



УДК 577(214+217)

© 1994 О. В. Телякова, Ю. Н. Уткин,
В. И. Цетлин, И. В. Северцова, Н. М. Звонко

ЭКСПРЕССИЯ ФРАГМЕНТА ГЕНА α -СУБЪЕДИНИЦЫ
АЦЕТИЛХОЛИНОВОГО РЕЦЕПТОРА ИЗ *Torpedo californica*
в *Saccharomyces cerevisiae*

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова
РАН, Москва

Ключевые слова: дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, экспрессия генов.

Никотиновый ацетилхолиновый рецептор (AChR) относится к семейству лигандуправляемых ионных каналов (см. обзоры [1—3]). AChR состоит из пяти субъединиц ($\alpha_2\beta\gamma\delta$). По существующим представлениям, лигандсвязывающие участки располагаются на наружной поверхности мембранного AChR в областях контакта α -субъединиц с соседними γ - и δ -субъединицами [4, 5], тогда как собственно канальная часть образована трансмембранными фрагментами M2 каждой из пяти субъединиц [1]. Имеются данные, что для функционирования канала существенны также области трансмембранных фрагментов M1 [3].

Индивидуальные α -субъединицы, полученные из AChR с помощью электрофореза в ПААГ, обладают способностью связывать, хотя и с меньшей эффективностью, чем нативный рецепторный комплекс, такие хорошо известные антагонисты AChR, как α -нейротоксины змей [6]. Подобные свойства были обнаружены и у синтетических пептидов, отвечающих определенным участкам N-концевого домена α -субъединицы (главным образом в области 180—200 аминокислотных остатков) [7], а также у целой α -субъединицы или у ее N-концевого экстрацеллюлярного домена, полученных экспрессией соответствующих генов в различных системах, в том числе и в *Saccharomyces cerevisiae* [8—12].

Дрожжи широко используются для гетерологической экспрессии генов из различных организмов [13—17]. В отдельных случаях [18—21] выход белка сопоставим с результатами, получаемыми в *E. coli*, но в целом он значительно ниже, однако сам продукт в подавляющем большинстве экспериментов активен [11—21]. Так, α -субъединица AChR, продуцируемая дрожжевыми штаммами, подвергалась гликозилированию и по своим биохимическим и иммунологическим свойствам не отличалась от α -субъединицы, выделенной из AChR [11, 12]. Цель настоящей работы — получение фрагмента α -субъединицы AChR *Torpedo californica*, состоящего из лигандсвязывающего участка и трансмембранных доменов M1 и M2. Такая конструкция может быть удобной моделью для исследования структурно-функциональной организации AChR. Экспрессию соответствующего участка гена α -субъединицы AChR предполагалось осуществить в дрожжах *S. cerevisiae*.

Для эффективной транскрипции нами был выбран сильный дрожжевой промотор гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы [22], часто используемый для этих целей [19, 20, 23] и обеспечивающий высокий уровень соответствующей

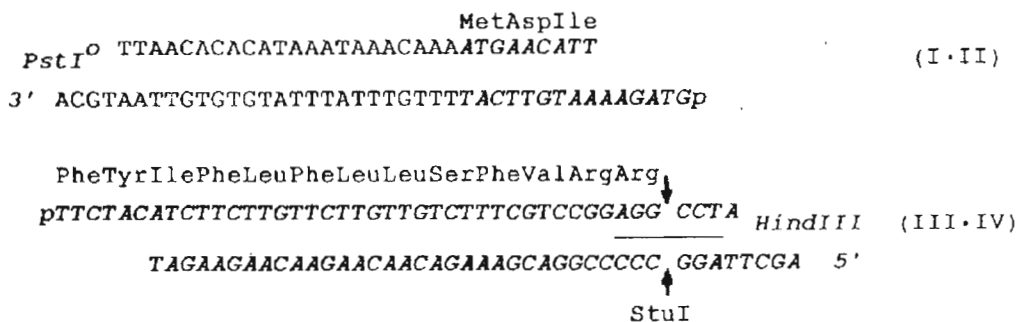


Рис. 1. Олигонуклеотидные дуплексы (I-II) и (III-IV), составляющие синтетический фрагмент. Последовательность нуклеотидов слева от *ATG* восстанавливает 3'-конец промотора гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, справа — кодирует измененный сигнальный пептид киллерного токсина. Подчеркнут участок узнавания и стрелками обозначено место расщепления рестриктазой *Stu*I. Аминокислотная последовательность отвечает гексадекапептиду, удаляемому эндопептидазой *KEX2*. *Pst*I⁰ — выступающий конец для клонирования по *Pst*I-сайту

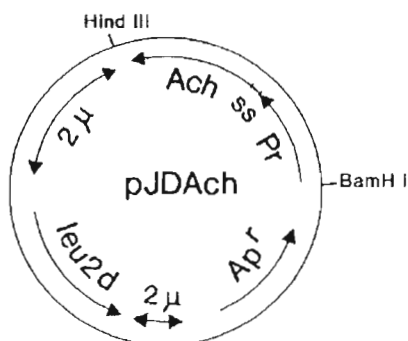


Рис. 2. Экспрессирующий дрожжевой вектор pJDach. Фрагмент гена AChR (Ach) соединен с участком, кодирующим измененный сигнальный пептид киллерного токсина (ss), под контролем промотора гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (Pr). *leu2d* и *2 μ* — элементы, необходимые для репликации вектора и селекции трансформантов в дрожжах

мРНК. Промотор был клонирован в векторе pUC8 и представлял собой фрагмент размером в 650 п. о., у которого отсутствовали 23 нуклеотида, предшествующие иницирующему кодону.

Предполагаемый для экспрессии фрагмент гена α -субъединицы AChR кодирует белок размером 27 кДа, у которого в отличие от α -субъединицы отсутствуют 36 и 168 аминокислот с N- и C-конца соответственно. Ранее было показано [20, 23], что выбор в начале гена наиболее часто встречаемых для дрожжей кодонов, а также замена нетранслируемых участков, фланкирующих ген главным образом с 5'-конца на дрожжевые, позволяют в ряде случаев значительно увеличить экспрессию генов (в 800 раз). Поэтому необходимый для начала трансляции иницирующий и последующие 13 кодонов были выбраны нами как наиболее часто встречаемые у дрожжей и отвечали первым 14 аминокислотам сигнальной последовательности киллерного токсина из дрожжей *Kluyveromyces lactis* [24]. В 15-м и 16-м кодонах, отвечающих двум аргининам, была заложена информация об отделении от фрагмента α -субъединицы AChR N-концевого гексадекапептида с помощью эндопептидазы *KEX2*, расщепляющей аминокислотные цепи после двух основных аминокислот. Последовательность нуклеотидов 16-го и 17-го кодонов отвечает участку узнавания рестриктазы *Stu*I (расщепляет ДНК с об-

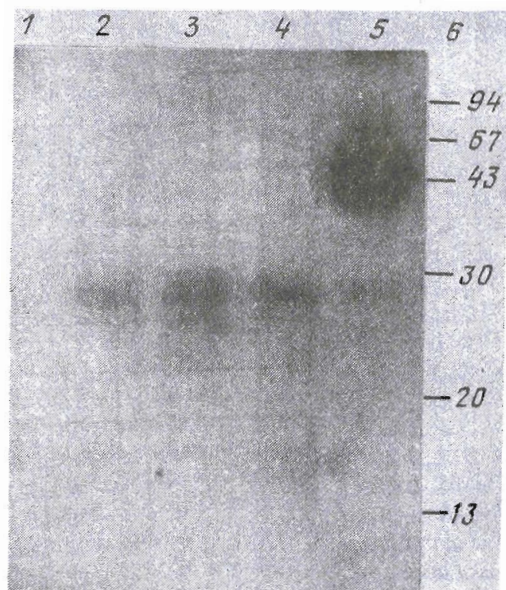


Рис. 3. Блот белкового электрофореза (13% ПААГ) дрожжевых клеточных лизатов (пробы получены из 0,3 мл клеточной суспензии с A_{600} 1,5). Выявление фрагмента α -субъединицы AChR проводили [125 I]- α -бунгаротоксином. 2—4 — лизаты клонов штамма DC5, трансформированного вектором pJDAch, 1 — контроль (лизат штамма DC5, трансформированного экспрессирующим вектором, содержащим вместо фрагмента гена α -субъединицы AChR другой ген), 5 — α -субъединица AChR (10 мкг), 6 — положение в геле белковых стандартов с указанными молекулярными массами (кДа)

разованием тупых концов), что существенно упрощает стыковку с аналогичным концом фрагмента гена α -субъединицы AChR (*PvuII*-сайт). Синтетический фрагмент, содержащий недостающий 3'-конец промотора и кодирующий измененный сигнальный пептид, получен лигированием олигонуклеотидных дуплексов (I·II) и (III·IV) (рис. 1) и далее встроен по *PstI*- и *HindIII*-сайтам за неполным промотором, клонированным в pUC8.

За реконструированным таким образом промотором и сигнальным пептидом был клонирован по *StuI*- и *HindIII*-сайтам фрагмент гена α -субъединицы AChR (размером около 800 п. о.). Его получали расщеплением плазмиды, содержащей фрагмент кДНК гена α -субъединицы AChR размером около 1050 п. о., рестриктазами *PvuII*- и *HindIII* (плазмида была любезно предоставлена д-ром А. Винсент, Институт молекулярной медицины, Оксфорд).

Правильность стыковки 3'-конца синтетического дуплекса и 5'-конца фрагмента гена доказана секвенированием методом Сэнгера [25]. Секвенирующим праймером служил 31-звенный олигонуклеотид I, использованный при реконструировании промотора. Сигналы, необходимые для терминации трансляции, были получены клонированием самокомплементарного олигонуклеотида, содержащего стоп-кодона в различных рамках считывания, по участку расщепления (координата соответствует 807-му нуклеотиду от начала гена) рестриктазой *Eco47III*. Таким образом, в экспрессирующей кассете под контролем реконструированного промотора гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы находится участок, кодирующий измененный сигнальный пептид киллерного токсина из *Kluyveromyces lactis*, соединенный в правильной рамке считывания с фрагментом гена α -субъединицы AChR (109—807 п. о.).

Экспрессирующий вектор pJDAch, изображенный на рис. 2, был получен переносом кассеты в эписомальную дрожжевую плазмиду pJDB207 [26] по участкам расщепления рестриктазами *BamHI* и *HindIII*. Терминация транскрипции мРНК фрагмента α -субъединицы AChR происходит на соответствующих участках, расположенных вблизи от *HindIII*-сайта 2-микронной ДНК [27].

Полученная конструкция была использована для трансформации дрожжевого штамма, дефектного по гену *leu2* (DC5). Некоторые из клонов, отобранных на агаровых чашках с минимальной средой и проанализированных на наличие в

них экспрессирующего вектора [28], выращивали на синтетической минимальной среде SD [29], разрушали интенсивным перемешиванием со стеклянными шариками [12] и лизат подвергали электрофорезу по Лэммли [30] в 12—15% полиакриламидных гелях в присутствии 0,1% SDS. Разделенные белки переносили на нитроцеллюлозные фильтры методом полусухого электроблоттинга; выявление фрагмента α -субъединицы AChR проводили с помощью [125 I]- α -бунгаротоксина [31]. Как видно на рис. 3, в пробах 2—4 наряду с белком ожидаемых размеров (27 кДа) присутствует в значительно больших количествах менее подвижный продукт (29 кДа). Следует отметить, что при экспрессии гена полноразмерной α -субъединицы AChR наблюдалось образование двух продуктов, причем основной, менее подвижный белок, как показали авторы, представлял собой N-гликозилированную форму [11, 12]. Вероятно, фрагмент α -субъединицы AChR также подвергается N-гликозилированию. Проведенные эксперименты по определению вне- и внутриклеточного местоположения экспрессируемого дрожжевыми клетками фрагмента α -субъединицы AChR показали, что он, как и в случае целой α -субъединицы, является мембранным белком [11, 12]. Это может существенно облегчить планируемое выделение белка и получение его в достаточных количествах.

Авторы выражают благодарность В. А. Ефимову за химический синтез олигонуклеотидов, Т. А. Алексееву за выявление экспрессируемого белка с помощью [125 I]- α -бунгаротоксина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hucho F.//Eur. J. Biochem. 1986. V. 158. № 2. P. 211—226.
2. Changeux J.-P.//Trends Pharm. Sci. 1990. V. 11. № 12. P. 485—492.
3. Karlin A.//Harvey Lect. 1991. V. 85. P. 71—107.
4. Pedersen S. E., Cohen J. B.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. № 7. P. 2785—2789.
5. Krienkamp H.-J., Utkin Yu. N., Weise C., Machold J., Tsetlin V. I., Hucho F.//Biochemistry. 1992. V. 31. № 35. P. 8239—8244.
6. Gershoni J. M., Hawrot E., Lentz T. L.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1983. V. 80. № 16. P. 4973—4977.
7. Neumann D., Barchan D., Fridkin M., Fuchs S.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. № 23. P. 9250—9253.
8. Chaturvedi V., Donnelly-Roberts D. L., Lentz T. L.//Biochemistry. 1992. V. 31. № 5. P. 1370—1375.
9. Barkas T., Mauron A., Roth B., Alliod C., Tzartos S. J., Ballivet M.//Science. 1987. V. 235. № 4784. P. 73—76.
10. Talib S., Leiby K. R., Wright K., Okarma T. B.//Gene. 1991. V. 98. № 2. P. 289—293.
11. Fujita N., Nelson N., Fox T. D., Claudio T., Lindstrom J., Riezman H., Hess G. P.//Science. 1986. V. 231. № 4743. P. 1284—1287.
12. Yellen G., Migeon C. J.//Gene. 1990. V. 86. № 2. P. 145—152.
13. Horwitz A. H., Chang C. P., Better M., Hellstrom K. E., Robinson R. R.//Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. № 22. P. 8678—8682.
14. Ernst J. F.//DNA. 1988. V. 7. № 5. P. 355—360.
15. Wagenbach M., O'Rourke K., Vitez L., Wieczorek A., Hoffman S., Durfee S., Tedesco J., Stetler G.//Biotechnology. 1991. V. 9. № 1. P. 57—61.
16. Blechl A. E., Thrasher K. S., Vensel W. H., Greene F. C.//Gene. 1992. V. 116. № 2. P. 119—127.
17. Nishizawa M., Ozawa F., Higashizaki T., Hirai K., Hishinuma F.//Appl. Microbiol. Biotechnol. 1993. V. 38. № 5. P. 624—630.
18. Price V., Mochizuki D., March C. J., Cosman D., Deeley M. C., Klinke R., Clevenger W., Gillis S., Baker P., Urdal D.//Gene. 1987. V. 55. № 2—3. P. 287—293.
19. Couzens L. S., Shuster J. R., Gallegos C., Ku L., Stempien M. M., Urdea M. S., Sanchez-Pescador R., Taylor A., Tekamp-Olson P.//Gene. 1987. V. 61. № 3. P. 265—275.
20. Kniskern P. J., Hagopian A., Montgomery D., Burke P., Dunn N. R., Hofmann K. J., Miller W. J., Ellis R. W.//Gene. 1986. V. 46. № 1. P. 135—141.

21. Loison G., Vidal A., Findell A., Roitsch C., Balloul J. M., Lemoine Y.//Yeast. 1989. V. 5. № 6. P. 497—507.
22. Holland J. P., Holland M. P.//J. Biol. Chem. 1979. V. 254. № 19. P. 9839—9845.
23. Bitter G. A., Egan K. M.//Gene. 1984. V. 32. № 3. P. 263—274.
24. Stark M. J. R., Mileham A. J., Romanos M. A., Boyd A.//Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. № 15. P. 6011—6030.
25. Sanger F., Coulson A. R., Barell B. R., Smith A. J. M., Poe B.//J. Mol. Biol. 1980. V. 143. № 2. P. 161—178.
26. Beggs J. D.//Molecular Genetics in Yeast/Eds von Wettstein D., Friis J., Kielland-Bradt M., Staderup A. Alfred Benzon Symposium. V. 16. Munksgaard, Copenhagen, 1981. P. 383—390.
27. Sutton A., Broach J. R.//Mol. Cell. Biol. 1985. V. 5. № 6—7. P. 2770—2780.
28. Hoffman C. S., Winston F.//Gene. 1987. V. 57. № 2—3. P. 267—272.
29. Sherman F., Fink G. R., Hicks J. B.//Methods in Yeast Genetics. N. Y.: Cold Spring Harbor, 1981. P. 62.
30. Laemmly U. K.//Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680—685.
31. Bossy B., Ballivet M., Spierer P.//EMBO J. 1988. V. 7. № 3. P. 611—618.

Поступило в редакцию
15.XII.1993

*O. V. Telyakova, Yu. N. Utkin, V. I. Tsetlin,
I. V. Severtsova, N. M. Zvonok*

**EXPRESSION OF A FRAGMENT OF THE *Torpedo californica*
ACETYLCHOLINE RECEPTOR α -SUBUNIT GENE
IN *Saccharomyces cerevisiae***

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

A fragment of the AChR α -subunit gene from *Torpedo californica* (about 800 bp) was joined in frame with a synthetic duplex, coding for a changed leader peptide of the *Kluyveromyces lactis* killer toxin under the control of the reconstructed glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene promoter in the pUC8 vector. Translation termination codons in all frames were inserted as a part of a self-complementary oligodeoxynucleotide to the *Eco47III* site (807 bp from the start of the gene). Vector pJDach was constructed by cloning the expression cassette between the *Bam*HI and *Hind*III sites in the multicopy yeast plasmid pJDB207. Yeast cells harbouring the pJDach vector produced mainly an N-glycosylated fragment of the acetylcholine receptor α -subunit, detected by means of [¹²⁵I]- α -bungarotoxin. The fragment's location in the membrane fraction after disruption of the yeast cells simplified its isolation.