



УДК 577(214+217)

**ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА ГИБРИДНОГО БЕЛКА, СОДЕРЖАЩЕГО  
АМИНОКИСЛОТНУЮ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ [Val<sup>8</sup>]  
КАЛЬЦИТОНИНА, В КЛЕТКАХ ДРОЖЖЕЙ****Батчикова Н. В., Эльдаров М. А., Карпычев И. В.,  
Рубцов П. М.***Институт молекулярной биологии Академии наук СССР, Москва*

Кальцитонин представляет собой пептидный гормон, состоящий из 32 аминокислотных остатков и содержащий на С-конце амидную группу [1]. У человека основной функцией этого гормона является защита костного скелета в периоды гиперкальциемических стрессов, таких, как рост, беременность, лактация [2]. Кроме того, он является нейропептидом [3]. Кальцитонин применяется в медицине для лечения ряда заболеваний, сопровождающихся явлениями системного или местного остеопороза, а также при гиперкальциемии [4].

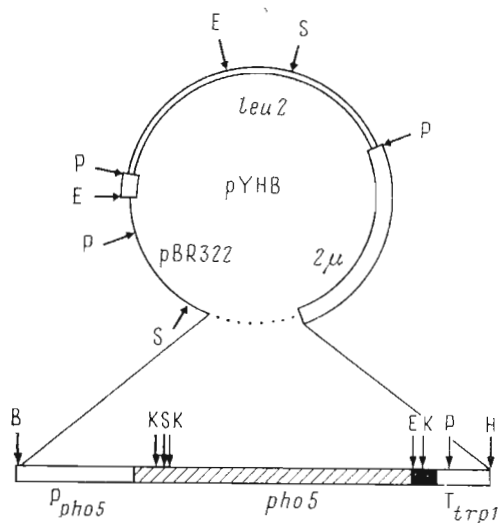
В связи с этим актуальной задачей является получение методами генной инженерии препарата кальцитонина человека (НСТ), пригодного для медицинских целей. Ранее Ю. Б. Головой и др. [5] химико-ферментативным методом был синтезирован ген *hct* кальцитонина Met-[Val<sup>8</sup>]НСТ, содержащий дополнительный кодон АТГ, П. М. Рубцовым и др. [6] продемонстрирована его экспрессия в *E. coli* в составе гибридного белка β-галактозидаза-Met-[Val<sup>8</sup>]НСТ. В настоящее время проводятся работы по созданию штаммов дрожжей, способных продуцировать и секретировать человеческий кальцитонин в биологически активной форме. В качестве первого шага к созданию таких штаммов мы исследовали возможность синтеза и секреции кальцитонина в дрожжевой клетке в составе гибридных белков. В качестве белка-носителя нами была выбрана репрессибельная кислая фосфатаза дрожжей (Р60), кодируемая геном *pho5* [7]. При росте дрожжей на средах с низким содержанием неорганического фосфата продукт гена *pho5* составляет до 5% суммарного белка дрожжей. До 30% образуемой кислой фосфатазы Р60 секретируется в культуральную среду [8]. Таким образом, использование регуляторных и кодирующих областей гена *pho5* позволяет создавать системы с эффективным регулируемым синтезом и секрецией чужеродного белка.

Для конструирования рекомбинантной плазмиды, обеспечивающей синтез гибридного белка Р60-Met-[Val<sup>8</sup>]НСТ, мы использовали фрагменты ДНК, содержащие различные области гена *pho5*, субклонированные из плазмиды pBR322/PHO3.5/HIS3 [9], химически синтезированный ген *hct* с дополнительным кодоном АТГ на N-конце, клоноированный в плазмиде РСТ30 [6], и плазмиду YRp7, содержащую ген *trp1* [10]. Подробно конструирование плазмиды будет описано позже. В состав гибридного гена входит промоторная область и кодирующая последовательность (до 371 кодона) гена *pho5*, ген, кодирующий пептид Met-[Val<sup>8</sup>]НСТ, и терминатор транскрипции гена *trp1* дрожжей. Гибридный ген был клоноирован в бифункциональном векторе дрожжей YEp13 [11]. Физико-генетическая карта полученной плазмиды представлена на схеме.

Для исследования экспрессии гена *hct* в дрожжах полученной плазмидой рУНВ трансформировали клетки реципиентного штамма *S. cerevisiae* АН22 (*MATa leu2-3, 112 his4-519 can1 cir<sup>+</sup>*) [9], обработанные

Сокращения: НСТ – кальцитонин человека, *hct* – ген кальцитонина человека, РИА – радиоиммунологический анализ.

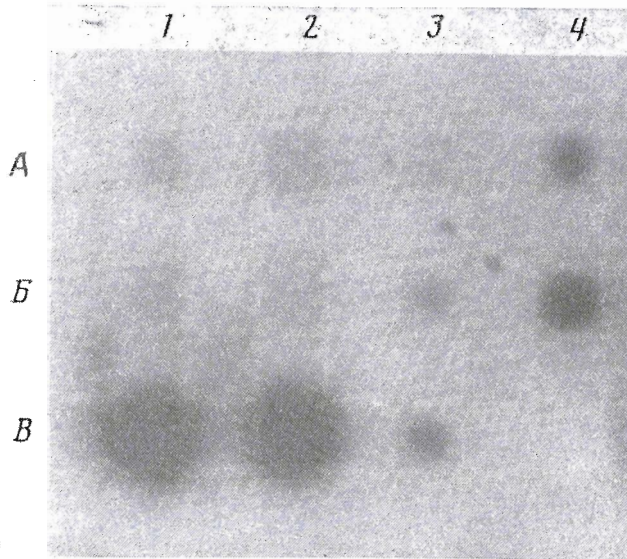
Схема строения и рестрикционная карта дрожжевой плазмиды рУНВ, направляющей синтез гибридного белка Р60-Met-[Val<sup>8</sup>]НСТ. Стрелками обозначены сайты рестриктаз: E — EcoRI, B — BamHI, P — PstI, K — KpnI, S — SalI, H — HindIII. Гибридный ген (на схеме выделен) состоит из промоторной области P<sub>pho5</sub>, части структурного гена *pho5* кислой фосфатазы P60 (заштриховано), синтетического гена, кодирующего пептид Met-[Val<sup>8</sup>]НСТ (закрашено) и терминаторной области гена *trpI*. Отмечены участки ДНК плазмиды рBR322, двукронной плазмиды дрожжей и гена *leu2* из *S. cerevisiae*



солями лития [12]. Отдельные клоны трансформантов выращивали в условиях дерепрессии промотора *pho5* на синтетической среде с низким содержанием неорганического фосфата [13]. Степень дерепрессии контролировали путем измерения фосфатазной активности [14] в клетках дрожжей штамма АН22, трансформированных полученной нами ранее плазмидой YEp13/PHO3,5, содержащей клонированный ген *pho5*. При этих условиях уровень синтеза Р60 превышает более чем в 50 раз уровень синтеза фермента этим же штаммом в богатой фосфором среде и составляет 0,12 ед. акт./мл суспензии клеток при  $A_{600}=1$ .

Синтез гибридного белка Р60-Met-[Val<sup>8</sup>]НСТ тестировали с помощью предложенного нами варианта РИА, включающего иммобилизацию белковых экстрактов на нитроцеллюлозных фильтрах. В качестве негативного контроля использовали клетки штамма АН22, трансформированного векторной плазмидой YEp13 и плазмидой YEp13/PHO3,5, которые выращивали в аналогичных условиях. Клетки дрожжей лизировали по методу Лайонса и Нельсона [15], используя в качестве лизирующего раствора 0,2 н. NaOH, 0,5% 2-меркаптоэтанол, 0,2% SDS. Полученные после осаждения трихлоруксусной кислотой осадки растворяли в 0,1 М карбонатном буфере, рН 9,5, содержащем 0,1% SDS, и аликвоты растворов наносили на нитроцеллюлозный фильтр. Параллельно на фильтр наносили различные количества кальцитонина человека (Calbiochem, США) от 0,001 до 0,1 мкг. Фильтр обрабатывали раствором альбумина из сыворотки быка для насыщения оставшихся мест связывания нитроцеллюлозы с белком. Далее фильтр инкубировали с поликлональными антителами к кальцитонину человека, полученными от проф. Мак-Интайра (Королевская медицинская школа, Лондон), и после отмывки — с меченым <sup>125</sup>I белком А золотистого стафилококка. Как видно из рисунка, антигенные детерминанты кальцитонина человека обнаруживаются в экстрактах штамма АН22, трансформированного плазмидой рУНВ, и в контрольных препаратах кальцитонина. В экстрактах контрольных штаммов они отсутствуют. Этот факт свидетельствует о том, что плазмида рУНВ направляет синтез белка, содержащего аминокислотную последовательность кальцитонина.

Аналогичные результаты были получены при анализе экспрессии кальцитонина в дрожжах с помощью стандартного РИА на кальцитонин человека. Клеточные белки обрабатывали бромцианом, чтобы выпептизировать дезамидо-[Val<sup>8</sup>]НСТ из гибридного белка. В контрольных штаммах кальцитонин не обнаружен. Содержание иммунореактивного кальцитонина в штамме АН22/рУНВ, выращенного в условиях дерепрессии промотора *pho5*, составило, по данным РИА, 42 мкг/л клеточной суспензии при  $A_{600}=1$ , что соответствует содержанию в 1 л дрожжевой культуры 640 мкг



Тестирование кальцитонина в составе гибридного белка путем иммобилизации белковых экстрактов на нитроцеллюлозном фильтре с последующей обработкой фильтра антителами к кальцитонину человека и меченным  $^{125}\text{I}$  белком А золотистого стафилококка. 1 и 2 – лизаты клеток независимых трансформантов штамма АН22, содержащих плазмиды: А – УЕр13, Б – УЕр13/РНО3.5, В – рУНВ. В качестве контроля нанесены кальцитонин человека (3А – 0,001, 3Б – 0,005, 3В – 0,01, 4А – 0,05, 4В – 0,1 мкг) и альбумин из сыворотки быка (4Б – 1 мкг)

гибридного белка. Фосфатазная активность при экспрессии гибридного гена не обнаруживалась.

Мы полагали, что продуцируемый штаммом АН22/рУНВ гибридный белок, содержащий протяженный N-концевой участок кислой фосфатазы, будет экспортироваться в культуральную среду. Однако ни один из описанных выше методов определения кальцитонина не позволил обнаружить иммунореактивные полипептиды в культуральной среде указанного штамма. Таким образом, несмотря на присутствие сигнальной последовательности секреции кислой фосфатазы, способность гибридного белка транспортироваться наружу из клетки оказалась нарушенной. Причиной этого может быть либо делеция 96 С-концевых аминокислотных остатков кислой фосфатазы, либо замена их на аминокислотную последовательность кальцитонина. Возможно, эти же изменения приводят и к потере гибридным белком фосфатазной активности.

Мы предполагаем провести дальнейшие исследования для выяснения роли С-концевого участка молекулы кислой фосфатазы Р60 в ферментативной функции и в функции транспорта кислой фосфатазы.

Авторы выражают благодарность д-ру биол. наук К. Г. Скрыбину за участие в обсуждении результатов и поддержку настоящей работы.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Neher R., Riniker B., Rittel W., Zuber H. // *Helv. chim. acta.* 1968. V. 51. № 7. P. 1900–1905.
2. Talmage R. V., Grubb S. A., Norimatsu H., Vanderwiell C. J. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1980. V. 77. № 1. P. 609–619.
3. Cooper C. W., Twery M. J., Lewis M. H., Mailman R. B. // *Psychopharm. bull.* 1984. V. 20. № 3. P. 451–455.
4. Альгушлалер Р. А., Корогаев Г. К. // *Хим.-фарм. журн.* 1985. № 5. С. 627–635.
5. Голова Ю. Б., Чернов Б. К., Баев А. А. // *Докл. АН СССР.* 1984. Т. 277. № 5. С. 1258–1260.
6. Рубцов П. М., Батчинова П. В., Голова Ю. Б., Свердловска П. С., Чупеева В. В., Чернов Б. К., Скрыбин К. Г., Баев А. А. // *Докл. АН СССР.* 1985. Т. 283. № 6. С. 1507–1509.

7. Bajwa W., Meyhack B., Rudolph H., Schweingruber A.-M., Hinnen A. // Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. № 20. P. 7724-7739.
8. Hugenuer-Tsapis R., Hinnen A. // Mol. cell. biol. 1984. V. 4. № 12. P. 2668-2675.
9. Meyhack A., Bajwa W., Rudolph H., Hinnen A. // EMBO J. 1982. V. 1. № 6. P. 675-680.
10. Tschumper G., Carbon J. // Gene. 1979. V. 8. № 1. P. 157-166.
11. Broach J. R., Strathern J. N., Hicks J. B. // Gene. 1979. V. 8. № 1. P. 121-133.
12. Ito H., Fukuda Y., Murata K. // J. Bacteriol. 1983. V. 153. № 1. P. 163-168.
13. Захаров И. А., Кожин С. А., Кожина Т. П., Федорова Л. В. Сборник методик по генетике дрожжей-сахаромыцетов. Л.: Наука, 1984. С. 126.
14. Tak-e A., Ueda Y., Kakimoto S.-I., Oshima Y. // J. Bacteriol. 1973. V. 113. № 2. P. 727-738.
15. Lyons S., Nelson X. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. № 23. P. 7426-7430.

Поступило в редакцию  
26.1.1987

## YEAST EXPRESSION OF A GENE CODING FOR HYBRID PROTEIN WITH THE [Val<sup>8</sup>]CALCITONIN AMINO ACID SEQUENCE

BATCHIKOVA N. V., ELDAROV M. A., KARPYCHEV I. V., RUBTSOV P. M.

*Institute of Molecular Biology,  
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

A recombinant plasmid has been constructed, which directs the synthesis of a hybrid protein, yeast repressible acid phosphatase[Val<sup>8</sup>]calcitonin, in yeast. The plasmid contains a truncated gene (*pho5*) acid phosphatase lacking 96 C-terminal amino acids replaced by the synthetic gene for human calcitonin and sequences required for the plasmid propagation in transformed yeast cells. A modified RIA method using immobilisation of protein extracts on solid supports was developed to monitor the expression of the hybrid protein. By use of this method, as well as by standard RIA of CNBr-cleaved protein extracts, synthesis of a calcitonin-related protein was detected in extracts of transformed strains grown under conditions inducing *pho5* promoter.