



УДК 577.175.722'14 : 152.34.042

ВЛИЯНИЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ ИНГИБИТОРОВ ПРОТЕИНАЗ НА УРОВЕНЬ ПРОДУКЦИИ РЕКОМБИНАНТНОГО ПРОИНСУЛИНА ЧЕЛОВЕКА, СЕКРЕТИРУЕМОГО ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫМ ШТАММОМ *BACILLUS SUBTILIS*

*Парфенова Е. В., Попов Д. Г., Новиков А. А.,
Стеркин В. Э., Стронгин А. Я., Аксентенко А. Ю.*,
Коренченко О. В.*, Фетисов В. И.*, Мартынов И. В.*,
Соколов В. В.**

*Всероссийский научно-исследовательский институт генетики
и селекции промышленных микроорганизмов, Москва;*

** Институт физиологически активных веществ Академии наук
СССР, Черноголовка Московской обл.*

Уровень экспрессии чужеродных генов в микроорганизмах во многом определяется чувствительностью белков-продуктов к протеолизу, так же как и уровнем протеиназ реципиентных штаммов. Одной из причин низкого выхода чужеродных белков, секретируемых рекомбинантными штаммами бактерий, является сравнительно высокая продукция ими внеклеточных протеиназ — сериновой и металлопротеиназ [1, 2]. Использование в качестве реципиентов чужеродных генов мутантов бактерий по протеиназам не всегда дает полностью положительные результаты из-за множественности протеиназ и компенсаторного увеличения уровня их синтеза. Одним из возможных подходов к решению этой задачи является применение в ходе культивирования рекомбинантных штаммов бактерий ингибиторов протеиназ. Однако большинство известных ингибиторов — фенилметилсульфонилфторид, диизопропилфторфосфат, *n*-бензидин и т. д. — токсичны для клеток микроорганизмов, что существенно ограничивает их применение. С целью поиска подходящих ингибиторов сериновых протеиназ нами синтезированы *O,O*-диэтил-1-(*N*- α -гидрогексафторизобутирил)амино-1-метилпропилфосфонат (I) и *O,O*-динзобутил-1-[2-(этоксикарбонил)аминоперфторпроп-2-ил]-1-метилпропилфосфонат (II), которые, эффективно блокируя активность фермента, не оказывают тем не менее токсического действия на клетки штамма-продуцента и не подавляют рост культуры микроорганизмов (таблица).

Выбранные ингибиторы были проверены на способность блокировать протеолиз свиного инсулина. Для этого штамм-реципиент *Bacillus subtilis* AJ73 выращивали 8 ч на L-бульоне, затем клетки убирали центрифугированием и 485 мкл культуральной жидкости смешивали с 5 мкл 0,1 М раствора ингибитора (I) или (II) в этаноле и смесь инкубировали

Рост штамма *B. subtilis* AJ73 (р.BINS 1.0) — продуцента рекомбинантного проинсулина человека * в присутствии ингибиторов протеиназ (I) и (II) **

Время ферментации, ч	Контроль	(I)	(II)
8	2,0	1,5	1,6
4	2,6	2,5	2,8
12	3,2	3,0	3,2

* Статья А. А. Новикова и др. будет опубликована в ближайших номерах журнала «Биотехнология».

** [I] = 1 мМ, 37° С. L-бульон; приведено оптическое поглощение при 540 нм, контроль — ферментация без ингибитора.

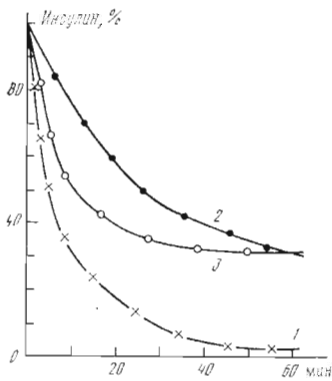


Рис. 1

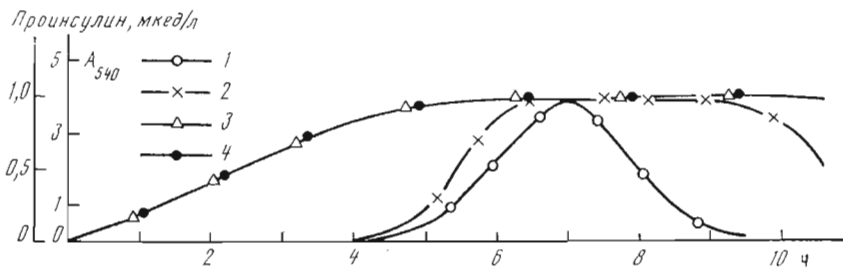


Рис. 2

30 мин при комнатной температуре. Далее в смесь вносили 10 мкл 10 нг/мл раствора инсулина (Sigma, США) и инкубировали при 37° С. Через 10—60 мин содержание инсулина определяли с помощью радиоиммунологического метода, используя набор «Рио-ИНС-ПГ-1251» (ИБХ АН БССР, Минск).

Добавление ингибиторов существенно замедляет скорость деградации инсулина в культуральной среде за счет подавления активности сериновых протеиназ культуральной жидкости (рис. 1).

Ингибитор (I) был эффективно использован для повышения стабильности рекомбинантного человеческого проинсулина, секретируемого штаммом *B. subtilis* AJ73 (pBINS1.0). Для этого в L-бульон вносили ингибитор до конечной концентрации 1 мМ и проводили культивирование в течение 12 ч при 37° С (рис. 2). Концентрацию проинсулина определяли радиоиммунологическим методом, как указано выше, выражая ее в относительных единицах. В контроле концентрация проинсулина в среде достигает максимума на 7-й ч роста культуры, после чего начинает резко снижаться. Это затрудняет проведение ферментации и выделение конечного продукта. Введение ингибитора в состав среды не замедляет рост штамма, но заметно снижает деградацию проинсулина, концентрация которого в среде, достигая максимума на 7-й ч роста культуры, остается неизменной в течение 4 ч.

Таким образом, показано, что синтетические ингибиторы сериновых протеиназ, нетоксичные для микроорганизмов, могут быть эффективно использованы для повышения стабильности чувствительных к протеолизу рекомбинантных белков и, возможно, увеличения их продукции при культивировании генно-инженерных штаммов бактерий и ряда других бактерий.

Авторы благодарят Ю. В. Йомантаса (ВНИИгенетика) за предоставленный штамм-реципиент *B. subtilis* AJ73.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Priest F. G. // *Bacteriol. Rev.* 1977. V. 41. P. 711—753.
2. Lundstrom K., Palva I., Kaariainen L. // *Viral Res.* 1985. V. 2. P. 15—27.

Поступило в редакцию
9.1.1989

INFLUENCE OF SYNTHETIC INHIBITORS OF PROTEINASES
ON THE LEVEL OF PRODUCTION OF RECOMBINANT HUMAN
PROINSULIN SECRETED BY A GENETICALLY,
ENGINEERED CULTURE *BACILLUS SUBTILIS*

PARFENOVA E. V., POPOV D. G., NOVIKOV A. A., STERKIN V. E.,
STRONGIN A. Ya., AKSINENKO A. Yu.*, KORENCHENKO O. V.*,
FETISOV V. I.*, MARTYNOV I. V.*, SOKOLOV V. B.*

*Institute of Genetics and Selection of Microorganisms,
Moscow;*

*Institute of Physiologically Active Substances, Academy of Sciences
of the USSR, Chernogolovka, Moscow Region*

Influence of O,O-diethyl-1-(N- α -hydrohexafluoroisobutyryl)amino-1-methylpropylphosphonate and O,O-diisobutyl-1-[2-(ethoxycarbonyl)aminoperfluoroprop-2-yl]-1-methylpropylphosphonate on the level of production of human proinsulin secreted by a genetically engineered culture *Bacillus subtilis* AJ 73 (pBINS1.0.) has been studied. The above phosphonates, being non-toxic for microorganisms, reduced degradation of proinsulin by serine proteinases.