



УДК 577.214.622

ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ ВЕКТОРЫ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИЕ СИНТЕЗ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ В ВИДЕ ГИБРИДОВ С МЕТАЛЛСВЯЗЫВАЮЩИМИ ПЕПТИДАМИ

© 1995 г. В. А. Ефимов*, А. Ф. Фрадков, А. Л. Калинкина, О. Г. Чахмахчева

*Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
Москва, 117871, ул. Миклухо-Маклая, 16/10*

Поступила в редакцию 01.03.94 г.

Сконструированы плазмидные векторы, обеспечивающие высокий уровень экспрессии в клетках *E. coli* генов гетерологичных полипептидов и белков в составе гибридов с пептидами, содержащими гомогистидиновый кластер. С помощью полученных векторов осуществлена экспрессия генов стрептавидина, проинсулина и кальцитонина. Для выделения гибридных белков использована аффинная хроматография на колонках с никель-агарозой.

Ключевые слова: рекомбинантные полипептиды, гибридные белки, металлсвязывающие пептиды, аффинная хроматография.

Появившееся в последние годы новое направление физико-химической биологии – белковая инженерия, с одной стороны, помогает решить вопросы структурно-функциональных отношений в белках и нуклеиновых кислотах, а с другой – предоставляет возможности для производства больших количеств ценных с практической точки зрения пептидов и белков с помощью микробиологического синтеза. Характерным примером практической белковой инженерии является получение нестабильных в бактериях гетерологичных полипептидов и белков в виде стабильных гибридов с бактериальными белками, их фрагментами или короткими гомопептидами [1]. Достоинство такого метода заключается в том, что эффективность биосинтеза целевого белкового продукта определяется областью инициации трансляции бактериального гена, в структурную часть которого встраивается чужеродный фрагмент ДНК, а стабильность гибридного белка достигается либо за счет его способности образовывать в цитоплазме клеток нерастворимые тела включения, либо за счет секреции в периплазматическое пространство клетки или культуральную среду, что обеспечивается сигнальными последовательностями лидеров. При этом практическая ценность соответствующего штамма-продуцента зависит от ряда факторов, главными из которых являются его высокая продуктивность, а также технологичность процесса выделения и очистки

целевого продукта. Оба эти фактора в большой степени определяются конструкцией введенного в бактериальные клетки экспрессирующего вектора, несущего ген целевого белка. Поэтому создание новых векторных систем, удобных для клонирования и экспрессии генов, является одним из основных направлений в современной генетической инженерии.

Ранее с применением синтетических олиго- и полинуклеотидов нами была получена серия плазмид для клонирования фрагментов ДНК [2], а также ряд векторов для оценки силы промоторов [3] и экспрессии в бактериальных клетках генов небольших белков [4]. В частности, была изучена экспрессия в *E. coli* проинсулина человека – биосинтетического предшественника гормона инсулина. Инсулин и кальцитонин – гормональный биорегулятор обмена кальция и фосфора в организме – являются примерами белков, возрастающее значение которых для медицинской практики ставит на повестку дня проблему разработки и освоения новых методов их получения микробиологическим путем [5, 6]. На основе синтетического гена проинсулина нами был сконструирован ряд рекомбинантных плазмид, предусматривающих как прямую его экспрессию, так и получение прогормона в составе гибридных белков, а также разработаны схемы выделения этого полипептида из биомассы [7].

Настоящее сообщение посвящено конструированию новой серии плазмид, предназначенных для получения в клетках *E. coli* гетерологичных пептидов и белков в виде не существующих в природе химерных белков, очистка которых возможна

Использованные сокращения: СТ – кальцитонин, PI – проинсулин, Stv – стрептавидин, His – гомогистидиновый пептид, IPTG – изопропил-β-D-тиогалактопиранозид, ПААГ – полнакриламидный гель, SDS – додецилсульфат натрия.

*Автор для переписки.

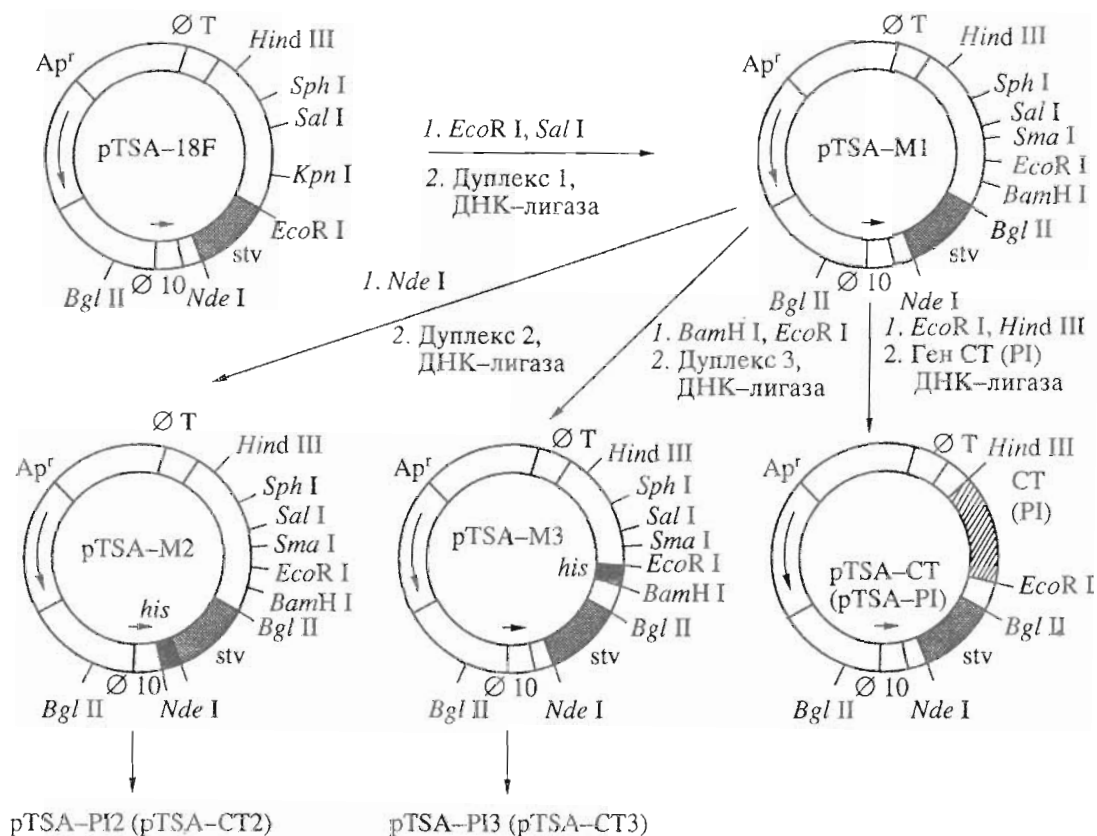


Рис. 1. Схемы конструирования экспрессирующих векторов для получения гибридных белков, содержащих стрептавидин и полигистидиновый домен. Ø10 – промотор гена 10 бактериофага T7, ØT – T7-терминатор, stv – ген стрептавидина, his – фрагмент ДНК, кодирующий гомогистидиновый пептид.

форезом в полиакриламидном геле с последующим иммуноблоттингом, основная часть целевого гибрида не задерживалась на колонке при нанесении – по-видимому, вследствие сохранения комплекса стрептавидина с биотином. Повторная обработка белковой фракции кислым гуанидингидрохлоридом, диализ и хроматография на иминобиотин-агарозе приводили к очистке очередной порции целевого белка, однако полного его выделения из биомассы достичь не удалось. Поэтому для выделения стрептавидина и его гибридных белков с кальцитонином и проинсулином из клеточных экстрактов нами была использована традиционная методика, включающая применение таких процедур, как осаждение, центрифугирование и ультрафильтрация [7].

Свойство химерных белков плохо растворяться в воде и солевых растворах, с одной стороны, позволяет резко повысить их выход в бактериальных клетках и упростить процедуру очистки, а с другой – затрудняет их выделение аффинной хроматографией, поскольку белки способны растворяться только в концентрированных растворах таких денатурирующих агентов, как гуанидингидрохлорид и мочевины.

Дальнейшее развитие исследований привело нас к использованию для очистки гибридных белков металл-хелатной хроматографии, которая получила в последнее время достаточно широкое распространение [15]. Рядом авторов было показано, что после присоединения к стационарной фазе ионы некоторых переходных металлов, в частности никеля, меди и цинка, могут служить аффинными лигандами для хроматографического разделения белков, селективно связывая пептидные домены, обладающие специфической аминокислотной последовательностью, как в неденатурирующих, так и в денатурирующих условиях [16].

С этой целью в вектор pTSA-18FM рядом с геном стрептавидина были введены синтетические фрагменты ДНК (дуплексы 2 и 3, схема), кодирующие короткие гистидинбогатые пептиды. Как было показано ранее, кластер из шести остатков His вполне достаточен для обеспечения прочного связывания содержащего его гибридного белка с закрепленным на матрице никелем [17]. Таким образом были сконструированы векторы pTSA-M2 и pTSA-M3, способные направлять биосинтез стрептавидина в виде гибридов с олигогистидиновым доменом. После введения в эти векторы

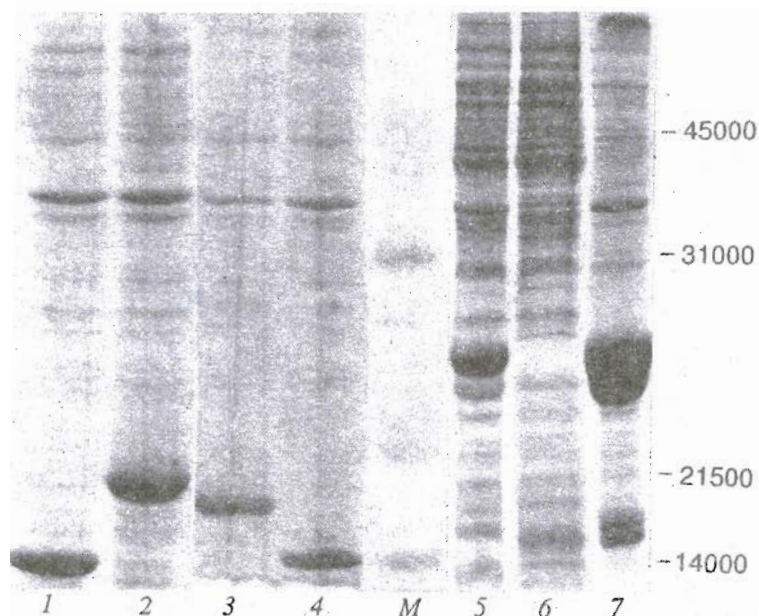


Рис. 2. Анализ суммарной белковой фракции штаммов *E. coli* BL21 (DE3), несущих плазмиды pTSA-M1 (1), pTSA-18F (2), pTSA-CT (3), pTSA-M2 (4), pTSA-PI1 (5), pTSA-PI2 (7) и pBR322 (6) (контроль), электрофорезом в 15% ПААГ с SDS. М – маркеры молекулярной массы.

генов СТ и PI были получены плазмиды pTSA-CT2, pTSA-CT3, pTSA-PI2 и pTSA-PI3. Все они обеспечивали в клетках *E. coli* BL21(DE3) высокий уровень синтеза гибридных белков, обладающих двойной аффинностью – к биотину и металлу (рис. 2 и 3).

Данные химерные белки также образовывали в цитоплазме клеток нерастворимые агрегаты (“тела включения”), накапливающиеся на внутренней стенке мембраны и препятствующие протеиназной деградации белкового продукта, которые после сольюбилизации в 6 М гуанидингидрохлориде легко выделялись металл-хелатной хроматографией на колонках с Ni-агарозой. При этом очистка белка аффинной хроматографией проводилась непосредственно из обогащенных клеточных экстрактов, т.е. химерный белок выделялся в практически чистом виде всего за одну стадию. После отщепления лидерного полипептида последний также отделяется от целевого продукта с помощью металл-хелатной хроматографии (рис. 4а, б). При этом целевой полипептид не задерживается на никельагарозе, а содержащий остатки гистидина лидерный пептид остается на колонке.

Продолжением наших исследований явилось конструирование универсального вектора, способного направлять экспрессию целевых полипептидов в виде гибридных белков, содержащих гистидинбогатые лидеры минимальных размеров, которые обеспечивают аффинное связывание и устойчивость продукта в бактериях. С этой

целью из плазмиды pTSA-18F был убран сайт эндонуклеазы *Bgl*II, а между *Eco*RI- и *Safl*-сайтами введен синтетический дуплекс, представляющий собой полилинкер (рис. 5). Затем из полученной плазмиды pTSA-M4 удалили *Nde*I-*Bgl*II-фрагмент, содержащий ген стрептавидина, и вместо него ввели дуплекс 4, кодирующий полигистидиновую последовательность. Таким образом был сконструирован экспрессирующий вектор pTH1, в котором условия транскрипции гена целевого полипептида, клонированного в полилинкерном участке, создавались за счет T7-промоторной области ϕ 10, а условия трансляции – за счет последовательности, предшествующей гену 10 бактериофага T7, и стартового триплета, входящего в состав фрагмента ДНК, кодирующего полигистидиновый лидерный пептид. Введение в последний вектор генов СТ и PI привело к получению плазмид pTH-CT и pTH-PI, направляющих в клетках *E. coli* BL21 (DE3) синтез химерных белков СТ и PI с N-концевым пептидом, состоящим из 16 а. о., шесть из которых представляли собой His.

Уровень биосинтеза химерных белков, обеспечиваемый этими плазмидами, определялся с помощью радиоиммунологического анализа. Идентификация целевых белков в клеточных экстрактах проводилась с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия с последующим иммуноблоттингом. При этом в штаммах, несущих плазмиды pTH-PI1 и pTH-PI2, наблюдался высокий уровень синтеза (до 25 - 30% от общего количества белка в клетке) гибрида His-PI, который

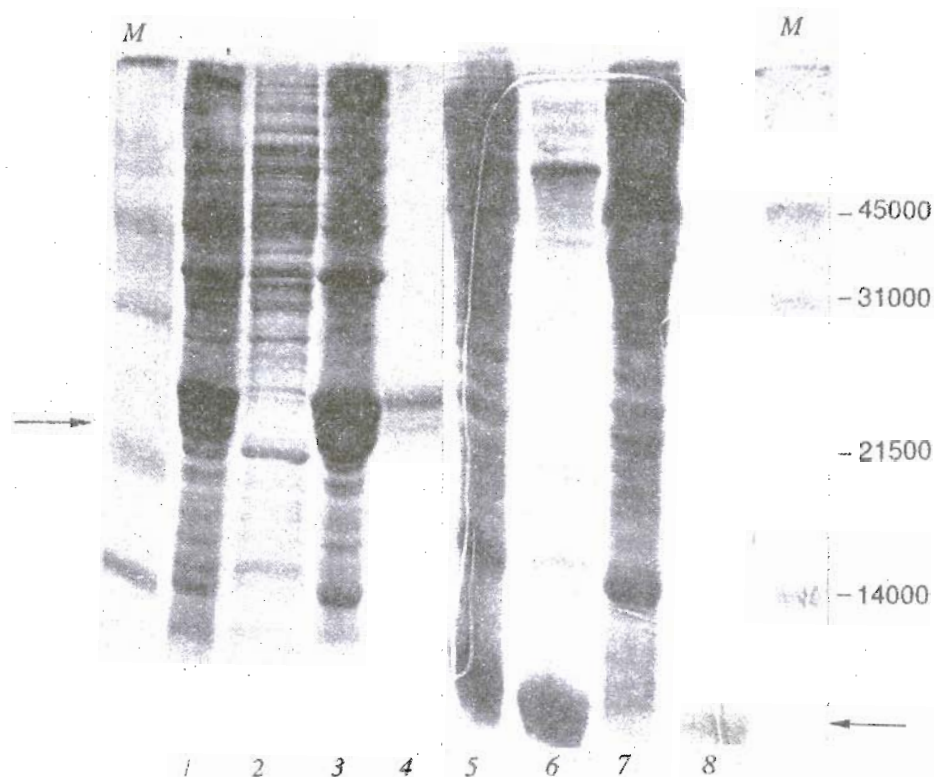


Рис. 3. Электрофорез в 15% ПААГ с SDS белковых фракций, выделенных из клеток *E. coli* BL21(DE3), трансформированных рекомбинантными плазмидами рTSA-PI3 (1 - 4) и рТН-PI1 (5 - 8): 1, 5 – суммарная фракция клеточных белков; 2, 6 – фракция растворимых клеточных белков; 3, 7 – фракция нерастворимых клеточных белков; 4, 8 – целевой гибридный белок после очистки хроматографией на Ni-NTA-агарозе. Стрелками показаны полосы, соответствующие целевым гибридным белкам.

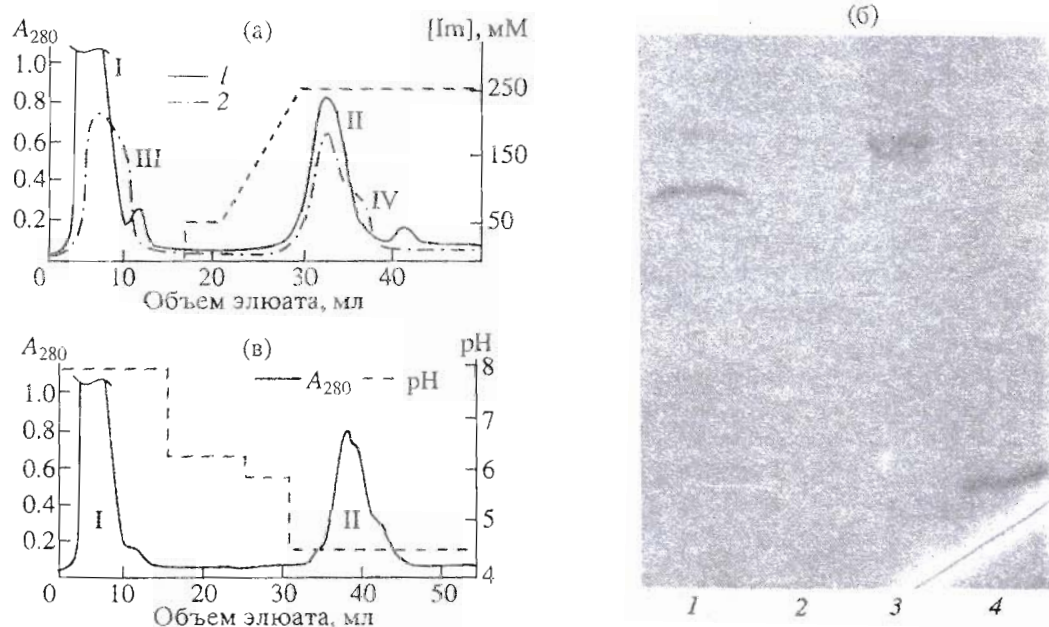


Рис. 4. Очистка гибридных белков металл-аффинной хроматографией на колонке с Ni-NTA-агарозой (2 мл). а – выделение His-Stv-СТ (I, пик II) и СТ (2, пик III) после отщепления лидерного пептида (пик IV) с использованием градиента концентрации имидазола в 50 мМ натрий-фосфатном буфере (рН 8,0), содержащем 0,3 М NaCl/10% глицерин/1 М мочевины/5 мМ дитиотреит, пик I содержит белки *E. coli*, не связавшиеся с Ni-агарозой; б – иммуноблоттинг белковых фракций, выделенных металл-аффинной хроматографией (а), с использованием антител к кальцитонину; 1 – His-Stv (пик IV), 2 – бактериальные белки (пик I), 3 – His-Stv-СТ (пик II), 4 – СТ (пик III); в – очистка His-PI (пик II) с использованием градиента рН в 8 М мочевины (0,1 М фосфат натрия/0,01 М трис/5 мМ дитиотреит). Скорость элюции 1 мл/мин. Пик I содержит белки *E. coli*, не связавшиеся с Ni-агарозой.

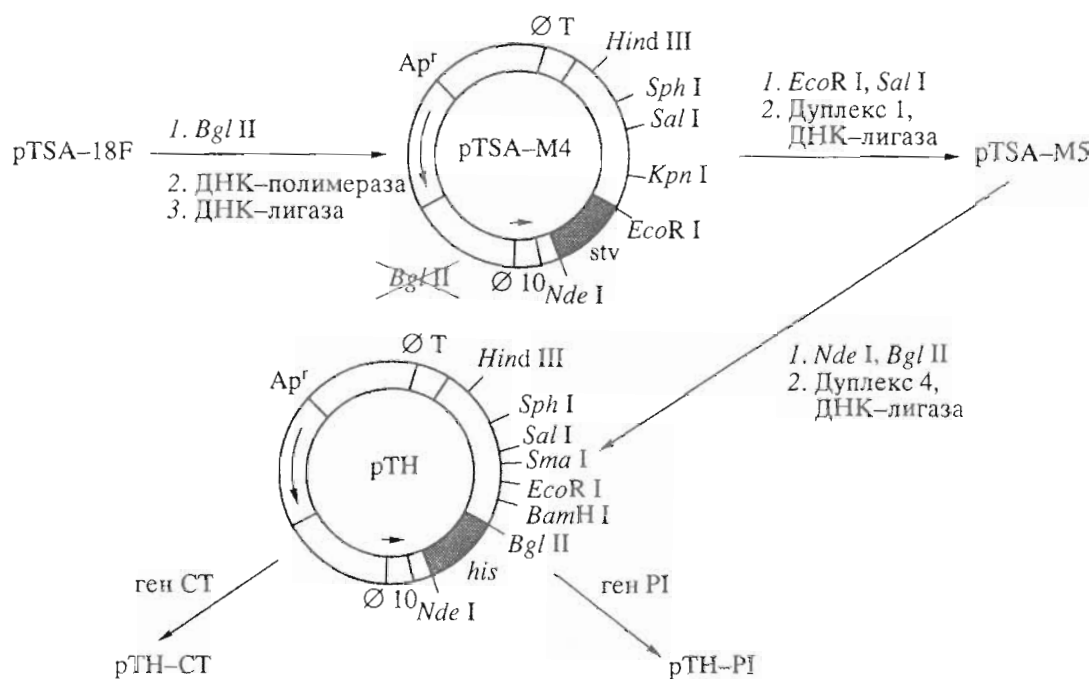


Рис. 5. Схема конструирования экспрессирующих векторов для получения гибридных белков с коротким пептидом, содержащим гомогистидиновый кластер.

накапливался в цитоплазме клеток в виде нерастворимых агрегатов ("тел включения") (рис. 3). Выход же гибридного белка His-CT оказался практически в 10 раз ниже как выхода аналогичного гибрида с проинсулином, так и выхода гибридов со стрептавидином (Stv-CT и His-Stv-CT), что, по-видимому, связано с чрезвычайной нестабильностью кальцитонина в бактериальных клетках [6].

Выделение гибридных белков His-PI и His-Stv также проводилось хроматографией на никель-агарозе (рис. 4в). После отделения лидерных полипептидов целевые продукты очищались и ренатурировались [5, 12, 18].

Следует отметить, что применение аффинной хроматографии для очистки рекомбинантных белков обычно предполагает введение в один из концов целевого полипептида относительно большого домена белка, обеспечивающего аффинное связывание с соответствующим сорбентом. В то же время с технологической точки зрения желательнее максимально уменьшить размеры подобного домена, поскольку при этом должна увеличиваться доля целевого полипептида в гибридном белке, а следовательно, и производительность штамма. Однако при сильном сокращении размеров лидера может исчезнуть основное свойство, придающее гибридным белкам существенное преимущество перед прямой экспрессией, — устойчивость гибридов к действию внутриклеточных протеиназ. Ранее было показано, что, изменяя первичную структуру короткого

лидера, можно значительно снизить растворимость гибридного белка в цитоплазме клеток, а следовательно, увеличить его устойчивость к протеиназам [1]. Одним из примеров является введение poly(Thr)-последовательности в N-конец проинсулина, что позволило сократить длину лидера до 20 - 25 а. о. при сохранении высокого выхода и нерастворимости соответствующего гибридного белка в цитоплазме [7]. Как показали наши эксперименты, и это согласуется с данными других авторов [17], использование полигистидиновых кластеров в ряде случаев дает аналогичные результаты, хотя, как показывает пример кальцитонина, и не всегда. Это создает предпосылки для повышения технологичности бактериальных штаммов-продуцентов полипептидов типа проинсулина и стрептавидина в составе гибридных белков за счет максимально возможного уменьшения размеров лидерной части, предусматривающей использование аффинной хроматографии для выделения целевого продукта.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы эндонуклеазы рестрикции, T4-ДНК-лигаза, T4-полинуклеотидкиназа и ДНК-полимераза *E. coli* (фрагмент Кленова) фирмы Pharmacia (Швеция). Ферментативные реакции проводили как описано ранее [5, 13, 14].

Химический синтез олигонуклеотидов осуществляли фосфоамидитным методом [19] на синтезаторе 381А фирмы Applied Biosystems (США).

Конструирование рекомбинантных плазмид и трансформацию компетентных клеток *E. coli*, а также скрининг колоний гибридизацией с мечеными синтетическими олигонуклеотидами, выделение плазмид и секвенирование фрагментов ДНК осуществляли согласно работам [2 - 4].

Электрофорез белков и полипептидов в пластинах ПААГ, содержащего SDS, а также окрашивание белковых зон кумасси R-250 и иммуноблоттинг проводили как описано в работе [5]. Количество целевого белка в клетках *E. coli* оценивали (после разделения суммарной белковой фракции гель-электрофорезом) сканированием пластин, окрашенных кумасси, на приборе Ultrosan (LKB, Швеция).

Иммуоферментный анализ на наличие рекомбинантных СТ и Р1 и иммуноблоттинг проводили с использованием кроличьих антител к кальцитонину и инсулину человека (Amersham, США) по стандартной методике [5].

Выращивание биомассы *E. coli* BL21 (DE3), содержащей экспрессирующие векторы, проводили на LB-среде с 50 мкг/мл ампициллина. Культуру выращивали при 37°C в течение нескольких часов до плотности 1.0 при 600 нм, затем прибавляли индуктор *lac*-оперона IPTG до концентрации 1 мМ и инкубацию продолжали еще 5 - 6 ч. Клетки осаждали центрифугированием и хранили при -70°C. Выделение "тел включения" (фракция, содержащая целевые гибридные белки) из биомассы *E. coli* проводили до стадии растворения клеточного дебриса в 6 М гуанидингидрохлориде (2.5 мл на биомассу, выделенную из 100 мл культуры) в основном как описано в работе [5].

Для выделения гибридных белков, содержащих стрептавидин, последний раствор осветляли центрифугированием при 12000 об/мин в течение 15 мин, дебрис отбрасывали, а рН супернатанта доводили до 1.5. Диализ и хроматографию на 2-иминобутирин-агарозе (Pharmacia-LKB, Швеция) проводили как описано в работе [12].

Для выделения гибридных белков, содержащих гистидиновые кластеры, фракцию клеточных белков, содержащуюся в 6 М гуанидингидрохлориде (50 мМ Na-фосфат/50 мМ NaCl/5 мМ дитиотреит, рН 8.0), помещали на колонку с Ni-NTA-агарозой (Diagen, ФРГ). Хроматографию и последующий диализ проводили по прилагаемой инструкции, используя 2 мл сорбента на количество белка, выделенного из 100 мл бактериальной культуры (рис. 3). Фракции анализировали электрофорезом в ПААГ и иммуоферментным анализом. Фракции, содержащие целевые белки, объединяли и диализовали.

Проинсулин и кальцитонин из гибридных белков после отщепления лидерного полипептида и рефолдинга выделяли как описано ранее [5, 18]. Расщепление гибридных белков бромцеллавым

(50 моль/моль остатков метионина) проводили в 70% муравьиной кислоте в течение 24 ч при комнатной температуре. Реакцию останавливали прибавлением воды с последующей лиофилизацией раствора.

Авторы признательны Ч.Р. Кантору (США) за предоставление плазмиды pTSA-18F, а также А.А. Буряковой и А.Б. Раскинду за участие на отдельных стадиях эксперимента.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fisher B., Summer I., Goodenough P. // *Biotechnol. and Bioeng.* 1993. V. 41. № 1. P. 3 - 13.
2. Чахмахчева О.Г., Бурякова А.А., Мирских О.В., Ревердатто С.В., Ефимов В.А., Овчинников Ю.А. // *Биоорган. химия.* 1985. Т. 11. № 11. С. 1533 - 1546.
3. Ефимов В.А., Мирских О.В., Бурякова А.А., Пашкова И.Н., Полушин Н.Н., Чахмахчева О.Г. // *Биоорган. химия.* 1989. Т. 15. № 1. С. 90 - 103.
4. Чахмахчева О.Г., Мирских О.В., Чьонг Нам Хай, Ефимов В.А. // *Биоорган. химия.* 1987. Т. 13. № 3. С. 350 - 358.
5. Chan S.G., Weiss J., Konrad M., White T., Bahl C., Yu S.-D., Marks D., Steiner D.F. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1981. V. 78. № 9. P. 5401 - 5409.
6. Alexiev K., Uscheva A., Ivanov I. // *Curr. Microbiol.* 1989. V. 18. № 1. P. 5 - 9.
7. Ефимов В.А., Алексюк И.В., Бурякова А.А., Пашкова И.Н., Скиба Н.П., Чахмахчева О.Г. // *Биоорган. химия.* 1989. Т. 15. № 8. С. 1078 - 1090.
8. Narayanan S.R., Crane L.J. // *TIBTECH.* 1990. V. 8. № 1. P. 12 - 16.
9. Ефимов В.А., Бурякова А.А., Полушин Н.Н., Пашкова И.Н., Дмитрикова Е.В., Чахмахчева О.Г. // *Биоорган. химия.* 1989. Т. 15. № 4. С. 499 - 507.
10. Чахмахчева О.Г., Фоти Д., Пашкова И.Н., Полушин Н.Н., Ефимов В.А. // *Биоорган. химия.* 1992. Т. 18. № 8. С. 1098 - 1103.
11. Ефимов В.А., Аронова Е.А., Бурякова А.А., Калинин А.Л., Летунова А.Б., Фрадков А.Ф., Чахмахчева О.Г. // *Биоорган. химия.* 1994. Т. 20. № 7. С. 759 - 771.
12. Sano T., Cantor C.R. // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1991. V. 176. № 2. P. 571 - 577.
13. Ефимов В.А., Бурякова А.А., Пашкова И.Н., Полушин Н.Н., Чахмахчева О.Г. // *Биоорган. химия.* 1989. Т. 15. № 8. С. 1070 - 1077.
14. Ovchinnikov Yu.A., Efimov V.A., Ivanova I.N., Reverdatto S.V., Skiba N.P., Chakhmakheva O.G. // *Gene.* 1984. V. 31. № 1. P. 65 - 78.
15. Beitle R.R., Ataii M.M. // *Biotechnol. Prog.* 1993. V. 9. № 1. P. 64 - 69.
16. Smith M.C., Furman T.C., Ingolia T.D., Pitgeon C. // *J. Biol. Chem.* 1988. V. 263. № 15. P. 7211 - 7215.
17. Van Dyke M.W., Sirito M., Sawadogo M. // *Gene.* 1992. V. 111. № 1. P. 99 - 104.
18. Алексюк И.В., Клименко А.С., Ефимов В.А. // *Биоорган. химия.* 1990. Т. 16. № 12. С. 1683 - 1686.
19. McBride L.J., Kiczek A., Beausage S.L., Caruthers M.J. // *J. Am. Chem. Soc.* 1986. V. 108. № 3. P. 2040 - 2048.

Expression Vectors Providing Hybrid Proteins Synthesis as Fusions with Metal-Chelating Peptides

V. A. Efimov*, A. F. Fradkov, A. L. Kalinkina, and O. G. Chakhmakhcheva

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117871 Russia*

Abstract – Plasmid vectors providing a high level expression in *Escherichia coli* cells of genes for heterologous polypeptides and proteins fused to peptides containing homohistidine clusters have been constructed. The obtained vectors have been used to achieve expression of genes for streptavidin, proinsulin and calcitonin. The hybrid proteins were isolated by affinity chromatography on Ni-agarose columns.

Key words: recombinant polypeptides, hybrid proteins, metal-chelating peptides, affinity chromatography.

* To whom correspondence should be addressed.