



УДК 577.218

© 1991 г.

Е. П. Саблина, А. Ю. Америк, В. Е. Антонюв

КЛОНИРОВАНИЕ И ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА ЗС-ПРОТЕИНАЗЫ ВИРУСА ПОЛИОМИЕЛИТА В КЛЕТКАХ *E. COLI*

Институт биоорганической химии им. М. М. Шмякина АН СССР, Москва

Исследована экспрессия гена ЗС-протеиназы вируса полиомиелита типа 1 (Mahoney) в клетках *E. coli* с использованием различных векторных систем. Показано, что ген ЗС эффективно экспрессируется при клонировании его в составе фрагментов *Hind*II — *Hind*II (основания 5240—6770) и *Hind*II — *Hind*III (основания 5240—6056) кДНК полиовируса в векторе рТТQ8, содержащем *lac*-промотор и ген *lac*I (репрессора). Среди вирусспецифических белков обнаружены продукты процессинга по аминокислотной паре Gln—Gly, прилегающей к N-концу ЗС-протеиназы, а также полипептиды, образующиеся при трансляции с альтернативного метионина, кодируемого основаниями 5516—5518 кДНК полиовируса. Процессинг по C-концевой аминокислотной паре ЗС Gln—Gly не обнаружен.

Образование стабильных белков вируса полиомиелита проходит через стадию процессинга единого полипептида-предшественника [1, 2]. Ограниченный протеолиз осуществляется двумя полиовирусными протеиназами — 2А и ЗС, расщепляющими соответственно пептидные связи Tug—Gly и Gln—Gly [3, 4]. При этом 9 из 12 установленных сайтов расщепления в полипротеине полиовируса являются специфичными для ЗС-протеиназы [2].

Хотя протеиназа ЗС играет главную роль в процессинге молекулы белка-предшественника, сведения об этом ферменте крайне ограничены. В настоящее время известна его полная аминокислотная последовательность (183 аминокислоты, мол. масса 19,7 кДа) и нуклеотидная последовательность кодирующего его гена [5]. Известно, что ЗС-протеиназа, являясь тиоловым ферментом [6—8] с уникальной специфичностью (расщепляет только пептидную связь Cln—Gly), способна аутокаталитически выщеплять себя из состава полиовирусного полипротеина [8—10]. Однако многие проблемы, связанные с ее функционированием, еще не решены. В частности, остается открытым вопрос о роли вторичных взаимодействий и пространственной структуры субстрата в проявлении специфичности фермента.

Детальное изучение ЗС-протеиназы тормозится отсутствием методов получения высокоочищенных препаратов фермента. В зараженных полиовирусом клетках ее синтезируется крайне мало. Попытки клонировать фрагмент кДНК вируса полиомиелита, содержащий ген ЗС, в экспрессионных векторах [8, 10] показали, что ген ЗС-протеиназы экспрессируется, однако активный фермент в препаративных количествах удалось получить лишь недавно авторам работы [11], которые клонировали фрагмент кДНК полиовируса типа 2 (Sabin) в векторе рAR2113, содержащем промотор бактериофага Т7.

В настоящей работе была исследована возможность клонирования и экспрессии гена ЗС-протеиназы вируса полиомиелита типа 1 (Mahoney) в различных экспрессионных векторах *E. coli*. Для этого фрагмент *Hind*II—*Hind*II (нуклеотиды 5240—6770 [5]) кДНК полиовируса, содержащий ген ЗС (рис. 1), был встроен по следующим сайтам: *Kpn*I вектора рЕК1, *Hpa*I вектора рPL-λ, *Ava*I вектора рТТQ8 (рис. 2а—в).

Сокращения: Ар — ампициллин, IPTG — изопропилтиогаалактозид, SDS — додецилсульфат натрия.

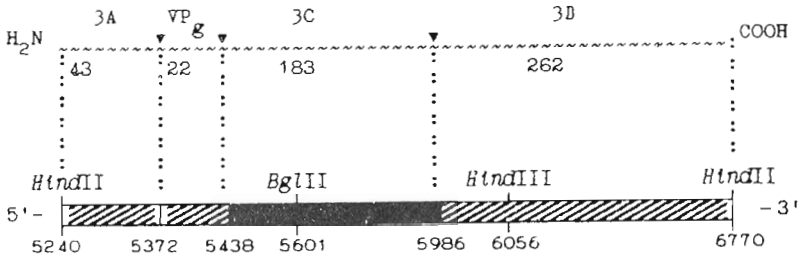


Рис. 1. *HindII/HindIII*-фрагмент кДНК полиовируса и кодируемый им полипептид, содержащий 43 а.о. белка 3А, 22 а.о. пептида VP<sub>g</sub>, 183 а.о. 3С-протеиназы и 262 а.о. 3D-полимеразы. Символ ▼ обозначает аминокислотную пару Gln—Gly, узнаваемую 3С-протеиназой вируса полиомиелита

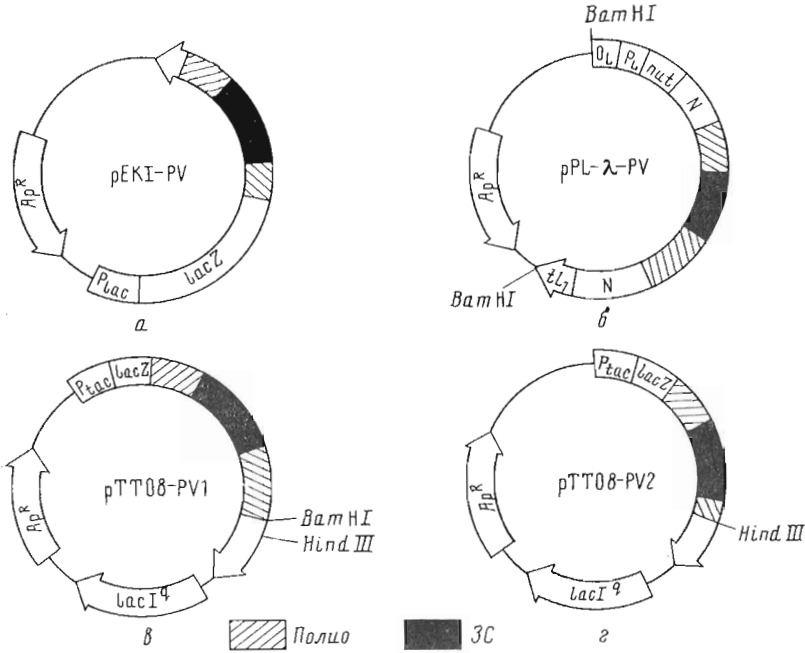


Рис. 2. Рекombинантные векторы pEKI-PV (а, [12]), pPL-λ-PV (б, [13]), pTTQ8-PV1 (в, [14]) и pTTQ8-PV2 (г, [14]). После рестрикции эндонуклеазами *KpnI* вектора pEKI и *AvaI* вектора pTTQ8 для затупления 3'-выступающих концов в первом случае и достраивания 3'-укороченных концов во втором соответствующие рестрикты были обработаны фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I [15]. Перед лигированием 5'-концы всех векторов были дефосфорилированы щелочной фосфатазой *E. coli* [15]

Полученными рекомбинантными векторами трансформировались клетки штаммов *E. coli*: в первом случае XL-I Blue, во втором — N99cI<sup>+</sup>, в третьем — HB101. Выбор штамма-хозяина определялся структурными особенностями использованных векторов. Селекция клонов проводилась на агаризованной среде с ампициллином (Ap, 50 мкг/мл). Клоны, содержащие *HindII/HindIII*-фрагмент в правильной ориентации, отбирались с помощью рестриктоного анализа выделенной из них плазмидной ДНК. Сохранение рамки трансляции в рекомбинантной ДНК из отобранных клонов подтверждалось секвенированием плазмидной ДНК по методу Максама — Гилберта в модификации Чувпило — Кравченко [16].

Как видно из рис. 1, во всех трех случаях 3С-протеиназа должна была синтезироваться в составе рекомбинантных белков. Однако при успешном их синтезе протеиназа должна была бы аутокаталитически высвободиться [8—10].

Клонирование *HindII/HindIII*-фрагмента, содержащего ген 3С, в векторе pEKI (рис. 2а) не дало положительного результата. Рестриктный

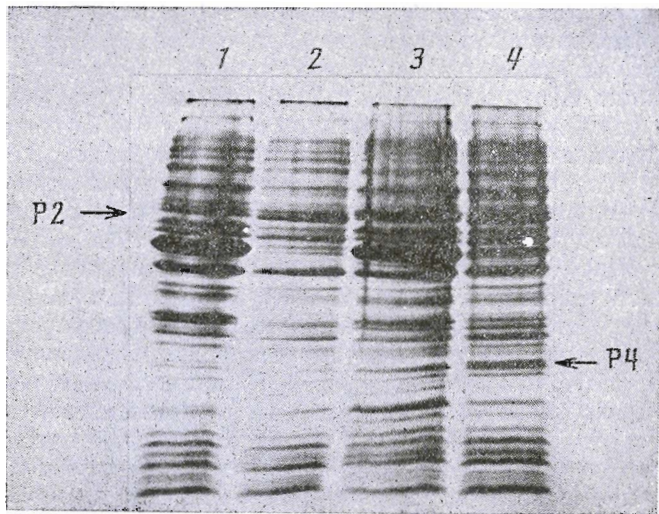


Рис. 3. Электрофореграмма белков клеток HB101, трансформированных рекомбинантными векторами рТТQ8-PV1 (1, 2) и рТТQ8-PV2 (3, 4) в присутствии (2, 4) и в отсутствие IPTG (1, 3). 12% ПААГ окрашен кумасси G-250

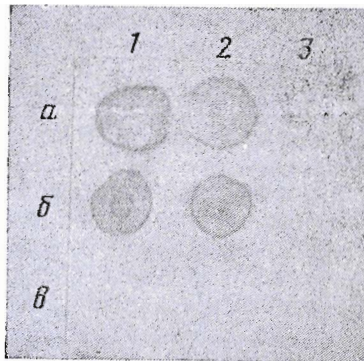


Рис. 4. Результаты иммуноферментного анализа белков клеток HB101, трансформированных нерекombинантным вектором рТТQ8 (а) и рекомбинантными векторами рТТQ8-PV1 (а) и рТТQ8-PV2 (б). 1 — лизаты клеток, 2 — нерастворимые фракции белков, 3 — фракции растворимых белков

анализ рекомбинантной ДНК показал наличие встроенного фрагмента только в обратной ориентации (в 18 из 20 отобранных клонов; в двух остальных были обнаружены существенные перестройки плазмидной ДНК). На основании этих результатов было сделано предположение о токсичности ЗС-протеиназы полиовируса для клеток *E. coli* и недостаточном жестком контроле транскрипции с *lac*-промотора вектора рЕК1 в штамме XL-I Blue (несмотря на то что штамм XL-I Blue был выбран из-за суперпродукции *lac*-репрессора и мутации в белке *gcsA*, позволяющей минимизировать перестройки внутри плазмидной ДНК). В то же время отсутствие клонов с правильно ориентированным *Hind*IV/*Hind*II-фрагментом косвенно свидетельствует о том, что в бактериальных клетках, трансформированных рекомбинантным вектором рЕК1-PV, образуется активная ЗС-протеиназа.

Рестриктный анализ рекомбинантного вектора рPL-λ-PV (рис. 2б) позволил отобрать несколько идентичных клонов с правильно ориентированным *Hind*IV/*Hind*II-фрагментом. Секвенирование выделенной из них рекомбинантной ДНК подтвердило сохранение рамки трансляции при переходе от N-белка фага λ к фрагменту полипротеина. Успешное клонирование в данном случае объясняется, по-видимому, достаточно жестким

контролем транскрипции с раннего промотора  $P_L$  фага  $\lambda$  в лизогенном штамме N99сI<sup>+</sup> и, как следствие, отсутствием или крайне малым количеством ЗС-протеиназы в трансформированных вектором рPL- $\lambda$ -PV клетках в отсутствие индукции транскрипции с  $P_L$ -промотора.

Для изучения экспрессии гена ЗС в составе рекомбинантного вектора рPL- $\lambda$ -PV им были трансформированы клетки лизогенного штамма *E. coli* N4830, содержащего мутантный инактивирующийся при нагревании репрессор  $P_L$ -промотора фага  $\lambda$ . Электрофоретическое сравнение набора образующихся после термоиндукции белков в клетках N4830, трансформированных не рекомбинантным и рекомбинантным вектором рPL- $\lambda$ -PV, (окрашивание кумасси G-250) не выявило существенных различий. В то же время при радиоавтографии соответствующих электрофореграмм белков, меченных [<sup>35</sup>S]метионином, некоторые различия были выявлены (данные не приводятся), однако из-за малой эффективности экспрессии (или нестабильности экспрессирующихся продуктов) однозначно идентифицировать белки, синтезирующиеся в процессе термоиндукции, не удалось. Попытки увеличить выход белка путем переклонирования *Bam*HI/*Bam*HI-фрагмента рекомбинантного вектора рPL- $\lambda$ -PV (рис. 2 б) в мультикопийный вектор рHC624 по *Bam*HI-сайту [17] и в мультикопийный термоиндукцибельный вектор рVEU50 по *Bam*HI-сайту [18] оказались неэффективными. Трансформация полученными рекомбинантными векторами рHC624-PV и рVEU50-PV клеток *E. coli* N4830 и последующая термоиндукция не привели к увеличению выхода целевого белка.

Низкое содержание рекомбинантного белка (ЗС в составе N-белка фага  $\lambda$ ) в клеточных лизатах во всех описанных выше случаях, возможно, объясняется неблагоприятным влиянием термоиндукции, при которой в бактериальных клетках активизируется, в частности, синтез белков теплового шока, ответственных за деградацию чужеродных белковых продуктов [19].

Хорошие результаты были получены при клонировании *Hind*II/*Hind*II-фрагмента кДНК полиовируса в экспрессионном векторе рТТQ8 (рис. 2а). В клетках *E. coli* HB101, трансформированных полученным из отобранных клонов рекомбинантным вектором рТТQ8-PV1 (штамм HB101 был выбран из-за мутации в белке *gcsA*, минимизирующей перестройки в плазмиде), синтезировался белок (P2), который появлялся только после индукции IPTG и отсутствовал в лизатах клеток, трансформированных не рекомбинантным вектором рТТQ8 (рис. 3, 1, 2). При использовании штамма MN1 и штамма AB1899 со сниженным уровнем протеолиза эффективность экспрессии была сходной. По-видимому, агрегация рекомбинантных белков и продуктов их процессинга предохраняет их от расщепления бактериальными протеиназами. Определенная на основании электрофоретической подвижности молекулярная масса появляющегося полипептида составила ~46 кДа. Белок, соответствующий нативной ЗС-протеиназе с мол. массой ~20 кДа, на электрофореграмме белков клеточных лизатов обнаружен не был. Это обстоятельство могло объясняться отсутствием процессинга в образующемся рекомбинантном белке или же его низкой эффективностью.

Чтобы исследовать влияние величины окружающих ген ЗС фрагментов кДНК полиовируса на эффективность экспрессии гена ЗС и процессинга рекомбинантного белка, в векторе рТТQ8 по сайтам *Hind*II/*Hind*III был направленно клонирован *Hind*II/*Hind*III-фрагмент кДНК полиовируса (нуклеотиды 5240—6056 [5], рис. 1), кодирующий 43 аминокислоты белка ЗА, 22 аминокислоты пептида VP<sub>g</sub>, примыкающего с ЗС-белку с N-конца, саму ЗС-протеиназу и 25 аминокислот ЗD-полимераза, примыкающей к ЗС-протеиназе с C-конца. По сравнению с *Hind*II/*Hind*II-фрагментом (рис. 1) *Hind*II/*Hind*III-фрагмент кодирует на 237 аминокислот ЗD-полимераза меньше. По результатам электрофореза белков клеточных лизатов в ПААГ с SDS, в клетках *E. coli* HB101, трансформированных новым рекомбинантным вектором рТТQ8-PV2 (рис. 2а), в присутствии IPTG синтезировался белок (P4) с мол. массой ~25 кДа (рис. 3, 3, 4). Иммуноферментный анализ в пятне с использованием поликлональных антител по-

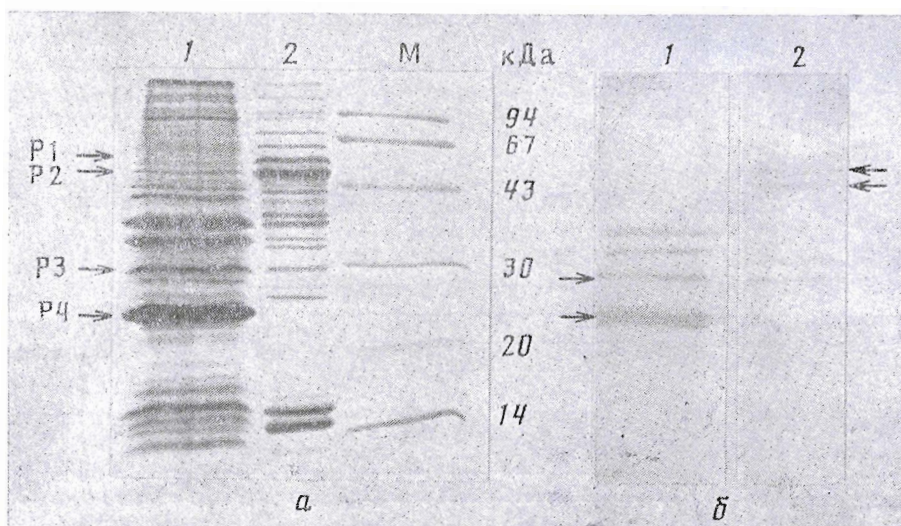


Рис. 5. Анализ белков тел включения из клеток, трансформированных рТТQ8-PV1 (1), рТТQ8-PV2 (2): а — электрофорезграмма после окрашивания 12% ПААГ кумасси G-250; б — иммуноблоттинг полос 1, 2 рис. 5а. М — белки-маркеры

казал, что как в первом (полипептид P2), так и во втором случае (полипептид P4) белки, связывающие поликлональные антитела к фрагменту 3С-белка, содержались в нерастворимой фракции клеточных белков (в телах включения) и отсутствовали среди растворимых белков (рис. 4). В качестве источника поликлональных антител была использована сыворотка кролика, иммунизированного синтетическим пептидом CGRNEKFRDIRG, содержащим аминокислоты 79—87 3С-протеиназы [8].

Электрофорез в ПААГ с SDS белков тел включения в обоих случаях показал существенное обогащение нерастворимых белков полипептидами P2 и P4 соответственно (рис. 5а). Кроме них среди белков тел включения были обнаружены полипептиды P1 с мол. массой ~49 кДа (в клетках, трансформированных вектором рТТQ8-PV1) и P3 с мол. массой ~28 кДа (в клетках, трансформированных вектором рТТQ8-PV2), связывающие поликлональные антитела к фрагменту 3С-протеиназы (рис. 5б) и не замеченные ранее среди белков клеточных лизатов вследствие их экранирования бактериальными белками. Для идентификации полипептидов P1—P4 (рис. 5) был проведен блоттинг белков тел включения на иммобилон и последующее секвенирование N-концевых аминокислотных последовательностей P1—P4. Последовательность первых 10 аминокислот для полипептидов P1 и P3 GPGFDYAVAM соответствовала N-концевой аминокислотной последовательности 3С-белка [5]. 10 N-концевых аминокислот полипептидов P2 и P4 MLGVHDNVAI соответствовали последовательности аминокислот 3С-протеиназы начиная с 27-го остатка [5].

Существование полипептидов P2 и P4 (без 26 N-концевых аминокислот 3С-белка) объясняется тем, что мРНК, кодирующая 3С-протеиназу полиовируса 1 (Mahoney) [5], содержит последовательность GGAG и, на расстоянии восьми нуклеотидов, триплет AUG (рис. 6), выполняющие в бактериальных клетках соответственно функции области Шайн—Далгарно и метионинового кодона, инициирующего трансляцию с альтернативного сайта [10].

Поскольку полипептиды P2 и P4, транслирующиеся с альтернативного сайта, не способны процессировать себя по аминокислотной паре Gln—Gly, примыкающей к С-концу 3С-протеиназы [10], а молекулярные массы P1 и P3 отличаются от молекулярных масс соответственно P2 и P4 приблизительно на 3 кДа (рис. 5), был сделан вывод, что полипептиды P1 и P3 являются продуктами процессинга соответствующих рекомбинантных белков по аминокислотной паре Gln—Gly, примыкающей к N-концу 3С-белка. С-Концы полипептидов P1 и P3, как и полипептидов P2 и P4,

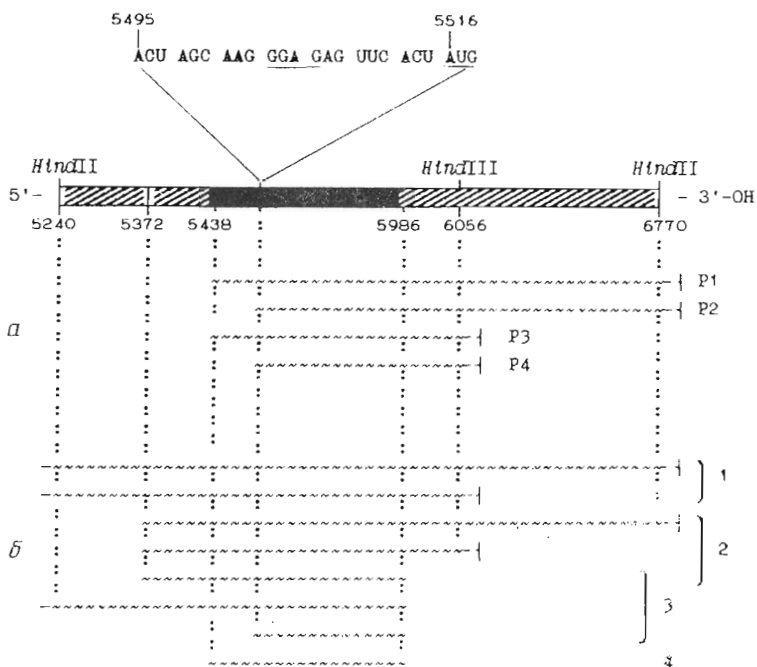


Рис. 6. Продукты трансляции рекомбинантных генов рТТQ8-PV1 и рТТQ8-PV2 и процессинга соответствующих рекомбинантных белков: а — обнаруженные (P1—P4), б — необнаруженные (1—4). Волнистой линией обозначены вирусспецифические полипептидные цепи, пунктирной — пептидные фрагменты, образованные при трансляции нуклеотидной последовательности вектора рТТQ8

остаются непроцессированными. Необходимо отметить, что эффективность экспрессии рекомбинантных белков и характер их процессинга не зависит от величины примыкающего к 3С-протеиназе с С-конца фрагмента полиовирусного полипротеина (262 аминокислоты 3D-полимеразы в P1 и P2, 25 аминокислот 3D в P3 и P4) (рис. 5).

Таким образом, среди белков, синтезирующихся в присутствии IPTG в клетках HB101, трансформированных рекомбинантными векторами рТТQ8-PV1 и рТТQ8-PV2, и продуктов их процессинга удалось обнаружить (рис. 6а) продукты трансляции с альтернативного сайта — P2 и P4; продукты неполного процессинга соответствующих рекомбинантных белков по аминокислотной паре Gln—Gly, примыкающей к N-концу 3С-белка, — P1 и P3. В то же время не были обнаружены (рис. 6б) полные рекомбинантные белки (1); продукты процессинга по аминокислотной паре Gln—Gly, примыкающей к N-концу пептида VP<sub>g</sub> (2); продукты процессинга по аминокислотной паре Gln—Gly, примыкающей к С-концу 3С-белка (3), включая нативную 3С-протеиназу с мол. массой 20 кДа (4).

Эти факты объясняются, по-видимому, неустойчивостью целого рекомбинантного белка и быстрым аутокаталитическим расщеплением 3С-протеиназой своей N-концевой аминокислотной пары Gln—Gly. При этом, вероятно, аминокислотная пара Gln—Gly, примыкающая к N-концу пептида VP<sub>g</sub>, расщепляется после того, как 3С-протеиназа выщепляет себя по N-концу. В случае, если расщепление этих аминокислотных пар происходит в обратном порядке, промежуточный продукт с нерасщепленной N-концевой парой Gln—Gly 3С-протеиназы, видимо, крайне нестабилен.

Интересно отсутствие продуктов процессинга рекомбинантного белка по С-концу 3С-фермента, в частности отсутствие самой 3С-протеиназы с мол. массой 20 кДа. Длительная инкубация (до 48 ч) полипептидов P1 и P3 в составе белков тел включения после их ренатурации и в очищенном виде [20] не приводила к расщеплению С-концевой пары Gln—Gly и появлению нативной 3С-протеиназы. Этот факт согласуется с наблюдениями авторов работы [10], которые клонировали ген 3С-протеиназы в составе

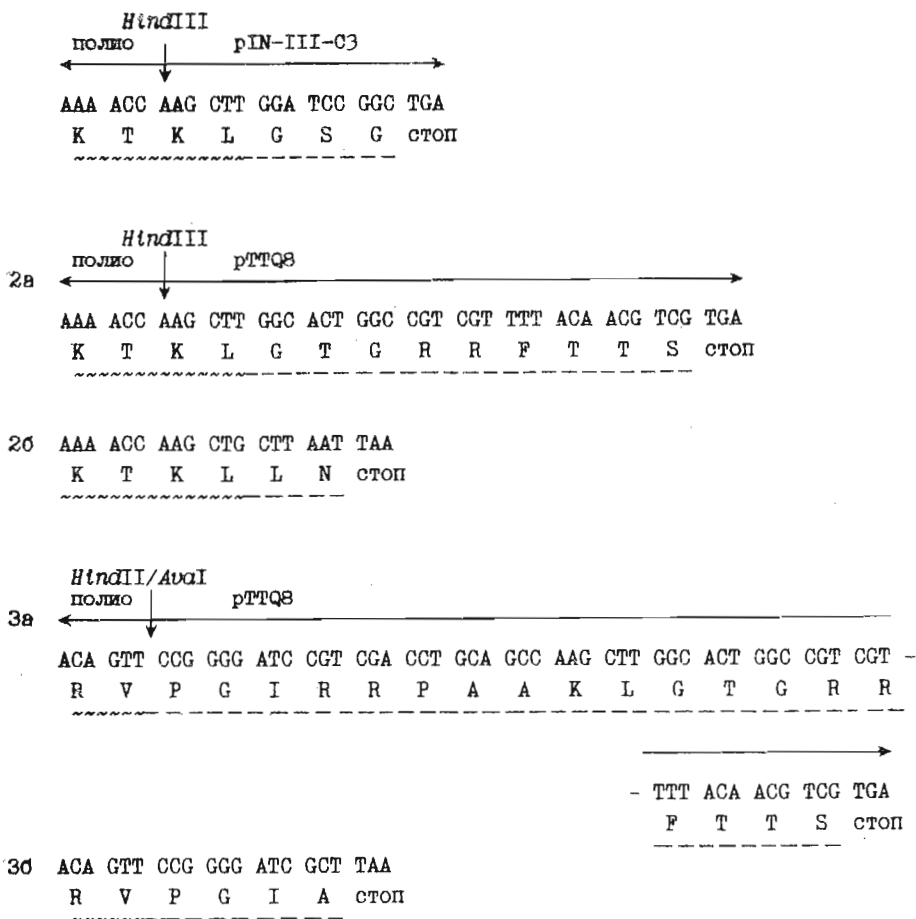


Рис. 7. Нуклеотидные последовательности 3'-областей рекомбинантных генов: 1 — вектора рIN-III-C3-7с [10], 2 — вектора рTTQ8-PV2, 3 — вектора рTTQ8-PV1; а — до, б — после введения терминатора трансляции. Обозначения пептидных цепей как на рис. 6

*Hind*II/*Hind*III-фрагмента кДНК полиовируса в векторе рIN-III-C3-7с. По их мнению, для образования белка ЗС необходимо, чтобы фермент выщипил себя сначала по С-концу. В результате образуется неустойчивый промежуточный продукт, который превращается в ЗС-протеиназу после расщепления ею своей N-концевой пары Gln—Gly.

Поскольку в нашем случае нативную ЗС-протеиназу обнаружить не удалось, мы предположили, что С-концевому процессингу могут препятствовать чужеродные для полиовирусного полипротеина аминокислоты, которые образуются на С-концах рекомбинантных белков при трансляции векторных нуклеотидных последовательностей вплоть до терминирующих кодонов (рис. 7). И в рекомбинантных векторах рTTQ8-PV1 и рTTQ8-PV2, и в векторе рIN-III-C3-7с, использованном в работе [10], терминация трансляции происходила на векторных нуклеотидных последовательностях, однако в векторе рIN-III-C3-7с за счет этого привносились 3 чужеродные аминокислоты (рис. 7, 1), а в нашем случае 9 аминокислот для рTTQ8-PV2 (рис. 7, 2а) и 19 для рTTQ8-PV1 (рис. 7, 3а). Чтобы устранить возможный негативный эффект присутствия С-концевых чужеродных аминокислот, в рекомбинантные векторы рTTQ8-PV1 по *Vam*III-сайту и рTTQ8-PV2 по *Hind*III-сайту был введен терминатор трансляции. Клоны, содержавшие встроенный терминатор трансляции, отбирались гибридизацией. В результате число чужеродных аминокислот в случае рTTQ8-PV1 сократилось до 4 (рис. 7, 3б), а в случае рTTQ8-PV2 до 2 (рис. 7, 2б).

Сравнение электрофореграмм белков клеточных лизатов и тел включения до и после введения терминатора показало небольшое смещение по-

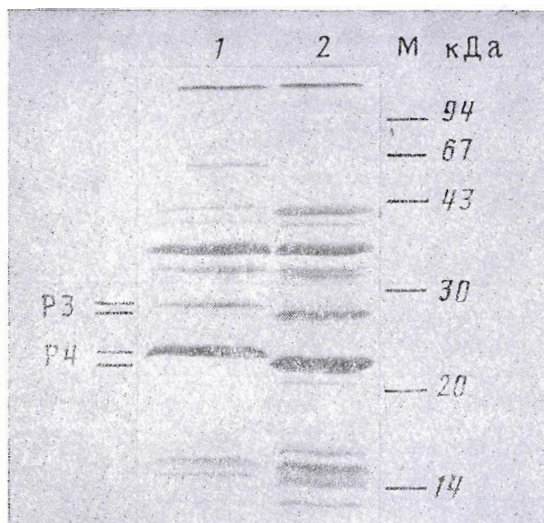


Рис. 8. Электрофореграмма белков тел включения из клеток, трансформированных вектором рТТQ8-PV2 до (1) и после (2) введения в его структуру универсального терминатора трансляции. М — белки-маркеры

лос, соответствующих полипептидам P1—P4, что вызвано уменьшением их молекулярных масс (на рис. 8 приведена электрофореграмма белков тел включения для рТТQ8-PV2 до и после введения терминатора), однако принципиальных изменений в картине процессинга обнаружено не было. Нативная ЗС-протеиназа с мол. массой 20 кДа отсутствовала.

К настоящему времени ген ЗС-протеиназы полиовируса типа 1 (Mahoney) проклонирован в нескольких векторных системах *E. coli*: в составе *Hind*II/*Hind*III-фрагмента кДНК полиовируса в векторе рIN-III-C3-7с [10], под контролем *trp*-промотора в векторе рЕХС (ген кодировал 183 аминокислоты ЗС-протеиназы и 25 аминокислот ЗД-полимеразы) [8], с использованием промотора бактериофага Т7 в системе трансляции *in vitro* [21]. В первых двух работах наблюдалось образование ЗС-протеиназы с мол. массой 20 кДа. В то же время в работе [21] при экспрессии различных фрагментов кДНК полиовируса, содержащих ген ЗС, нативной ЗС-протеиназы обнаружить не удалось — образовывался полипептид ЗСД, обладающий специфической ферментативной активностью, аналогичной активности ЗС-протеиназы. Предполагается [21], что для эффективного процессинга области структурных белков необходима вся ЗД-полимераза, ковалентно связанная с ЗС-белком, т. е. в этом случае фермент работает в форме ЗСД, причем фрагмент ЗД выполняет кофакторную функцию. При расщеплении же аминокислотных пар Gln—Gly в области неструктурных белков вирусного полипротеина ЗС-протеиназа проявляет одинаковую активность как в нативной ЗС-форме, так и будучи связанной с фрагментами ЗД различной величины [21].

Исходя из данных работ [8, 10, 21] и наших результатов можно сделать вывод, что ЗС-протеиназа с различной эффективностью расщепляет аминокислотные пары Gln—Gly, примыкающие к ее N- и С-концам. В то время как процессинг по N-концу идет очень эффективно, расщепление С-концевой аминокислотной пары Gln—Gly происходит не всегда и регулируется, по-видимому, какими-то дополнительными факторами. При этом наличие или отсутствие фрагментов ЗД-полимеразы, ковалентно связанных с белком ЗС, не лишает ЗС-фермент специфической протеолитической активности.

Необходимо отметить, что не только в клетках *E. coli*, но и в зараженной вирусом полиомиелита культуре эукариотических клеток процессинг С-концевой области ЗС-протеиназы у различных типов полиовирусов происходит неодинаково [22]. Для полиовирусов типов 3 Sabin (3(S)) и 3 Leon



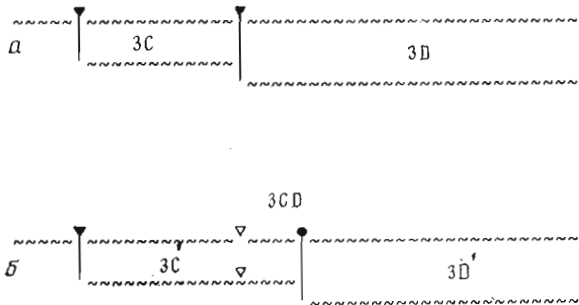


Рис. 9. Схема процессинга области 3CD вируса полиомиелита. Символами обозначены аминокислотные пары: ● — Tyr-Gly; ▲ и ▽ — расщепляемая и нерасщепляемая Gln-Gly

а	VP1... →	↓	→ 2A	Расщепление Y-C
Полио 1 Mahoney	L T P L S T K D L T	T	Y G F G H Q N K A V	+
Полио 1 Sabin	- - - - -	-	- - - - -	+
Полио 2 Lansing	- A - - P G - G - -	-	- - - - -	+
Полио 2 Sabin	- - - - -	-	- - - - -	+
Полио 3 Leon	- D - - - E - G - -	-	- - - - -	+
Полио 3 Sabin	- D - - - E - G - -	-	- - - - -	+
		-2-1 1		

б	3C'... →	↓	→ 3D'	Расщепление Y-C
Полио 1 Mahoney	D T K E M Q K L L D	T	Y G I N L P L V T Y	+
Полио 1 Sabin	- - - - -	-	- - - - -	+
Полио 2 Lansing	- - - - -	R	- - - - -	+
Полио 2 Sabin	- - - - -	P R	- - - - -	+
Полио 3 Leon	- - - - -	R	- - - - -	-
Полио 3 Sabin	- - - - -	R	- - - - -	-
		-2-1 1		

Рис. 10. Сравнение аминокислотных последовательностей, окружающих аминокислотные пары Tyr-Gly, расщепляемые протеиназой 2A, в различных типах полиовирусов

(3(L)) характерно образование белков 3C и 3D в больших количествах (рис. 9а). Напротив, у вирусов полиомиелита типов 1 Mahoney (1(M)), 1 Sabin (1(S)), 2 Lansing (2(L)) и 2 Sabin (2(S)) *in vivo* преимущественно образуются продукты 3C' и 3D' (рис. 9б). Это связано с определенной мутацией в области 3D полипротеина (рис. 10, [22]). Для вируса полиомиелита известно, что в процессинге кроме 3C-протеиназы принимает участие протеиназа 2A, которая осуществляет первое расщепление полипротеина по аминокислотной паре Tyr-Gly, разделяющей области структурных и неструктурных белков [3]. Для проявления активности 2A-белка необходимо, чтобы в положении (-2) к паре аминокислот Tyr-Gly находился треонин (рис. 10а). У полиовирусов типов 1(M), 1(S), 2(L) и 2(S) в области 3D находится пара аминокислот Tyr-Gly с треонином в положении (-2) (рис. 10б). У полиовирусов типов 3(L) и 3(S) в положении (-2) находится аланин (рис. 10б). По мнению авторов работы [22], у вирусов полиомиелита 1(M), 1(S), 2(L) и 2(S) вторым в цепи расщеплений идет ферментативный гидролиз аминокислотной пары Tyr-Gly в области 3D-полимераза, осуществляемый 2A-ферментом, с последующим аутокаталитическим расщеплением N-концевой пары аминокислот Gln-Gly 3C-протеиназой. В результате образуются белки 3C' и 3D'. Необходимо отметить, что белок 3C' — устойчивый продукт процессинга и входящая в его состав 3C-протеиназа не проявляет активности относительно своей C-концевой пары Gln-Gly. Эти факты хорошо согласуются с выводами авторов работы [10] и с нашими наблюдениями относительно стабильности полипептидов P1 и P3. В случае полипептида P1 расщепление Tyr-Gly в области 3D не происходило из-за отсутствия в системе протеиназы 2A, в состав полипептида P3 эта пара Tyr-Gly не входила, однако в обоих

случаях не наблюдалось и расщепления С-концевой пары аминокислот Gln—Gly 3С-протеиназы.

Авторы благодарят Г. А. Гришину за секвенирование вирусных полипептидов.

### Экспериментальная часть

В работе использованы эндонуклеазы рестрикции *KpnI*, *HpaI*, *AvaI*, *HindIII*, *BamHI*, *BglI*, *BglII*, *HindII*, *EcoRI* (Boehringer Mannheim, ФРГ); фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli*, ДНК-лигаза фага Т4, полинуклеотидкиназа фага Т4, щелочная фосфатаза *E. coli*, четыре dNTP, универсальный терминатор трансляции (Pharmacia, Швеция); четыре [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dNTP, [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP, иод[ $^{14}$ C]ацетамид, [ $^{34}$ S]метионин, конъюгат пероксидазы с антителами против иммуноглобулинов кролика, 3,3'-диаминобензидин (Amersham, Англия); трис(гидроксиметил)аминометан (трис), пират натрия, глицин, мочеви́на (Merck, ФРГ); SDS, EDTA, изопропилтиогалактозид (IPTG),  $\beta$ -меркаптоэтанол, белковые стандарты для электрофореза (М), фенилметилсульфонилфторид (Serva, ФРГ); агароза, акриламид, бисакриламид (Bio-Rad, США); дрожжевой экстракт, триптон, казеиновые кислоты (Difco, Англия); дитиотреит, бромистый этидий, бычий сывороточный альбумин (BSA) (Sigma, США); бромфеноловый синий, ксилол цианоловый голубой (Koch-Light, Англия); нитроцеллюлоза BA-85 (Schleicher und Schüll, ФРГ); иммобилон (Millipor, США); Ватман 3ММ (Whatman, Англия); рентгеновская пленка РМ-В (СССР); штаммы *E. coli*: HB101 ( $F^-$ ,  $hdsS20(r_b^-, m_b^+)$ ), *rec* A13, *ara*-14, *proA2*, *lacY1*, *galK2*, *rpsL20* ( $Sm^r$ ), *xyl*-5, *mtl*-1, *surE44*,  $\lambda^-$ ); MH1 (*araD139*, *lacX74*, *galU*, *galK*, *hsr^-*, *hms^+*, *strA*); AB1899 ( $F^-$ , *recA99*, *thr*-1, *leu*-6, *thi*-1, *lacY1*, *galK2*, *ara*-12, *xyl*-5, *mtl*-1, *proA2*, *his*-4, *argE3*, *str*-31, *tsx*-33, *lon*-100); XL-1 Blue (*endA1*, *hdsR17* ( $r_k^-, m_k^+$ ), *supE44*, *thi*-1,  $\lambda^-$ , *recA*, *gyrA96*, *relA1*,  $\Delta$  (*lac*), [ $F'$  *proAB*, *lacI^q*, *zAM15*, *Tn10(tet^r)*]); N4830 ( $F^-$ , *su^-*, *his^-*, *ilv^-*, *gal^+Δ8*, ( $\lambda$ CI857 $\Delta$ ВAM $\Delta$ H1)); N99C1 $^+$  (Pharmacia, Швеция); векторы pPL- $\lambda$  (Pharmacia, Швеция); pTTQ8 (Amersham, Англия); вектор pEK1 был любезно предоставлен В. Н. Добрыниным; вектор pHC624 — К. Г. Скрыбиным; вектор pVEU50 — Е. Д. Свердловым; фрагмент *HindII*—*HindII* кДНК полиовируса 1 (М) — В. И. Аголом; поликлональные антитела к фрагменту 3С — Е. Виммером (Нью-Йорк).

В качестве компонентов буферов использовались соли фирмы Merck (ФРГ) и производства СССР квалификации ос. ч. Квалификация остальных реактивов была не ниже х. ч.

Конструирование рекомбинантных ДНК, приготовление компетентных клеток *E. coli* и их трансформацию, селекцию клонов, выделение и анализ плазмидной ДНК проводили как описано в работе [15]. Секвенирование нуклеотидных последовательностей осуществляли по методу Максама — Гилберта в модификации Чувпило — Кравченко [16].

*Исследование экспрессии рекомбинантных генов в различных векторных системах E. coli:*

а) в составе векторов pPL- $\lambda$ -PV, pHC624c-PV и pVEU50-PV. Клетки N4830, трансформированные этими векторами, растили с аэрацией в среде YT [15] с добавлением ампициллина (50 мкг/мл) при 28° С до оптического поглощения  $A_{600} \sim 1,0$ . После термоиндукции (2ч, 42° С и снижения температуры до 37° С образцы культуры клеток (по 1 мл) отбирали через 0, 1, 2 и 3 ч. Клетки в каждом случае собирали центрифугированием (2 мин, 5000 об./мин) и суспендировали в 100 мкл буфера, содержащего 0,1 М трис (рН 6,8), 20% глицерин, 3% SDS и 3%  $\beta$ -меркаптоэтанол. После прогревания при 100° С в течение 2 мин аликвоты (20 мкл) наносили на 12% ПААГ с SDS. Анализ белков осуществляли с помощью электрофореза по методу Лэммли [23].

Для введения метки в синтезирующиеся белки клетки N4830, трансформированные соответствующими векторами, растили до  $A_{600} \sim 1,0$  при 28° С в среде YT с ампициллином. Клетки собирали центрифугированием (3 мин, 2500 об./мин), суспендировали в начальном объеме мине-

ральной среды M9 [15] с добавлением  $MgSO_4$  до конечной концентрации 1 mM, глюкозы до 0,2%, казаминовых кислот до 0,05%, дрожжевого экстракта до 0,01% и растили 1 ч при 28°С. После термоиндукции (2 ч при 42°С) и снижения температуры до 37°С через 0, 10, 20, 30, 60, 120 и 180 мин к аликвотам (300 мкл) культуры клеток добавляли 3 мкКи [ $^{35}S$ ]метионина, через 1 мин включение метки останавливали добавлением равного объема фенола, уравновешенного 0,1 М трис-НСl, pH 8,0 [15]. Экстрагированные белки осаждали из фенольной фракции добавлением пяти объемов 96% этанола. Осадок белка промывали 70% этанолом, высушивали, растворяли в 40 мкл буфера для нанесения образцов [23] и после прогревания в течение 2 мин при 100°С аликвоты (20 мкл) наносили на 12% ПААГ с SDS. Аналогичные операции проводили с неиндуцированными нагреванием клетками, которые растили параллельно при 28°С. Радиоавтографию электрофореграмм осуществляли с использованием рентгеновской пленки РМ-В при -70°С.

б) в составе векторов *pTTQ8-PV1*, *pTTQ8-PV2* и *pEK1-PVs*. Клетки NB101, трансформированные векторами *pTTQ8-PV1* и *pTTQ8-PV2*, и клетки XL-1 Blue, трансформированные вектором *pEK1-PVs*, растили в среде YТ с добавлением ампициллина в течение ночи при 37°С с аэрацией. Затем культуры клеток разбавляли (1 : 100) свежей средой YТ с ампициллином и в тех же условиях растили до  $A_{600} \sim 0,2$ . После добавления IPTG до конечной концентрации 1 mM клетки растили еще 3 ч (до  $A_{600} \sim 1,0$ ), затем собирали центрифугированием. Анализ белков осуществляли с помощью электрофореза в 12% ПААГ с SDS для *pTTQ8-PV1* и *pTTQ8-PV2* и в 7% ПААГ с SDS для *pEK1-PVs* [23].

*Введение универсального терминатора трансляции.* Универсальный терминатор трансляции вводили в векторы *pTTQ8-PV1* и *pTTQ8-PV2* соответственно по сайтам *Bam*HI и *Hind*III путем последовательных операций рестрикции, достраивания 3'-укороченных концов рестриктов с помощью фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli* и лигирования в присутствии ДНК-лигазы фага T4 модифицированных рестриктов с олигонуклеотидом, кодирующим стоп-кодон в трех рамках трансляции [15]. Для предотвращения встраивания нескольких копий олигонуклеотида в состав вектора рестрикты векторов перед лигированием не дефосфорилировали, а олигонуклеотид не кинировали. Молярное соотношение вектор/олигонуклеотид в реакционной смеси составляло 1 : 100. Отбор клонов, содержащих векторы со встроенным терминатором трансляции, осуществляли с помощью гибридизации на нитроцеллюлозных фильтрах [15]. В качестве зонда использовали тот же олигонуклеотид, кинированный [ $\gamma$ - $^{32}P$ ]АТФ с помощью полинуклеотидкиназы фага T4 [15].

*Выделение тел включения.* Клетки, выращенные в условиях, описанных выше, собирали центрифугированием (4°С, 10 мин, 6000 об./мин), промывали охлажденным буфером А (10 mM трис, pH 7,5, 10 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1 mM фенилметилсульфонилфторид) и сырую биомассу суспендировали в буфере А (в 1/100 первоначального объема культуры клеток), содержащем 1 мг/мл лизоцима. После 1 ч инкубации при 4°С суспензию клеток, охлаждаемую льдом, обрабатывали ультразвуком (5 импульсов по 20 с). После центрифугирования (20 мин, 5000 об./мин) осадок промывали охлажденным буфером А и хранили при -70°С. Белки из тел включения анализировали с помощью электрофореза по методу Лэммли [23].

*Электрооблоттинг* белковых зон, полученных в результате электрофореза, осуществляли на аппарате фирмы Bio-Rad (США) с использованием нитроцеллюлозы BA-85 (10 ч, 40 В) в буфере, содержащем 25 mM трис, 10 mM глицин (pH доводили до 8,5 добавлением 1 М HCl), 10% MeOH, 0,1% SDS, 0,5 mM дитиотреит. Для секвенирования N-концевых аминокислотных последовательностей белков электрооблоттинг после электрофореза проводили на иммобилон в тех же условиях. Белковые зоны прокрашивали 0,1% кумасси R-250 в 50% MeOH.

*Иммуноферментный анализ* белковых зон на нитроцеллюлозе BA-85 проводили как описано в работе [24] с использованием поликлональных

антител к фрагменту 3С и конъюгата пероксидазы с антителами против иммуноглобулинов кролика. В качестве субстрата применяли 3,3'-диаминобензидин.

При проведении иммуноферментного анализа в пятне образцы клеток и тел включения, растворенных в буфере А с 8 М мочевиной, а также образцы фракций растворимых белков в буфере А с лизоцимом (после центрифугирования в процессе выделения тел включения) в объеме 10 мкл в несколько приемов наносили на нитроцеллюлозу ВА-85. Количество суммарного белка в каждом образце соответствовало его содержанию в 1 мл исходной клеточной культуры (для сравнения: количество наносимого на гель суммарного белка при анализе методом электрофореза соответствовало его содержанию в 200 мкл клеточной культуры). После высущивания нанесенных на нитроцеллюлозу образцов иммуноферментный анализ проводили как описано выше.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kitamura N., Semler B. L., Rothberg P. G., Larsen G. R., Adler C. J. // Nature. 1981. V. 291. № 5817. P. 647—653.
2. Pallansch M., Kew O. M., Semler B. L., Omillanovski D. R., Anderson C. W. // J. Virol. 1984. V. 49. № 2. P. 873—880.
3. Toyoda H., Nicklin M. J., Murray M. C., Anderson C. W., Dunn J. J., Studier F. W., Wimmer E. // Cell. 1986. V. 45. № 5. P. 761—770.
4. Hanecak R., Semler B. L., Anderson C. W., Wimmer E. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1982. V. 79. № 31. P. 3973—3977.
5. Racaniello V. R., Baltimore D. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. № 8. P. 4887—4891.
6. Korant B. D. // J. Virol. 1973. V. 12. № 2. P. 556—563.
7. Pelham J. // Eur. J. Biochem. 1978. V. 85. № 2. P. 457—462.
8. Ivanoff L. A., Towatari T., Korant B. D., Petteway S. R. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. № 15. P. 5392—5396.
9. Palmenberg A. C., Ruechert R. R. // J. Virol. 1982. V. 41. № 1. P. 244—249.
10. Hanecak R., Semler B. L., Ariga H., Anderson C. W., Wimmer E. // Cell. 1984. V. 37. P. 1063—1073.
11. Nicklin M. J. H., Harris K. S., Pallai P. V., Wimmer E. // J. Virol. 1988. V. 62. № 11. P. 4586—4593.
12. Добрынин В. Н., Болдырева Е. Ф., Филиппов С. А., Чувпило С. А., Коробко В. Г., Воротынцева Т. И., Бессмертная Л. Я., Михайлова А. Г., Америк А. Ю., Антонов В. К. // Биоорганич. химия. 1987. Т. 13. № 1. С. 119—121.
13. Drahos D., Szybalski W. // Gene. 1981. V. 16. № 2, 3. P. 261—274.
14. Stark M. J. R. // Gene. 1987. V. 51. № 2, 3. P. 255—261.
15. Манциатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984.
16. Chuvpilo S. A., Kravchenko V. V. // FEBS Lett. 1985. V. 179. № 1. P. 34—36.
17. Boros I., Posjal J., Venetianer P. // Gene. 1984. V. 30. № 1—3. P. 257—260.
18. Uhlin B. E., Schwickart V., Clark A. J. // Gene. 1983. V. 22. № 2, 3. P. 255—265.
19. Grossman A. D., Erickson J. W., Gross C. A. // Cell. 1984. V. 38. P. 383—389.
20. Саблина Е. П., Антонов В. К. // Биоорганич. химия. 1991. Т. 17. № 9. С. 1213—1222.
21. Yrma-Wong M. F., Dewalt P. G., Johnson V. H., Lamb J. G., Semler B. L. // Virol. 1988. V. 166. № 1. P. 265—270.
22. Lee C. K., Wimmer E. // Virol. 1988. V. 166. № 2. P. 405—414.
23. Laemmli U. K. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680—685.

Поступила в редакцию  
25.1.1991

E. P. SABLINA, A. Yu. AMERIK, V. K. ANTONOV

#### CLONING AND EXPRESSION OF THE POLIOVIRUS 3C PROTEASE GENE IN *E. COLI* CELLS

M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR,  
Moscow

Expression of the 3C protease gene of poliovirus type 1 (Mahoney) in *E. coli* cells using various vectors was studied. The 3C gene was shown to be expressed effectively upon its cloning in *Hind*II/*Hind*II (bases 5240 to 6770) and in *Hind*II/*Hind*III (bases 5240 to 6056) fragments of poliovirus cDNA in pTTQ8 vector containing tac-promoter and lacI-repressor gene. Products of processing at the N-terminal 3C protease Gln-Gly site and polypeptides formed upon translation from an alternative methionine, which was coded by bases 5516—5518 of poliovirus cDNA, were found among virus-specific proteins. Processing at the C-terminal 3C protease Gln-Gly site was not observed.