



УДК 577.113.6:579.(252.5+253.4).083

© 1993 В. Г. Коробко, И. В. Давыдов,
В. Н. Добрынин, Н. М. Пустошилова*, Л. Р. Лебедев*,
И. П. Гилева*, В. А. Петренко*

ПОЛУЧЕНИЕ И БАКТЕРИАЛЬНАЯ ЭКСПРЕССИЯ МУТАНТНОГО ГЕНА ЛИМФОТОКСИНА ЧЕЛОВЕКА

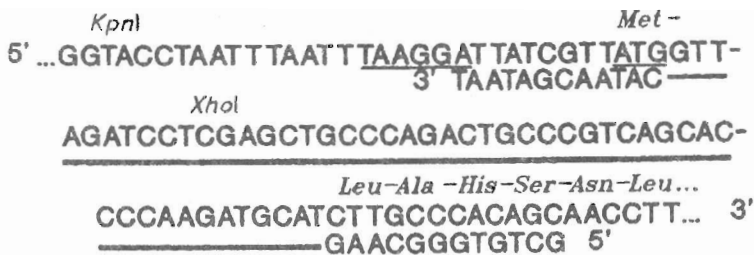
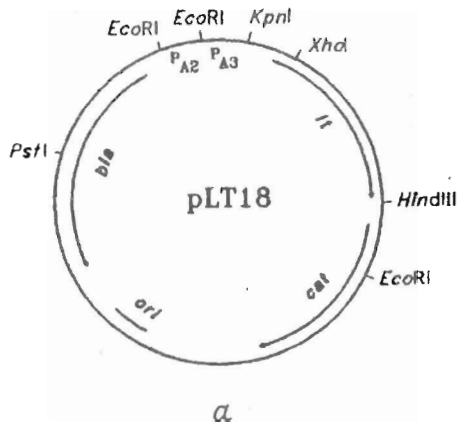
Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва;
* Научно-исследовательский конструкторско-технологический институт биологически актив-
ных веществ, НПО «Вектор», г. Бердск Новосибирской обл.

С помощью олигонуклеотиднаправленного мутагенеза получен мутантный ген лимфотоксина человека, кодирующий укороченный с N-конца на 21 аминокислоту рекомбинантный белок. Сконструирована плаزمида для экспрессии в *Escherichia coli*, в которой мутантный ген помещен под контроль тандема конститутивных промоторов ранней области фага T7. Разработан простой и эффективный способ выделения из бактериальной массы рекомбинантного белка, позволяющий с высоким выходом выделять высокоочищенный биологически активный мутантный лимфотоксин человека. Обнаружено, что в течение биосинтеза в клетках бактерий штамма SG20050 рекомбинантный белок подвергается посттрансляционному процессингу, в результате которого отщепляются N-концевые остатки метионина и лейцина.

Лимфотоксин, иногда называемый фактором некроза опухолей β (ФНО β), — важный иммуномодулятор, продуцируемый лимфоцитами при активации митогенами [1, 2]. Лимфотоксин обладает плеiotропным биологическим действием (см. обзор [3]), однако с практической точки зрения наиболее привлекательна его противоопухолевая активность *in vitro* и *in vivo*. Лимфотоксин, как и фактор некроза опухолей (ФНО α), вызывает геморрагический некроз ряда экспериментальных опухолей животных, а также оказывает прямое антипролиферативное или цитотоксическое действие на многие трансформированные клеточные линии. Поэтому большой интерес представляет получение методом сайтнаправленного мутагенеза мутантных форм лимфотоксина с целью исследования взаимосвязи между структурой и функцией.

Ранее нами был клонирован фрагмент генома человека, содержащий гены фактора некроза опухолей и лимфотоксина [4, 5]. На основе клонированных последовательностей были затем получены полусинтетические гены ФНО α [6] и ФНО β [7], адаптированные для бактериальной экспрессии. В настоящей работе мы описываем получение и экспрессию в клетках *E. coli* мутантного гена лимфотоксина, лишённого 21 N-концевого кодона. Предпосылка для проведения такой работы заключалась в том, что наибольшая гомология между двумя белками наблюдается в том случае, если расположить их аминокислотные последовательности одну под другой так, чтобы первая аминокислота ФНО α соответствовала 18-му остатку ФНО β . С другой стороны, мутанты ФНО α , лишённые нескольких N-концевых аминокислот, не только сохраняют полную биологическую активность исходного белка, но даже в значительной степени превосходят его по цитотоксической активности [8].

В работе использовали только олигодезоксирибонуклеотиды, поэтому префикс «d» в формулах олигонуклеотидов для краткости опущен.



δ

Рис. 1. Физическая карта плазмиды pLT18 (а) и нуклеотидная последовательность фрагмента плазмиды pLT18 (б), подвергнутого олигонуклеотиднаправленному мутагенезу. Приведены использованный для мутагенеза олигонуклеотид (I), аминокислотная последовательность, кодируемая плазмидой pLT21, и сайты рестриктаз. Подчеркнуты последовательность SD и иницирующий кодон. Плечи олигонуклеотида (I) соединены линией. Указаны гены β-лактамазы (bla), хлорамфеникол-ацетилтрансферазы (cat), лимфотоксина (ФНОβ) (II), сайт начала репликации (ori); P_{A2} и P_{A3} — промоторы A2 и A3 ранней области бактериофага T7

В качестве источника гена лимфотоксина для мутагенеза была использована плаزمида pLT18. Эта плазмида была получена в качестве побочного продукта при конструировании рекомбинантной плазмиды pLT9 [9]; она содержит неэкспрессирующийся вследствие сдвига рамки считывания мутантный ген ФНОβ (см. рис. 1). Для проведения мутагенеза плазмиду pLT18 гидролизовали рестриктазами *EcoRI* и *HindIII* и фрагмент величиной около 800 п. о. клонировали по тем же сайтам в фаговый вектор M13mp10. В результате получили рекомбинантный фаг M13LT1.

Для мутагенеза использовали 24-звенный олигонуклеотид (I) GCTGTGGGCAAGCATAACGATAAT, левое плечо которого комплементарно последовательности слева от делетируемой области, включая иницирующий кодон ATG, а правое плечо комплементарно последовательности, начинающейся с кодона CTT, кодирующего Leu²² зрелого белка ФНОβ (см. рис. 1). Олигонуклеотид фосфорилировали и после отжига с одноцепочечной ДНК фага M13LT1 использовали как праймер для синтеза второй цепи ДНК с помощью фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli* в присутствии четырех дезокси-нуклеотид-5'-трифосфатов и ДНК-лигазы фага T4. Полученной реакционной смесью без обогащения двухцепочечной ковалентно-замкнутой ДНК трансформировали компетентные клетки *E. coli* WK-6 mutS [10]. Скрининг бляшек, содержащих мутантные фаги, проводили гибридизацией с 5'-³²P-меченым олигонуклеотидом (I). Гибридуемые бляшки мутантных фагов

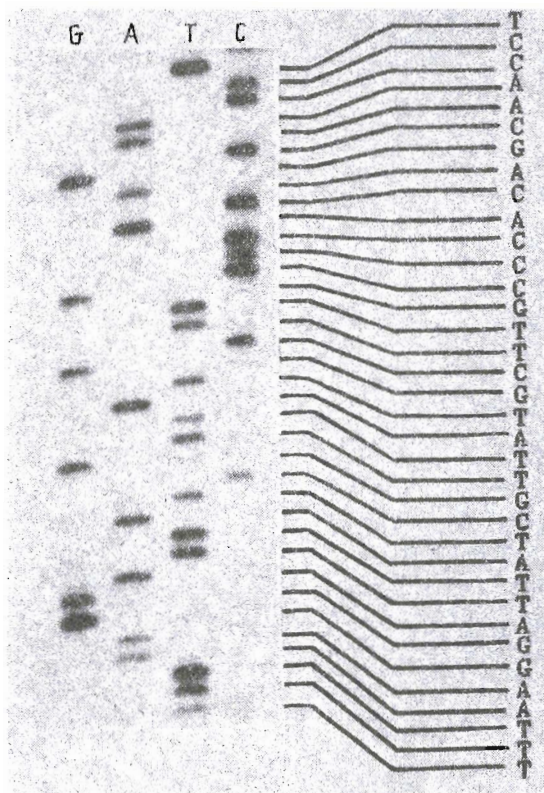


Рис. 2. Фрагмент авторадиограммы разделяющего геля при определении нуклеотидной последовательности ДНК мутантного фага M13LT2

M13LT2 использовали для выделения фаговой одноцепочечной ДНК и соответствующей двухцепочечной репликативной формы (РФ-ДНК). Строение полученных мутантных фагов M13LT2 подтверждали рестриктным анализом РФ-ДНК по отсутствию сайта расщепления рестриктазой *Xho* I и укорочению рестриктного фрагмента *Kpn* I/*Pst* I на 50 п. о. Окончательно структуру ДНК фага M13LT2 подтверждали определением нуклеотидной последовательности по методу Сэнгера [11] (рис. 2) с использованием специально синтезированного для этой цели олигонуклеотидного праймера GACAACATGAAGTAAAC, локализованного на фаговой ДНК на расстоянии 70 нуклеотидов до точки мутагенеза.

С целью получения плазмиды, детерминирующей экспрессию мутантного гена лимфотоксина, простой рекомбинацией по сайтам *Kpn* I и *Hind*III между плазмидой rLT18 и фагом M13LT2 получили новую плазмиду rLT21. В этой плазмиде ген, кодирующий укороченный с N-конца лимфотоксин, находится под контролем тандема двух конститутивных промоторов, A2 и A3, из ранней области бактериофага T7 и искусственного участка инициации трансляции. Исследование экспрессии мутантного гена ФНО β проводили путем трансформации плазмидой rLT21 компетентных клеток *E. coli* с последующим анализом суммарного клеточного белка электрофорезом в SDS-ПААГ по Лэммли [12]. Наивысший уровень экспрессии был достигнут при использовании штамма *E. coli* SG20050 [13], являющегося мутантом по *lon*-протеиназе (рис. 3). Следует отметить, что этот штамм ранее был с успехом использован для экспрессии искусственных генов лейкоцитарного интерферона α 2, фактора некроза опу-

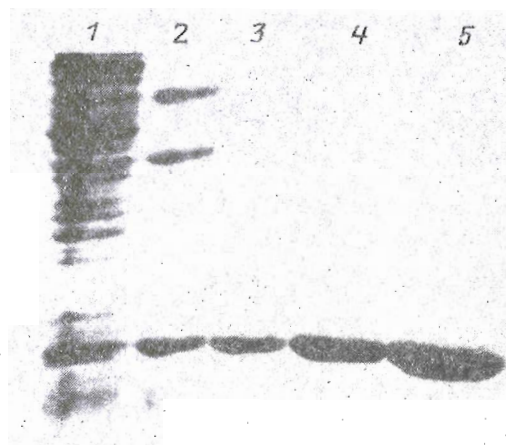


Рис. 3. Электрофорез в 12,5% SDS-ПААГ. 1 — суммарный белок клеток *E. coli* SG20050, содержащих плазмиду pLT21; 2 — фракция после хроматографии на DEAE-целлюлозе; 3—5 — белок после очистки на гидроксилпатите (5, 20 и 50 мкг соответственно)

холей человека (ФНО α) и др. [14—16]. При этом было установлено, что во всех перечисленных случаях рекомбинантный белок подвергался в штамме *E. coli* SG20050 процессингу, в результате которого происходило отщепление с N-конца остатка метионина. Это давало основание предположить наличие в использованном штамме высокой активности N-концевой метиониновой аминоклептидазы [17].

Для препаративного выделения рекомбинантного лимфотоксина компетентные клетки *E. coli* штамма SG20050 трансформировали плазмидой pLT21 и выращивали в 1 л среды LB при 37° С до стационарной фазы. Клетки отделяли центрифугированием и затем подвергали лизису ультразвуком в присутствии ингибиторов протеиназ. После удаления клеточного дебриса центрифугированием белок очищали последовательной хроматографией супернатанта сначала на DEAE-целлюлозе DE-52, а затем на гидроксилпатите. В результате из 3 г влажных клеток получили 5,6 мг рекомбинантного белка. Анализ электрофорезом в 12,5% SDS-ПААГ с последующим прокрашиванием нитратом серебра показал высокую степень чистоты (>98%) полученного мутантного белка. Определение биологической активности в цитопатическом тесте на мышинных фибробластах линии L-929 показало, что мутантный ФНО β обладает высокой цитотоксической активностью (не менее $5 \cdot 10^7$ ед/мг белка).

Полученный рекомбинантный белок был подвергнут также анализу N-концевой аминокислотной последовательности. В трех независимых экспериментах было определено восемь N-концевых аминокислотных остатков: Ala-His-Ser-Asn-Leu-Lys-Pro-Ala-. Таким образом, выделенный рекомбинантный белок оказался лишенным двух аминокислотных остатков с N-конца по сравнению со структурой, выведенной из нуклеотидной последовательности кодирующего его гена. Отщепление N-концевого остатка метионина может быть обусловлено активностью метиониновой аминоклептидазы, хотя в работе [18] отмечено, что связь Met-Leu в экспериментах *in vitro* на пептидных субстратах оказывалась одной из наименее чувствительных к действию этого фермента. Что касается отщепления остатка лейцина, то необходимы дальнейшие эксперименты, чтобы определить, происходит ли оно в процессе выделения или в результате действия внутриклеточного фермента. По нашему мнению, высокая специфичность отщепления свидетельствует в пользу второго предположения.

Экспериментальная часть

В работе использовали дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфаты (Pharmacia-PL, Швеция) и [γ - ^{32}P]rATP (5000 Ки/ммоль, Amersham, Англия); эндонуклеазы рестрикции *EcoRI*, *HindIII*, *PstI*, *KpnI*, *XhoI* и ДНК-полимеразу I *E. coli* (фрагмент Кленова) производства НПО «Фермент» (Вильнюс); ДНК-лигазу и полинуклеотидкиназу фага Т4 выделяли модифицированным способом [19].

Бактериальные штаммы: *E. coli* WK-6 *mutS recA*⁺ (Δ *lac-proAB*, *galE*, *strA*, *mutS*: : Tn10, F'(*proAB*, *lacI*^q, *lacZ* Δ M15)) [10]; *E. coli* SG20050 *recA*⁺ (F⁻, *araD139*, Δ (*argF-lac*) U169, *flbB6301*, *deoC1*, *rpfL150*, *relA1*, Δ lon-100, *cps-50*: : Mu dI) [13].

Синтез олигонуклеотидов выполняли твердофазным методом на автоматическом синтезаторе System I plus (Beckman, США) с использованием Н-фосфонатных синтонов, активируемых пивалоилхлоридом или адамантоилхлоридом, как описано в работе [20]. Очистку олигонуклеотидов проводили с помощью электрофореза в ПААГ с последующей ВЭЖХ.

Плазмидную ДНК и репликативную форму фаговых ДНК выделяли методом щелочного лизиса [21]; одностратную фаговую ДНК выделяли в соответствии с рекомендациями буклета фирмы Amersham (Англия) по клонированию в фаге M13.

Олигонуклеотиднаправленный мутагенез. Перед проведением мутагенеза 1 нмоль олигонуклеотида (I) фосфорилировали 1 ч при 37° С в 50 мкл буфера, содержащего 10 мМ трис-НСl (рН 9,5), 10 мМ MgCl₂, 5 мМ дитиотреит и 1 мМ спермидин, в присутствии 50 нмоль rATP и 100 ед. акт. Т4-полинуклеотидкиназы. Реакцию останавливали прогреванием в течение 15 мин при 70° С и последующей экстракцией хлороформом. Фосфорилированный олигонуклеотид осаждали этанолом и растворяли в 50 мкл воды. Затем смесь 0,2 пмоль ДНК фага M13LT2 и 200 пмоль фосфорилированного олигонуклеотида (I) в 20 мкл буфера, содержащего 10 мМ трис-НСl (рН 8,0), 50 мМ NaCl, 10 мМ MgCl₂, 5 мМ дитиотреит, 50 мкМ rATP и 100 мкмоль/л каждого дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфата, инкубировали 1 ч при 37° С в присутствии 10 ед. акт. Т4-ДНК-лигазы и 30 ед. акт. фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli*. Одну пятую часть реакционной смеси использовали для трансформации компетентных клеток *E. coli* WK-6 *mutS*. Скрининг фаговых бляшек гибридизацией с мутагенизирующим олигонуклеотидом, анализ рекомбинантных клонов и последующее клонирование проводили как описано в работе [22]. Нуклеотидную последовательность определяли методом Сэнгера [11]. Для выделения рекомбинантного белка из бактериальной массы использовали DEAE-целлюлозу DE-52 (Whatman, Англия) и гидроксилапатит НТР (Bio Rad, США). Белковый электрофорез и определение концентрации белка проводили как описано в работах [12] и [23]. N-Концевую аминокислотную последовательность мутантного ФНОФ определяли на твердофазном аминокислотном секвенаторе модели 477А фирмы Applied Biosystem (США). Идентификацию отщепленных фенилтиогидантоиновых производных аминокислот осуществляли на анализаторе 120А той же фирмы.

Биологическую активность рекомбинантного белка определяли в цитотоксическом тесте на мышинных фибробластах линии L-929 по методу [24].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Granger G. A., Williams T. W. // Nature. 1968. V. 218. № 5148. P. 1253—1254.
2. Gray P. W., Aggarwal B. B., Benton C. V., Bringman T. S., Henzel W. J., Jarrett J. A., Leung D. W., Moffat B. N. P., Svedersky L. P., Palladino M. A., Nedwin G. E. // Nature. 1984. V. 312. № 5995. P. 721—724.
3. Paul N. L., Ruddle N. H. // Ann. Rev. Immunol. 1988. V. 6. P. 407—438.
4. Недоспасов С. А., Шахов А. Н., Турецкая Р. Л., Метин В. А., Георгиев Г. П., Добрынин В. Н., Коробко В. Г. // Докл. АН СССР. 1985. Т. 285. № 6. С. 1487—1490.
5. 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 Y. A. // Gold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1986. V. LI. P. 611—624.

6. Добрынин В. Н., Беркова Н. П., Болдырева Е. Ф., Быстров Н. С., Кравченко В. В., Филиппов С. А., Чувпило С. А., Шамборант О. Г., Коробко В. Г. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 11. С. 1530—1537.
7. Коробко В. Г., Добрынин В. Н., Филиппов С. А., Чумаков А. М., Панина А. А., Болдырева Е. Ф., Недоспасов С. А., Шахов А. Н., Турецкая Р. Л. // А. с. № 1577361. Заявка № 4471820 от 21 июня 1988 г.
8. Mark D. F., Wang A. M., Lander M. B., Creasey A. A., Lin L. S., Van Arsdell J. N. // PCT WO 86/02381.
9. Коробко В. Г., Добрынин В. Н., Филиппов С. А., Чумаков А. М., Панина А. А., Болдырева Е. Ф., Недоспасов С. А., Шахов А. Н., Турецкая Р. Л. // А. с. № 1561510. Заявка № 4471819 от 21 июня 1988 г.
10. Zell R., Fritz H.-J. // EMBO J. 1987. V. 6. № 6. P. 1809—1815.
11. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. № 8. P. 5463—5467.
12. Laemmli U. K. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680—685.
13. Trisler P., Gottesman S. // J. Bacteriol. 1984. V. 160. № 1. P. 184—191.
14. Кравченко В. В., Гилева И. П., Шамин В. В., Куличков В. А., Добрынин В. Н., Филиппов С. А., Чувпило С. А., Коробко В. Г. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 9. С. 1176—1185.
15. Добрынин В. Н., Беркова Н. П., Болдырева Е. Ф., Быстров Н. С., Кравченко В. В., Филиппов С. А., Чувпило С. А., Шамборант О. Г., Коробко В. Г. // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 11. С. 1530—1537.
16. Коробко В. Г., Болдырева Е. Ф., Филиппов С. А., Беркова Н. П., Добрынин В. Н., Шмелев В. А., Попов С. Г., Евсегнеев С. Г., Носова Л. Ю. // Биоорган. химия. 1992. Т. 18. № 5. С. 646—659.
17. Ben-Bassat A., Bauer K. // Nature. 1987. V. 326. № 6110. P. 315.
18. Ben-Bassat A., Bauer K., Sheng-Yung C., Myambo K., Boosman A., Chang S. // J. Bacteriol. 1986. V. 169. № 2. P. 751—757.
19. Dolganov G. M., Chestukhin A. M., Shemyakin M. F. // Eur. J. Biochem. 1981. V. 114. № 2. P. 247—254.
20. Филиппов С. А., Есипов Д. С., Калинин С. В., Добрынин В. Н. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. № 14. С. 527—529.
21. Birnboim H. C., Doly J. // Nucl. Acids Res. 1979. V. 7. № 6. P. 1513—1522.
22. Коробко В. Г., Добрынин В. Н., Северцова И. В., Болдырева Е. Ф., Шингарова Л. Н., Чувпило С. А., Филиппова Л. Ю., Звонко Н. М., Васильева Т. Е., Колосов М. Н. // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 1. С. 69—81.
23. Bradford M. M. // Anal. Biochem. 1976. V. 72. № 1—2. P. 248—254.
24. Meager A., Leung H., Wooley J. // J. Immunol. Meth. 1989. V. 116. № 1. P. 1—17.

Поступила в редакцию
12.X.1992

V. G. Korobko, I. V. Davydov, V. N. Dobrynin, N. M. Pustoshilova*,
L. R. Lebedev*, I. P. Gileva*, V. A. Petrenko*

PREPARATION OF AN ARTIFICIAL GENE ENCODING HUMAN MUTANT LYMPHOTOXIN AND ITS EXPRESSION IN *Escherichia coli*

M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of
Sciences, Moscow;

* Research and Technology Institute of Biologically Active Substances, Berdsk

Using the oligonucleotide directed mutagenesis, a human lymphotoxin (TNF β) mutant gene lacking 21 N-terminal codons has been obtained. Recombinant plasmid pLT21 for expression of the mutant gene has been constructed. The mutant gene in the plasmid was placed under control of a tandem of constitutive promoters from coliphage T7. A simple procedure for isolation of recombinant protein was developed. The procedure allows to obtain the highly purified biologically active mutant protein with a good yield. During biosynthesis the recombinant protein undergoes a posttranslational processing resulted in the cleavage of N-terminal methionine and leucine residues.