, дающие высокий выход белков IL3ETOXA и IL3ETOXB в тельцах включения.

Ключевые слова: эктатомин, рекомбинантные белки, химико-ферментативный синтез генов.

В 1994 г. из яда муравья *Ectatomma tuberculatum* нами был выделен эктатомин – новый низкомолекулярный белок (M 7928 Да), отвечающий за основную токсический эффект яда для млекопитающих и насекомых. С помощью методов белковой химии и двумерной ЯМР-спектроскопии установлена его полная аминокислотная последовательность и пространственная структура. Показано, что эктатомин обладает уникальной для низкомолекулярных белков структурой. Он состоит из двух высокомолекулярных полипептидных цепей, соединенных одной дисульфидной связью. Подвижность каждой цепи ограничена одной внутрицепочечной дисульфидной связью [1, 2].

GVIPKKIWETVCSPTVERWAKKCSGDIATYIKRECGKL
WSTIVKLTICPTLKSMAKKCEGSIATMIKKKCDK

В водном растворе молекула эктатомина образует четыре плотноупакованные амфифильные альфа-спирали. Токсин формирует потенциалзависимые малоселективные ионные каналы в клеточных и искусственных мембранах [3]. Дальнейшее детальное исследование молекулярного механизма порообразования и транспорта через клеточную мембрану под воздействием токсина требует использования значительных количеств эктатомина, выделение которого из природного

источника затруднено. В связи с этим мы предприняли разработку метода получения рекомбинантного эктатомина и ряда его структурных аналогов путем микробиологического синтеза.

С этой целью мы осуществили химико-ферментативный синтез генов цепей А и В эктатомина (*toxA* и *toxB*) из олигодезоксинуклеотидов TA1–TA8 и TB1–TB8 соответственно, как это изображено на схеме. Для препаративного получения этих генов и введения различных сайтов рестриктаз в концевые последовательности проводили ПЦР с парами праймеров TA1, KTA5 и TB1, KTB5. Полученные продукты ПЦР после обработки рестриктазами *Esp31* и *KpnI* клонировали в экспрессионных плаزمидах. В качестве векторов использовали плазмиды p3ptc12il3 и p1ptc12il3 [4] с геном интерлейкина-3, который служил белком-носителем в гибридах с цепями А и В эктатомина. В использованных нами векторах содержатся тандемы промоторов P8 фага fd, Ptaс и Pt7 фага T7 (p3p) или P1 и P2 гена *rrnB E. coli* и Pt7 фага T7 (p1p), а также новый энхансер трансляции (te). Эти регуляторные элементы, как правило, обеспечивают высокий уровень экспрессии клонированных генов [4, 5]. Чтобы повысить долю целевого полипептида в гибридном белке, мы использовали также в качестве белка-носителя N-концевой 63-звенный фрагмент человеческого интерлейкина-3. Ранее такой подход обеспечил высокий уровень продукции гибридного белка IL3, включающего тример окситоциноиллизина [6, 7].

Поскольку аминокислотные последовательности цепей А и В эктатомина не позволяют применять малоспецифичные протеиназы для

Сокращения: BSA – бычий сывороточный альбумин; HRP – пероксидаза из хрена; IPTG – изопропил-β-D-тиогалактозид; IgG-HRP – свиной антикроличий IgG, конъюгированный с HRP; hIL3 – человеческий интерлейкин-3; NC – нитроцеллюлозная мембрана.

[#] Автор для переписки.

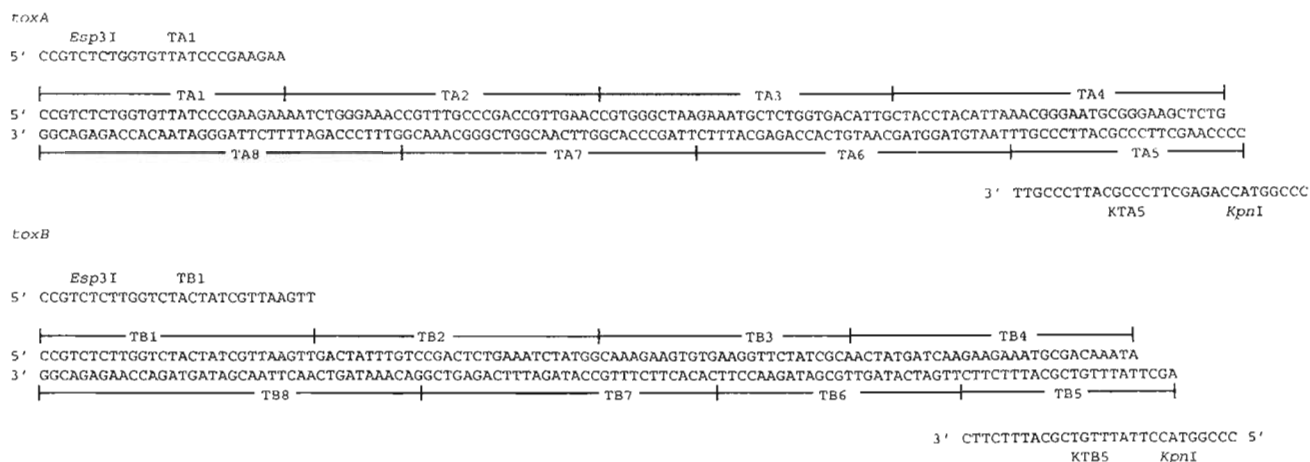


Схема сборки искусственных генов *toxA* и *toxB* из олигонуклеотидов ТА1–ТА8 и ТВ1–ТВ8 соответственно; приведены также праймеры, использованные для ПЦР, и указаны сайты узнавания рестриктаз.

отщепления этих полипептидов от рекомбинантного белка, мы модифицировали векторные плазмиды, введя в них участки, кодирующие сайт узнавания специфической протеиназы – энтерокиназы, DDDDK. С этой целью в векторные плазмиды были встроены (по сайтам *HindIII/KpnI*) синтетические адаптеры EL-A и EL-B, в которых имеются также сайты узнавания рестриктазы

Esp3I, позволяющие присоединять синтетические гены так, чтобы N-концевые кодоны целевых полипептидов были связаны непосредственно с кодоном лизина в сайте энтерокиназы (см. рис. 1).

При вставке адаптеров EL-A и EL-B (рис. 1а) в плазмиды р3pte12il3gh12 (рrpte12il3gh12) (рис. 1б) по сайтам узнавания рестриктаз *HindIII* и *KpnI* одновременно происходила делеция последователь-

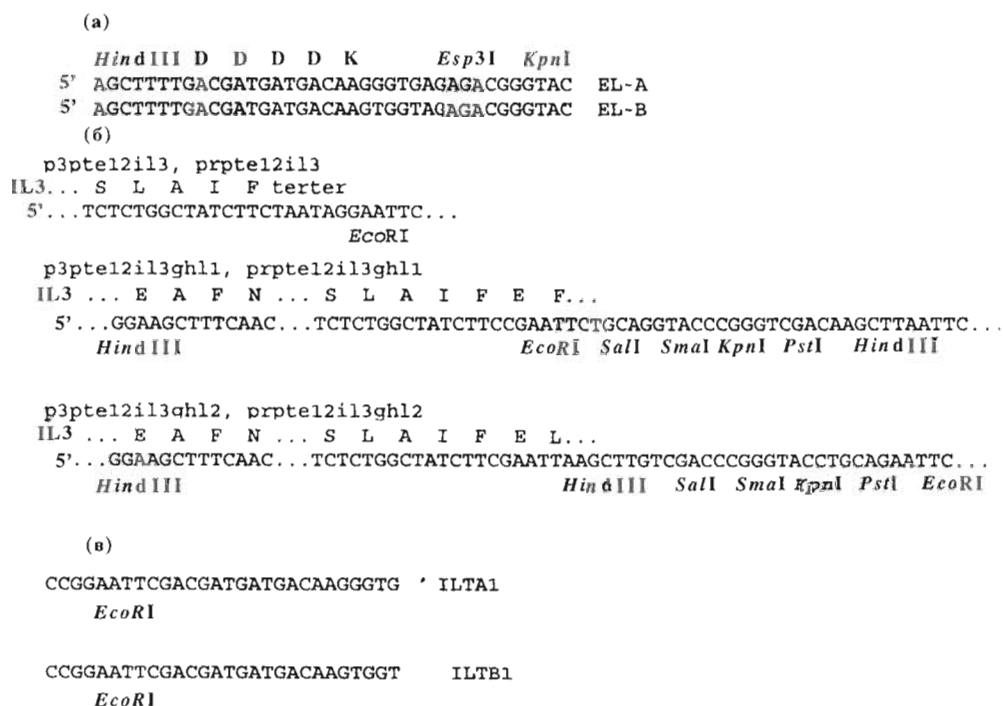


Рис. 1. (а) – структуры кодирующих цепей адаптеров EL-A, EL-B; указаны кодоны сайта узнавания энтерокиназы, а также сайты и концевые полусайты узнавания рестриктаз; (б) – структуры 3'-концевых последовательностей гена интерлейкина-3 в плаزمиде р3pte12il3 (прrpte12il3), р3pte12il3gh11 (прrpte12il3gh11) и р3pte12il3gh12 (прrpte12il3gh12); указаны кодоны интерлейкина-3 и сайты узнавания рестриктаз; (в) – структуры праймеров ILTA1, ILTB1 для амплификации путем ПЦР генов *toxA* и *toxB*.

ности, кодирующей С-концевой участок интерлейкина-3. В результате клонирования генов *toxA* и *toxB* в полученных векторах с адаптерами EL-A и EL-B удалось выделить клоны, содержащие плазмиды *piletoxA* и *piletoxB* с желаемой структурой генов рекомбинантных белков IL3ETOXA и IL3ETOXB. Однако в этих случаях нам не удалось получить продуценты с достаточно высоким уровнем экспрессии генов. Следует отметить, что при пересевах полученных штаммов продуцентов наблюдалось быстрое снижение уровня экспрессии – по-видимому, вследствие выброса плазмид или их рекомбинационных перестроек. Мы полагаем, что наблюдаемые явления связаны с токсичностью рекомбинантных белков для клеток *E. coli*, если оба белка не полностью агрегируют в тельца включения.

Значительно более эффективным оказалось использование в качестве вектора плазмид *p3pte12il3gh11* (*prpte12il3gh11*) (рис. 1б), производных плазмид *p3pte12il3* (*prpte12il3*), в которых мы изменили структуру гена интерлейкина-3, исключив терминирующие кодоны и введя полилинкер, позволяющий присоединять к С-концу интерлейкина-3 новые аминокислотные последовательности. Гены *toxA* и *toxB* вместе с участком, кодирующим сайт энтерокиназы, были амплифицированы путем ПЦР с праймерами ILTA1 и ILTB1 (рис. 1в) на плаزمидах *piletoxA* и *piletoxB* и клонированы в векторах *p3pte12il3gh11* (*prpte12il3gh11*) по сайтам *EcoRI* и *KpnI*. В результате были получены экспрессионные плазмиды *pil3etoxA* и *pil3etoxB*, которые обеспечили высокий уровень продукции рекомбинантных белков IL3ETOX-A и IL3ETOX-B, как это следует из электрофореграммы лизатов клеток продуцентов и данных иммуноблотинга (рис. 2). Штаммы полученных продуцентов оказались устойчивыми при многократных пассажах.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали трис, глицин, акрил-амид, N,N'-метиленабисакриламид, персульфат аммония (Merck); N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (Reanal); агарозу, АТФ, dNTP, бромистый этидий, BSA (5-я фракция), 4-хлорнафтол-1, твин-20 (Sigma); мочевины, ос. ч. ("Реахим"); агар, триптон, дрожжевой экстракт (Difco); мембраны NC (Schleicher-Schüll); [γ - 32 P]АТФ, [α - 32 P]dАТФ (2000 Ки/ммоль, Обнинск); Т4-ДНК-лигазу (КФ 6.5.1.1), Т4-полинуклеотидкиназу (КФ 2.7.1.78), *Taq*-ДНК-полимеразу и модифицированную Т7-ДНК-полимеразу (КФ 2.7.7.7); рестрикционные эндонуклеазы (КФ 32.1.23.x) *Bsp*119I, *EcoRI*, *PstI*, *XbaI* (Fermentas, Вильнюс); буферные растворы: TBS – 10 мМ трис-НСl (рН 7.4), 150 мМ NaCl; TGB – 25 мМ трис-НСl (рН 8.3), 192 мМ глицин.

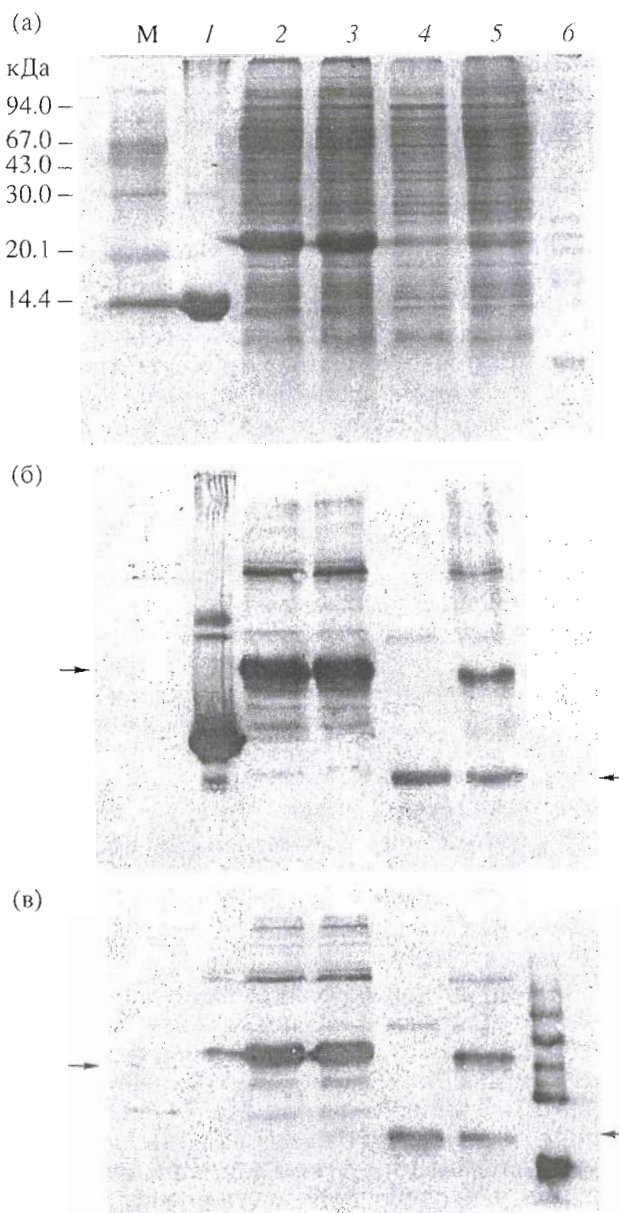


Рис. 2. Электрофореграмма тотальных лизатов клеток *E. coli* – продуцентов рекомбинантных белков: hIL3 (1), IL3ETOXA (2), IL3ETOXB (3), ILETOXA (4), ILETOXB (5); эктатомина (6); М – стандарты молекулярных масс. Анализ гелей с помощью кумасси R-250 (а) и иммуноблотинга с антителами к hIL3 (б) и эктатомину (в). Стрелками отмечено положение полос мономерных целевых продуктов. Во всех колонках наблюдаются также полосы димеров (олигомеров), особенно в случае эктатомина (б).

Защищенные олигонуклеотиды синтезировали традиционным фосфоамидитным методом на синтезаторе ASM-102U (БИОСАН, Новосибирск) и после деблокирования выделяли по описанной методике [8].

Условия экспериментов по получению рекомбинантных плазмид, трансформации компетентных клеток, клонированию, а также гель-элект-

рофорезу и выделению ДНК из гелей приведены в работе [9].

Штаммы продуцентов рекомбинантных белков выращивали в питательной среде YT (0.8% триптон, 0.5% дрожжевой экстракт, 0.5% NaCl) при 37°C до значения оптического поглощения культуры A_{595} 0.5, затем индуцировали IPTG и выращивали еще 6 ч.

Для анализа белков 1 мл бактериальной культуры центрифугировали, растворяли в лизирующем буфере [10], нагревали 5 мин при 100°C и белки разделяли в 15% ПААГ в присутствии 0.1% SDS [10]. Из приготовленных трех идентичных гелей после электрофореза один (а) прокрашивали кумасси R-250, два других подвергали иммуноблотингу с антителами к hIL3 (б) и к эктатомину (в) (см. рис. 2).

Иммуноблотинг осуществляли по методу [11]. Электроперенос белков на мембрану NC проводили в TGB с 20% метанола в течение 12 ч. NC затем блокировали с помощью 4% BSA, инкубировали последовательно с кроличьей антисывороткой против hIL3 и с IgG-HRP по 1 ч при 37°C. После каждой инкубации проводили отмывку в TBS с 0.1% твин-20. В качестве хромогенного субстрата для HRP использовали 4-хлорнафтол-1 (6 мг 4-хлорнафтола-1 растворяли в 2 мл метанола, добавляли 8 мл TBS и 6 мкл 30% H_2O_2); инкубацию с субстратом при 0°C проводили до проявления полос, затем NC отмывали водой и высушивали. Иммуноблотинг с аффинно очищенными антителами против эктатомина осуществляли по аналогичной схеме.

Схема иммунизации кроликов включала в себя двукратную иммунизацию с полным адъювантом Фрейнда (по 150 мкг белка на каждую инъекцию) с интервалом 14 сут и однократную – с неполным адъювантом Фрейнда с интервалом 14 сут. Через 7 сут после инъекции 150 мкг белка (hIL3 или эктатомина) в физиологическом растворе проводили контрольный отбор крови из ушной вены и те-

стировали против антигена с помощью твердофазного ИФА и в дот-системе.

Использованы штаммы *E. coli*: XL1-Blue [*recA1*, *lac*⁻, *endA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1* (F', *proA*⁺*B*⁺, *lacI*^q, *lacZDM15*, Tn10)]; BL21(DE3) [*F*⁻, *hsdSgal*, *ompT*, *r*_б⁻, *m*_б⁻].

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 97-04-48036).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Плужников К.А., Нольде Д.Е., Тертышников С.М., Суханов С.В., Соболев А.Г., Торгов М.Ю., Филиппов А.К., Арсеньев А.С., Гришин Е.В. // Биоорган. химия. 1994. Т. 20. С. 857–871.
2. Arseniev A.S., Pluzhnikov K.A., Nolde D.E., Sobol A.G., Torgov M.Yu., Sukhanov S.V., Grishin E.V. // FEBS Lett. 1994. V. 347. P. 112–116.
3. Nolde D.E., Sobol A.G., Pluzhnikov K.A., Grishin E.V., Arseniev A.S. // J. Bio. NMR. 1995. V. 5. P. 1–13.
4. Гуревич А.И., Есипов Р.С., Качалина Т.А., Каюшин А.Л., Коростелева М.Д. // Биоорган. химия. 1997. Т. 23. С. 888–894.
5. Гуревич А.И., Есипов Р.С., Качалина Т.А., Каюшин А.Л. // Биоорган. химия. 1995. Т. 21. С. 282–288.
6. Гуревич А.И., Качалина Т.А., Каюшин А.Л., Коростелева М.Д., Мирошников А.И. // Биоорган. химия. 1993. Т. 19. С. 629–632.
7. Гуревич А.И., Качалина Т.А., Каюшин А.Л., Коростелева М.Д., Мальцев К.В., Миргородская О.А., Мирошников А.И. // Биоорган. химия. 1996. Т. 22. С. 14–19.
8. Гуревич А.И., Качалина Т.А., Каюшин А.Л., Коростелева М.Д., Мирошников А.И. // Биоорган. химия. 1993. Т. 19. С. 629–632.
9. Гуревич А.И., Некрасова О.В. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. С. 149–152.
10. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.
11. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. P. 4350–4354.

Recombinant Proteins Containing Amino Acid Sequences of Two Ectatomin Chains

R. S. Esipov, A. I. Gurevich, A. L. Kayushin, M. D. Korosteleva, A. I. Miroshnikov, L. V. Shevchenko, K. A. Pluzhnikov, and E. V. Grishin

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

Artificial genes for chains A and B of ectatomin, an *Ectatomma tuberculatum* ant toxin, were obtained by chemical and enzymic synthesis and cloned into new plasmid vectors. Expression plasmids with the genes of hybrid proteins were constructed containing human interleukin-3 or its terminal 63-mer fragment as well as chains A and B of ectatomin, which are linked via a region containing the cleavage site of specific protease, enterokinase (hybrid proteins IL3ETOXA, IL3ETOXB, ILETOXA, and ILETOXB). *Escherichia coli* producer strains providing a high yield of IL3ETOXA and IL3ETOXB proteins as inclusion bodies were obtained.

Key words: ectatomin; recombinant proteins; genes, chemical and enzymic synthesis