



УДК 577.214.622

## БИОСИНТЕЗ В БАКТЕРИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ КАЛЬЦИТОНИНА И МИНИ-ПРОИНСУЛИНА ЧЕЛОВЕКА В ВИДЕ ГИБРИДНЫХ БЕЛКОВ С СООТВЕТСТВУЮЩИМИ АНТИСМЫСЛОВЫМИ ПЕПТИДАМИ И МЕТАЛЛСВЯЗЫВАЮЩИМ ПЕПТИДОМ

© 1996 г. В. А. Ефимов<sup>#</sup>, А. А. Бурякова, А. Ф. Фрадков, О. Г. Чахмахчева*Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10*

Поступила в редакцию 29.11.95 г.

В продолжение работ по экспериментальной проверке теории молекулярного узнавания сконструирован ряд плазмид, обеспечивающих высокоэффективный биосинтез в клетках *E. coli* гибридов кальцитонина и мини-проинсулина с соответствующими им антисенс-полипептидами и гистидинбогатый металлсвязывающим пептидом. Разработаны процедуры выделения гибридных рекомбинантных белков с использованием металл-аффинной хроматографии, их расщепления на составляющие полипептидные компоненты и ренатурации.

*Ключевые слова: экспрессия генов, рекомбинантные белки, сенс- и антисенс-пептиды, металл-хелатная хроматография.*

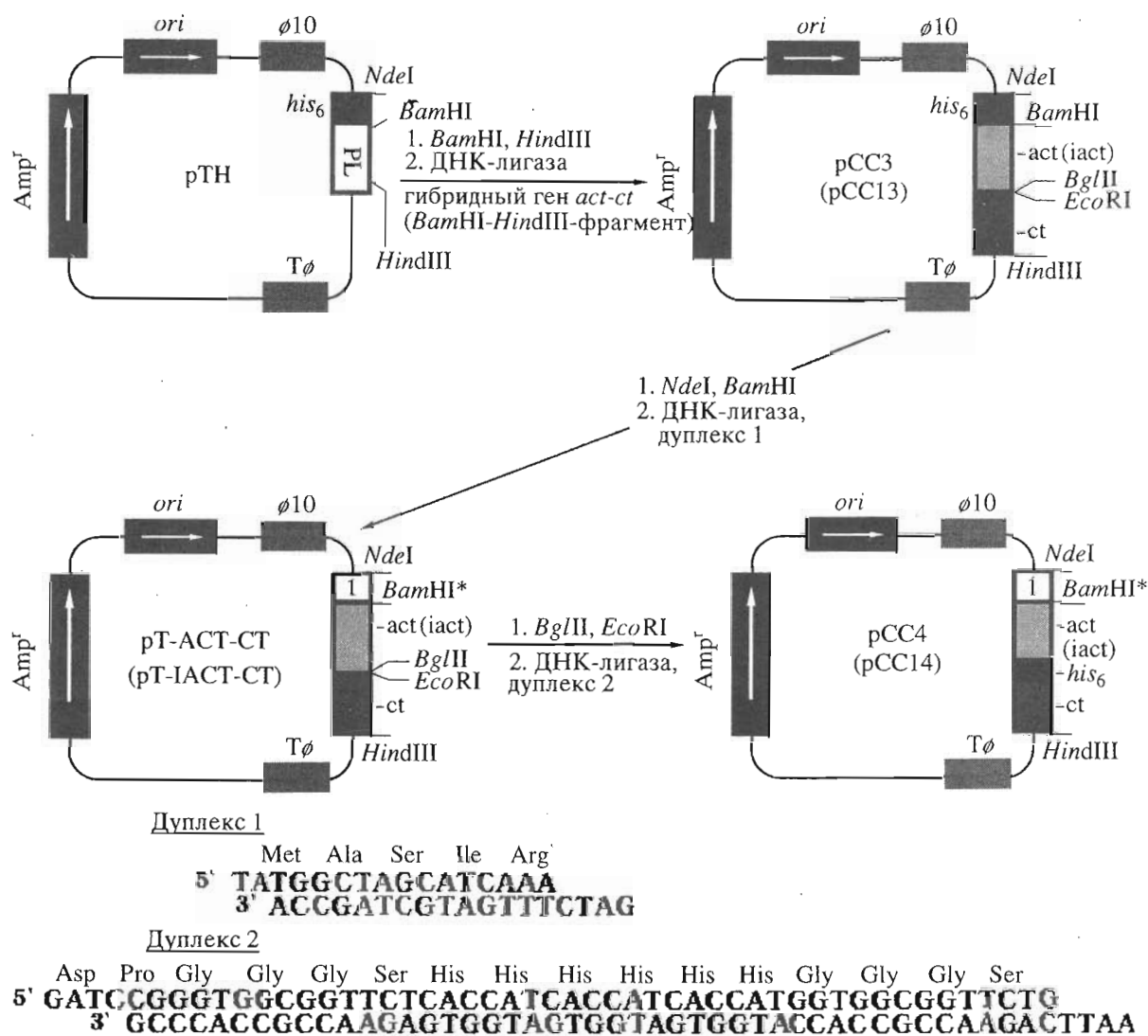
Согласно предложенной ранее теории молекулярного узнавания, пептиды, кодируемые комплементарными последовательностями нуклеиновых кислот в той же рамке считывания (так называемые сенс- и антисенс-пептиды), обладают гидропатической комплементарностью и способны специфически связываться друг с другом [1, 2]. Была выдвинута гипотеза о существовании аминокислотного кода, обуславливающего первичное взаимодействие пептидных цепей при сборке белков и при образовании лиганд-рецепторных комплексов [3]. Предполагается, что код взаимодействия аминокислот как бы продолжает генетический код и составляет его вторую половину, а последовательность антисенс-пептида может быть выведена из последовательности сенс-пептида. В случае правильности теории молекулярного узнавания она может найти широкое практическое применение, в частности для конструирования аналогов природных биорегуляторов, получения специфических аффинных сорбентов и для других целей.

Ранее нами были начаты исследования по экспериментальной проверке этой теории с учетом возможности изучения нековалентного связывания пептидов между собой как на бимолекуляр-

ном уровне, так и на мономолекулярном, когда сенс- и антисенс-последовательности объединены в одну полипептидную цепь. В качестве объектов исследования были выбраны кальцитонин человека и мини-проинсулин. В рамках поставленной задачи нами были осуществлены химико-ферментативный синтез и клонирование гена кальцитонина человека, а также генов антисенс-полипептидов к кальцитонину и мини-проинсулину человека [4]. Было показано, что полученные на основе этих генов рекомбинантные плазмиды способны обеспечивать биосинтез данных полипептидов в клетках *E. coli* в составе гибридных белков с IgG-связывающим доменом белка А стафилококков (SPA). При этом химерные белки SPA с мини-проинсулином, антимино-проинсулином и их гибридом накапливались в клетках *E. coli* в виде нерастворимых тел включения со средним выходом 20–25% от общего количества белка в клетке. Вместе с тем эффективность биосинтеза кальцитонина и соответствующих антисенс-пептидов в виде химер с SPA была значительно более низкой (выход целевого продукта 1–3%), что, по всей видимости, являлось результатом нестабильности кальцитонина и его химерных белков в бактериальной клетке. Подобные трудности с получением кальцитонина микробиологическим синтезом уже отмечались ранее другими исследователями [5]. В то же время уровень экспрессии тройных гибридов SPA-АСТ-СТ был выше и доходил до 10–15% от общего количества клеточного белка [4].

Сокращения: IPTG – изопропил-β-D-тиогаляктопиранозид; SPA – IgG-связывающий домен белка А стафилококков; His<sub>6</sub> – полигистидиновый домен; СТ – кальцитонин; АСТ – антикальцитонин; IАСТ – инвертированный антикальцитонин; МР – мини-проинсулин, АМР – антимино-проинсулин, NTA – нитрилотрикусусная кислота.

<sup>#</sup> Автор для переписки.



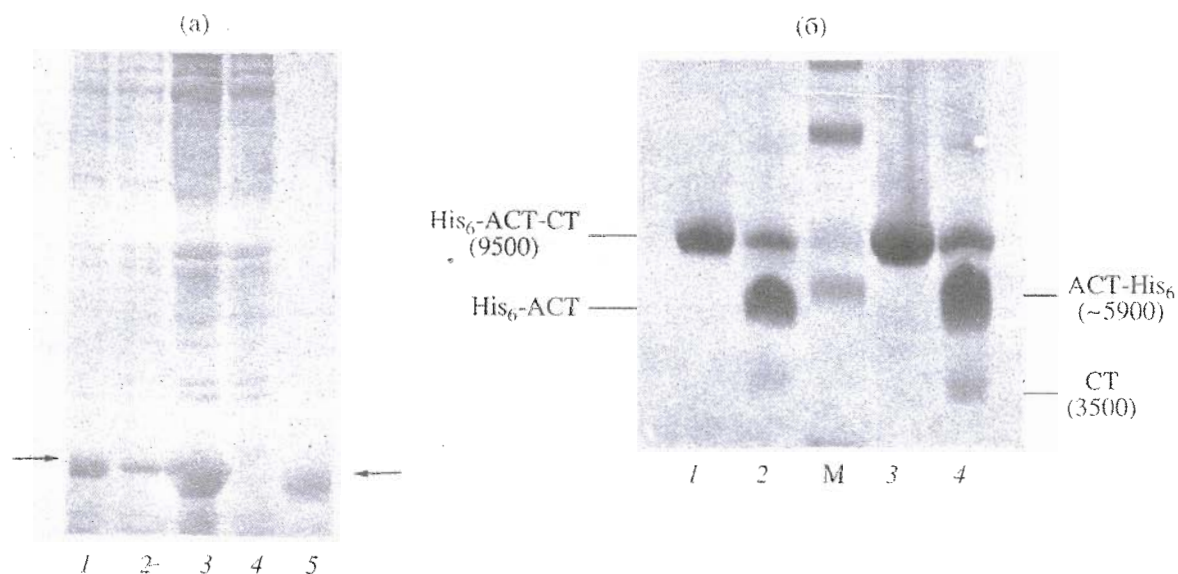
**Рис. 1.** Схема конструирования плазмид pCC3 (pCC13) и pCC4 (pCC14), определяющих биосинтез гибридных белков, состоящих из СТ, АСТ (IACT) и His<sub>6</sub>. PL – полилинкерный участок; φ10 – промотор гена 10 фага T7, Tφ – последовательность, соответствующая терминатору фага T7. В нижней части рисунка приведены последовательности синтетических дуплексов, использованных при конструировании данных плазмидных векторов, и кодируемые ими аминокислотные последовательности.

Впоследствии нам удалось получить штаммы бактерий, обеспечивающие высокий уровень биосинтеза кальцитонина в виде химеры со стрептавидином, однако значительные неудобства при выделении подобных рекомбинантных белков не позволили разработать достаточно простую и технологичную схему его очистки [6]. Более перспективными в этом отношении должны быть гибриды с металлсвязывающими пептидами, поскольку введение полигистидиновых доменов в начало или конец целевого рекомбинантного полипептида в ряде случаев позволяет повысить его устойчивость к внутриклеточным протеиназам, а также значительно упростить процедуру выделения белка из бактериальной массы за счет использования аффинной хроматографии на ко-

лонках с никель-NTA-агарозой [7]. Кроме того, замена большого домена, обеспечивающего аффинное связывание с соответствующим сорбентом, на небольшой пептид позволяет повысить выход целевого полипептида за счет увеличения его доли в химерном белке при том же уровне биосинтеза последнего.

Настоящее сообщение посвящено изучению биосинтеза кальцитонина и мини-проинсулина в комбинации с соответствующими бессмысленными полипептидами в виде гибридных белков с небольшим металлсвязывающим пептидом, содержащим гомогистидиновый кластер.

В основу экспрессирующих векторов, схема конструирования которых показана на рис. 1, была



**Рис. 2.** Электрофоретический анализ белковых фракций: (а) – электрофорез в 15% ПААГ с SDS суммарной фракции белков из клеток *E. coli* BL21(DE3), трансформированных рекомбинантными плазмидами рСС3 (1), рСС13 (2) и рСС4 (3), и клеток контрольного штамма, не содержащего эти плазмиды (4), а также рекомбинантного белка АСТ- $\text{His}_6$ -СТ после очистки хроматографией на никель-агарозе (5). Стрелками показаны полосы, соответствующие целевым гибридным белкам. (б) – электрофорез в 20% ПААГ с SDS очищенных гибридных белков  $\text{His}_6$ -АСТ-СТ (1) и АСТ- $\text{His}_6$ -СТ (3) и соответствующих реакционных смесей после расщепления этих белков бромцианом в течение 10 ч (2, 4). М – маркеры молекулярных масс (сверху вниз: 17000, 14000, 9500, 6000, 2500). Интенсивность окраски соответствующих СТ белковых зон при прокрашивании кумасси значительно слабее, чем полипептидов, содержащих  $\text{His}_6$ -домен, вследствие особенностей первичной структуры СТ. В скобках у символа белка указана его молекулярная масса, вычисленная из его структуры [4].

положена полученная нами ранее универсальная плазмида рТН [6], способная направлять биосинтез целевых рекомбинантных белков в виде гибридов, содержащих на N-конце небольшие гистидинбогатые лидерные пептиды. Гибридный ген *act-ct* выщепляли из ранее полученной нами плазмиды рСС1 [4] действием эндонуклеаз *Vam*III и *Hind*III и вводили в вектор рТН между сайтами тех же рестриктаз с образованием плазмиды рСС3 (рис. 1). Аналогично получали плазмиду рСС13 с геном, кодирующим гибрид IACT-СТ, где IACT представляет собой антисенс-полипептид с инвертированной аминокислотной последовательностью (см. [4]). После введения сконструированных нами векторов рСС3 и рСС13 в клетки *E. coli* BL21(DE3) были получены штаммы-продуценты химерных белков кальцитонина и его антисенс-полипептидов, содержащих на N-конце полигистидиновый домен.

Ранее нами была сконструирована плазмида, обеспечивающая биосинтез кальцитонина в виде химерного белка  $\text{His}_6$ -СТ с полигистидиновым доменом (плазмида рТН-СТ) [6], однако выход белка  $\text{His}_6$ -СТ в клетках *E. coli*, как и в случае вышеупомянутых конструкций с SPA, оказался весьма низким. В то же время векторы рСС3 и рСС13, отличающиеся от плазмиды рТН-СТ наличием гена *act* (или *iact*) между фрагментами ДНК, кодирую-

щими  $\text{His}_6$ -пептид и кальцитонин, обеспечивали в бактериальных клетках высокий уровень биосинтеза соответствующих гибридных белков (рис. 2а). Таким образом, введение в 5'-конец гена кальцитонина последовательности, кодирующей АСТ (или IACT), приводило к резкому повышению выхода целевого продукта  $\text{His}_6$ -АСТ-СТ (или  $\text{His}_6$ -IACT-СТ) по сравнению с  $\text{His}_6$ -СТ, по-видимому, вследствие снижения его протеолитической деградации в клетках *E. coli*. Эти данные аналогичны результатам, полученным при экспрессии этих генов в виде гибридов с геном фрагмента белка А, и свидетельствуют в пользу того, что антисенс-пептиды могут быть полезны для повышения уровня синтеза и стабилизации продуктов гетерологичной экспрессии в бактериальных клетках. Они также могут служить косвенным подтверждением существования взаимодействия между сенс- и антисенс-молекулами.

Другой возможный вариант гибридного белка предусматривает введение полигистидинового домена между сенс- и антисенс-полипептидами. Подобное расположение металлсвязывающего домена позволяет, с одной стороны, увеличить расстояние между сенс- и антисенс-пептидами, что может оказать существенное влияние на эффективность их взаимодействия на мономолекулярном уровне, а с другой – сохранить все преимущества

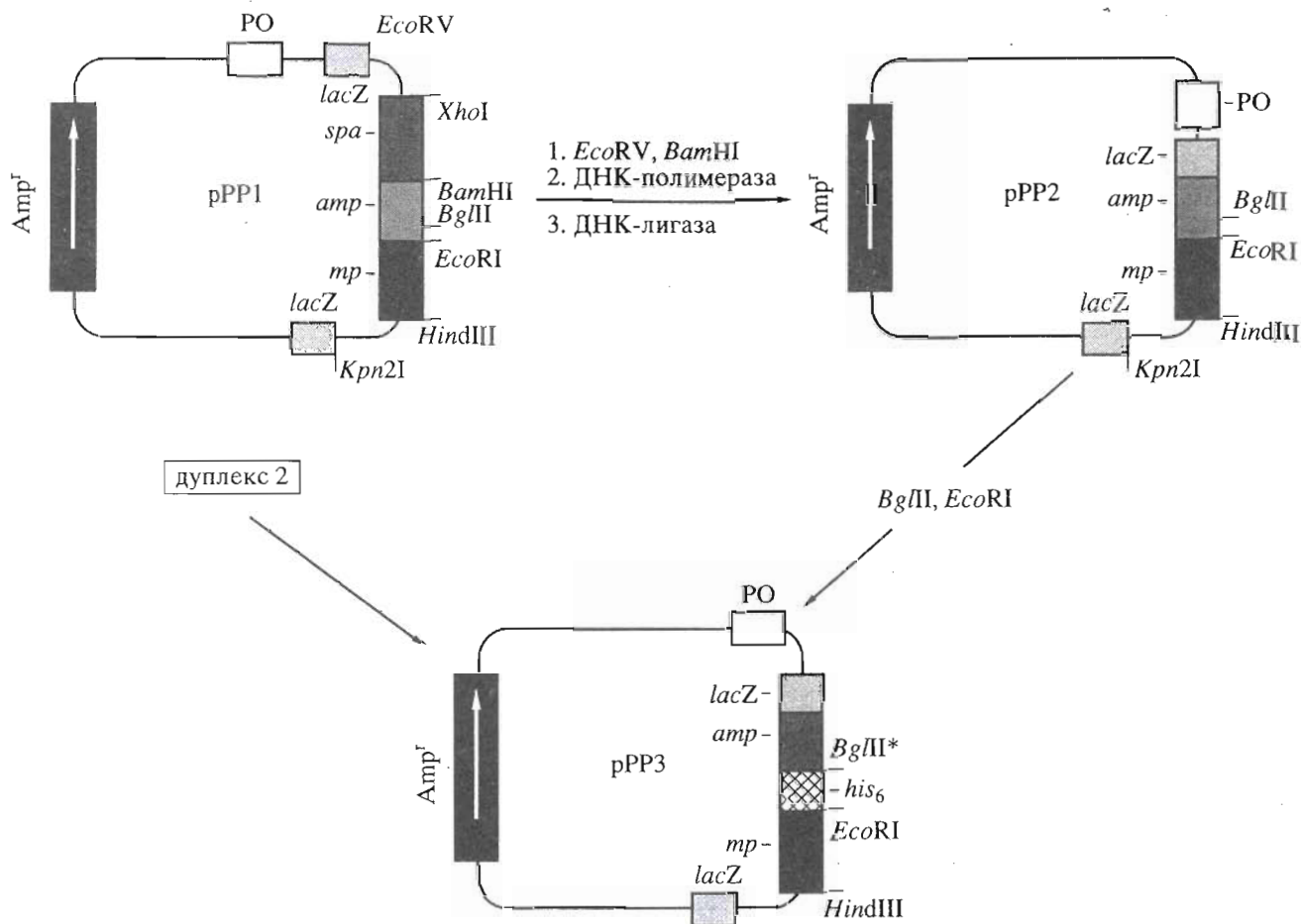


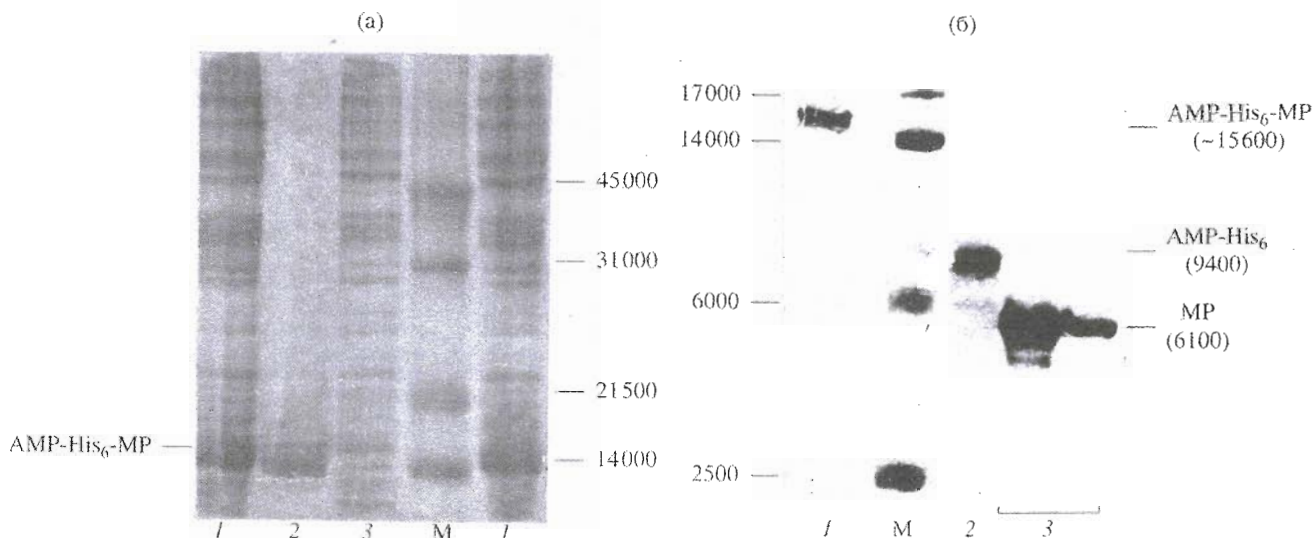
Рис. 3. Схема конструирования экспрессирующей плазмиды рРРЗ, содержащей ген гибридного белка АМР-Нis<sub>6</sub>-МР. РО – *lac*-промотор, *lacZ* – участки гена β-галактозидазы *E. coli*, *spa* – ген IgG-связывающего домена белка А стафилококков.

использования металл-аффинной хроматографии для выделения целевого рекомбинантного белка. С этой целью из плазмиды рССЗ удалили фрагмент ДНК, кодирующий гистидинбогатый домен, и вместо него ввели небольшой дуплекс 1 (рис. 1). Введение этого дуплекса позволило восстановить последовательность, содержащую сайт эндонуклеазы *NdeI* и стартовый кодон, а также убрать сайт эндонуклеазы *BamHI* из начала последовательности гена антикальцитонина. Затем между 5'-концом гена кальцитонина и 3'-концом гена антикальцитонина встроили дуплекс 2, в состав которого входило шесть гистидиновых триплетов (рис. 1). Таким образом были сконструированы плазмиды рСС4 и рСС14.

Нами была также получена плаزمида рРРЗ, определяющая биосинтез гибрида мини-проинсулина и антимино-проинсулина, соединенных полигистидиновым доменом (рис. 3). Для этого плазмиду рРР1 [4] обрабатывали эндонуклеазами *EcoRV* и *BamHI*. Образовавшиеся при этом липкие концы ДНК достраивали (до тупых) ДНК-полимеразой (фрагмент Кленова) и сшивали. Полу-

ченную при этом рекомбинантную ДНК рРР2 расщепляли эндонуклеазами *BglII*–*EcoRI* и вводили в нее синтетический дуплекс 2 (см. рис. 16) с образованием целевой плазмиды рРРЗ. Анализ суммарной белковой фракции, выделенной из клеток *E. coli* НВ101 (или МН1), трансформированных этой плазмидой, показал наличие высокого уровня биосинтеза гибридного белка АМР-Нis<sub>6</sub>-МР (рис. 4).

Целевые рекомбинантные белки обычно находились в клетках *E. coli* в виде нерастворимых тел включения, которые отделяли центрифугированием от растворимых цитоплазматических белков. После солюбилизации в 7 М мочеvine или 6 М гуанидингидрохлориде гибридные белки выделяли за одну стадию хроматографией на колонке с никель-агарозой. Процедура выделения гибридов сенс- и антисенс-полипептидов предусматривала их ренатурацию непосредственно на твердой фазе после удаления с колонки примесей белковой природы, как это было описано нами ранее для некоторых других рекомбинантных белков [6]. Аликвоты элюатов анализировали



**Рис. 4.** Электрофоретический анализ белковых фракций. (а) – электрофорез в 15% ПААГ с SDS белковых фракций при выделении гибрида AMP-His<sub>6</sub>-MP из клеток *E. coli* HB101, трансформированных плазмидой rPP3: 1 – суммарная белковая фракция; 2 – гибридный белок после очистки аффинной хроматографией на никель-агарозе; 3 – фракция белков, не связавшихся с никель-агарозой; (б) – электрофорез в 20% ПААГ/SDS гибридного белка AMP-His<sub>6</sub>-MP (1) и продуктов его расщепления бромцианом – полипептидов AMP-His<sub>6</sub> (2) и MP (3) – после их очистки хроматографией на никель-агарозе. М – маркеры молекулярных масс. Цифры справа (а) и слева (б) – молекулярные массы маркерных белков.

электрофорезом в ПААГ в присутствии SDS с последующим иммуноблоттингом. После элюции с колонки целевые белки были практически сразу готовы к проведению дальнейших физико-химических исследований.

Для выделения сенс-полипептидов MP и СТ их первоначально отщепляли от соответствующих антисенс-пептидов действием BrCN по уникальному остатку Met [4] (рис. 2б и 4б), а затем проводили повторную хроматографию на никель-агарозе в денатурирующих условиях. При этом антисенс-пептид с присоединенным к его N- или C-концу гомогистидиновым кластером задерживался на колонке, а соответствующий сенс-пептид смывался с нее. Для последующего отделения рекомбинантных гибридов кальцитонина и мини-проинсулина с соответствующими антисенс-пептидами от N-концевого гомогистидинового лидера использовали обработку гидроксиламином [8] (схема).

Таким образом, в результате проведенных исследований был получен ряд бактериальных штаммов, способных обеспечивать эффективный биосинтез кальцитонина и мини-проинсулина человека в виде гибридных белков с соответствующими им антисенс-полипептидами и полигистидиновым доменом, а также разработана схема очистки и ренатурации как этих гибридных белков, так и составляющих их полипептидов в растворе и на твердой фазе.

Следует отметить, что никель-NTA-агароза является удобным носителем для изучения взаимодействия закрепленных на ней белков или полипептидов с различными соединениями, в том числе и с белками. Этот сорбент обладает высоким сродством к рекомбинантным белкам, содержащим полигистидиновый кластер, за счет образования стабильного координационного комплекса между остатками гистидина, ионами никеля и NTA на полимере. Рекомбинантный белок, содержащий His<sub>6</sub>-последовательность, удерживается на таком носителе достаточно прочно при нейтральных и слегка щелочных pH и удаляется с него только при pH < 4.5. При этом возможна ренатурация белков в иммобилизованном состоянии. Сродство His<sub>6</sub>-белков к Ni-NTA-матрице выше, чем сродство между антителом и его антигеном, что было с успехом использовано для очистки антител на соответствующих антигенах, иммобилизованных

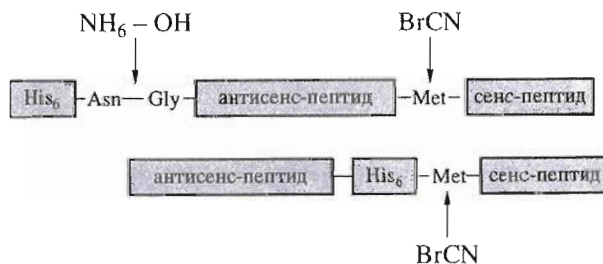


Схема.

на никель-агарозе [9]. Свойство гибридных белков, содержащих гомогистициновые кластеры, образовывать прочные комплексы с Ni-NTA-сорбентом было использовано при изучении структурно-функциональных особенностей РНК-полимеразы [10] и для получения иммобилизованной  $\beta$ -галактозидазы [11]. Подобный подход мы применили ранее при изучении взаимодействия присоединенного к никель-агарозе His<sub>6</sub>-содержащего рекомбинантного гербицидсвязывающего белка фотосистемы II ячменя (D1-белок) с атразином [12]. В настоящее время нами проводятся аналогичные эксперименты по изучению взаимодействия содержащих гомогистициновый кластер антисенс-пептидов, иммобилизованных на никель-агарозе, с соответствующими им сенс-пептидами (результаты будут опубликованы позднее).

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы ферменты нуклеинового обмена фирм Boehringer (ФРГ) и Pharmacia (Швеция), маркеры молекулярных масс белков и пептидов фирмы Pharmacia (Швеция). Расщепление ДНК эндонуклеазами рестрикции и другие ферментативные реакции проводили как описано ранее [13]. 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 [4, 14, 15]. Олигонуклеотиды синтезировали на синтезаторе 381A фирмы Applied Biosystems (США).

Биомассу из клеток *E. coli* HB101 (или MN1), содержащих плазмиду рРРЗ, выращивали как описано ранее [4]. Биомассу из клеток *E. coli* BL21 (DE3), содержащих экспрессирующий вектор рССЗ (рСС13) или рСС4 (рСС14), выращивали на среде LB с 50 мг/мл ампициллина при 37°C в течение нескольких часов до величины поглощения 0.6 при 600 нм. Затем прибавляли индуктор *lac*-оперона IPTG до концентрации 1 мМ и продолжали инкубацию еще 3–16 ч. Клетки осаждали центрифугированием (5000 об/мин, 15 мин) и в течение 2–3 мин разрушали ультразвуком (дезинтегратор Braun Sonic 1510, В. Braun Melsungen AG, ФРГ) при 0°C в буфере, содержащем 0.05 М EDTA, 0.1 М трис-НСl (рН 7.9), 0.2 М NaCl, 10 мМ 2-меркаптоэтанол и 20 мкг/мл PMSF. Клеточный дебрис отделяли от цитоплазматической фракции центрифугированием (12000 об/мин, 20 мин), промывали тем же буфером, затем 0.05% раствором Тритон X-100. Рекомбинантный белок растворяли в 6 М гуанидингидрохлориде, содержащем 5 мМ 2-меркаптоэтанол, и раствор осветляли центрифугированием (12000 об/мин, 15 мин).

**Металл-аффинную хроматографию** на Ni<sup>2+</sup>-NTA-агарозе (Quagex, США) проводили в основ-

ном как описывалось ранее [6]. Колонку с иммобилизованным на Ni<sup>2+</sup>-NTA-агарозе целевым белком после удаления примесей белковой природы промывали буфером, содержащим 50 мМ фосфат натрия, 10 мМ трис-НСl, 8 М мочевины, в градиенте рН 8.0 – 6.0. Белки, содержащие полигистициновый домен, элюировали с колонки в том же буфере при рН 4.5. Для ренатурации белков на твердой фазе колонку с никель-агарозой и закрепленным на ней белком промывали понижающимся линейным градиентом концентрации мочевины (7 → 0 М) в ренатурирующем буфере, содержащем 50 мМ трис-НСl (рН 7.6), 150 мМ NaCl, 5 мМ 2-меркаптоэтанол и 0.05% Tween-20. Затем целевые полипептиды, содержащие гистицинобогатый пептид, элюировали с колонки добавлением в тот же буфер имидазола до концентрации 200 мМ. Фракции анализировали электрофорезом в ПААГ и иммуноферментным анализом. Фракции, содержавшие целевой белковый продукт, объединяли и диализовали против 50 мМ трис-НСl/0.1% Тритон X-100, как это описано в работе [16].

Электрофорез белков и полипептидов в пластинах полиакриламидного геля, содержащего SDS, а также прокрашивание белковых зон кумасси R-250 и иммуноблоттинг проводили как описано в работе [17]. Количество целевого белка в клетках *E. coli* после разделения суммарной белковой фракции гель-электрофорезом оценивали после прокрашивания геля кумасси сканированием на приборе Ultrosan (LKB, Швеция). Иммуноферментный анализ на наличие рекомбинантных СТ и МР и иммуноблоттинг проводили с использованием кроличьих антител к кальцитонину и инсулину человека (Amersham, США) по стандартной методике [17]. Гибридные белки расщепляли бромцианом и гидроксиламином в течение 24 и 4 ч, соответственно, как описано ранее [4].

Данная работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 95-04-11071а).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Blalock J.E. // Trends Biotechnol. 1990. V. 8. P. 140–144.
2. Beattie J. // J. Endocrinol. 1990. V. 126. P. 179–181.
3. Меклер Л.Б. // Биофизика. 1969. Т. 14. С. 581–584.
4. Ефимов В.А., Аронова Е.А., Бурякова А.А., Калинин А.Л., Летунова А.Б., Фрадков А.Ф., Чахламчева О.Г. // Биоорганическая химия. 1994. Т. 20. С. 759–771.
5. Alexiev K., Uscheva A., Ivanov I. // Curr. Microbiol. 1989. V. 18. P. 5–9.
6. Ефимов В.А., Фрадков А.Ф., Калинин А.Л., Чахламчева О.Г. // Биоорганическая химия. 1995. Т. 21. С. 9–16.
7. Hochuli E., Bannwarth W., Dobeli H., Gentz R., Stuber D. // Bio/Technology. 1988. V. 6. P. 1321–1325.

8. Fontana A., Gross E. // Practical Protein Chemistry / Ed. A. Darbre. N.Y.: Wiley-Intersci. Publ., 1987. P. 108, 109.
9. Gu J., Stephenson G., Iadarola M. // BioTechniques. 1994. V. 17. P. 257–262.
10. Kashlev M., Martin E., Polyakov A., Severinov K., Nikiforov V., Goldfarb A. // Gene. 1993. V. 130. P. 9–14.
11. Piesecki S., Teng W.-Y., Hochull E. // Biotechnol. Bioeng. 1993. V. 42. P. 178–184.
12. Efimov V., Fradkov A., Raskind A., Khristin M., Klimov V., Chakhmakhcheva O. // FEBS Lett. 1994. V. 348. P. 153–157.
13. Ефимов В.А., Бурякова А.А., Полушин Н.Н., Паишкова И.Н., Дмитракова Е.В., Чахмахчева О.Г. // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. С. 499–507.
14. Чахмахчева О.Г., Фоти Д., Паишкова И.Н., Полушин Н.Н., Ефимов В.А. // Биоорган. химия. 1992. Т. 18. С. 1098–1103.
15. Ефимов В.А., Чахмахчева О.Г. // Биоорган. химия. 1982. Т. 8. С. 2084–2093.
16. Sano T., Cantor C.R. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1991. V. 176. P. 571–577.
17. Chan S.G., Weiss J., Konrad M., White T., Bahl C., Yu S.-D., Marks D., Steiner D.F. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. P. 5401–5409.

## Bacterial Synthesis of Human Calcitonin and Miniproinsulin as Fusion Proteins with the Corresponding Antisense Peptides and a Metal-Binding Peptide

V. A. Efimov, A. A. Buryakova, A. F. Fradkov, and O. G. Chakhmakhcheva

*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,  
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, GSP-7, 117871 Russia*

**Abstract**—To verify experimentally the molecular recognition theory, plasmids were constructed that provided the efficient synthesis of hybrid proteins composed of human calcitonin or miniproinsulin, the corresponding antisense peptides, and a histidine-rich metal-binding peptide. A method for isolation of the hybrid proteins by metal-chelating chromatography, cleavage, and renaturation was developed.

*Key words:* gene expression, recombinant proteins, sense and antisense peptides, metal-chelating chromatography.