



УДК 577.213.7;577.218

ПРОДУКЦИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ФАКТОРА РОСТА КЕРАТИНОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА В КЛЕТКАХ *Escherichia coli*

© 1998 г. Л. Р. Птицын[#], И. Б. Альтман, М. В. Гуров*,
А. В. Васильев**, Е. А. Воротеляк**, В. В. Терских**

Государственный научный центр ГосНИИ "Генетика",
113545, Москва, 1-й Дорожный пр., 1;

* НТЦ "Лекбиотех" АО "Биотехнология", Москва;

** Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова, Москва

Поступила в редакцию 3.12.97 г. Принята к печати 30.03.98 г.

Синтезирован ген фактора роста кератиноцитов человека (hKGF), и сконструированы векторы для цитоплазматической продукции hKGF в клетках *Escherichia coli*. Показано, что уровень продукции рекомбинантного белка составляет 1–1.5% суммарного белка клеток. Гомогенный препарат hKGF получен с помощью трех стадий ионообменной и аффинной хроматографии. Белок обладает биологической активностью, стимулируя дозозависимый синтез ДНК в культуре эпидермальных кератиноцитов человека.

Ключевые слова: фактор роста кератиноцитов человека, рекомбинантный, очистка; ген *hkgf*, синтез; *E. coli*, штамм-продуцент.

Фактор роста кератиноцитов человека (hKGF), относящийся к семейству факторов роста фибробластов (FGF), был выделен из кондиционированной среды эмбриональных фибробластов человека и идентифицирован как FGF-7 [1, 2]. В отличие от других белковых факторов, входящих в это семейство, hKGF обладает выраженной специфичной биологической активностью – стимулирует пролиферацию эпителиальных клеток, не оказывая действия на фибробласты и эндотелиальные клетки. Этот фактор продуцируется стромальными фибробластами многих эпителиальных тканей и играет существенную роль в пролиферации эпителиальных клеток.

Аминокислотная последовательность зрелого белка hKGF была определена исходя из структуры кДНК [2] и данных по секвенированию N-концевого пептида [1].

Недавно клонирован высокоаффинный рецептор hKGF, представляющий собой изоформу рецептора-2 фактора роста фибробластов (*bek/FGFR2*), образующуюся в результате альтернативного сплайсинга [3, 4].

Биосинтез рекомбинантных препаратов hKGF и серии его мутантных вариантов с рядом последовательных делеций в N-концевом домене был

осуществлен в клетках *Escherichia coli* с использованием T7-системы экспрессии [5]. Было показано, что рекомбинантный препарат обладает митогенной активностью, в 10 раз превышающей таковую для природного hKGF, и его мутантные варианты с делециями до 10 N-концевых аминокислотных остатков сохраняют биологическую активность, сравнимую с активностью hKGF.

Для исследования возможности эффективной продукции hKGF в клетках *E. coli* мы осуществили химико-ферментативный синтез гена *hkgf*. Нуклеотидная последовательность синтетического гена *hkgf* была определена на основании данных по структуре кДНК и аминокислотной последовательности белка hKGF [2, 5]. При этом учитывалась частота встречаемости кодонов в клетках *E. coli* [6], а также необходимость наличия сайтов узнавания рестриктаз для процедуры химико-ферментативного синтеза и клонирования гена.

Для конструирования гена *hkgf* и экспрессионных плазмид были синтезированы 18 олигонуклеотидов (таблица). Основная часть последовательности гена, ограниченная с 5'-конца сайтами рестрикции *EcoRI* и *XhoI* и с 3'-конца сайтом *HindIII*, была синтезирована с использованием 14 олигонуклеотидов (k1–k7 и k10–k16), как описано в "Экспериментальной части". ДНК, полученную при лигировании олигонуклеотидов, расщепляли рестриктазами *EcoRI* и *HindIII* и клонировали в векторе pUC18/*EcoRI-HindIII*. Полученная плаزمиды pUC-kgf-с несла фрагмент *XhoI-HindIII*, включающий 444 п. о. кодирующей части гена

Сокращения: hKGF и *hkgf* – фактор роста кератиноцитов человека и его ген соответственно; IPTG – изопропил-β-D-тиогалактозид; RBS – участок связывания рибосом; ЭКЦ – эпидермальные кератиноциты человека; ЭФР – эпидермальный фактор роста.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 314-18-58).

Олигонуклеотиды, синтезированные для конструирования гена фактора роста кератиноцитов человека

Олигонуклеотид	Структура (5' → 3')
k1	C GAATTCCTCGAGT CCTGAGCGT CACACT CGTAGTTATGATTACATGGA- AGGTGGTGATATTCGTGTGCGT
k2	CGTCTCTTCTGT CGTACACAGTGGT ATCTGCGTATCGACAAACGTGGTA- AAGTAAAAGGTACCCAAGA
k3	GATGAAGAATAATTACAATATCATGGAAATCCGTACTGTTGCAGTTGGT- ATTGTGGCAATCAAA
k4	GGCGTGGAAAGTGAGTTCTATCTTGCAATGAACAAGGAAGGTAACCTCT- ATGCAAGAAAGAATG
k5	CAATGAAGATTGTA AACTTCAAAGA ACTGATTCTGGAAAACCATTACAAC- ACATATGCATCTGCTAA
k6	ATGGACTCACAACGGTGGCGAAATGTTTGTTCCTTAAATCAAAAGGGC- ATTCCTGTACGTGGTAA
k7	GAAAACCAAGAAAGAACA AAAAGACT GCTCACTTTCTTCCTATGGCAATC- ACTTAAACATCCA AGCTTT
k10	AA AGCTT GGGATGTTAAGTGATTGCCATAGGAAGAAAGTGAGCAGTCTTT- TGTTCTTTCT
k11	TGGTTTTCTTACCACGTACAGGAATGCCCTTTTGATTTAAGGCAACAAA- CATTTCGCCACCGTTGT
k12	GAGTCCATTTAGCAGATGCATATGTGTTGTAATGGTTTTCCAGAATCAG- TTCTTTGAAGTTACAAT
k13	CTTCATTGCATTCTTTCTTTGCATAGAGTTTACCTTCCTTGTTCATTGC- AAGATAGA ACTCACTT
k14	TCCACGCCTTTGATTGCCACAATACCAACTGCAACAGTACGGATTTCCA- TGATATTGTAATTAT
k15	TCTTCATCTCTTGGGTACCTTTTACTTTACCACGTTTGTGATACGCAG- ATACCACTGTGTACGACAG
k16	AAGAGACGACGCACACGAATATCACCACCTTCCATGTAATCATAACTAC- GAGTGTGACGCTCAGGACT CGAGGAATT CG
k21	CATGTGTAATGATATGACTCCGGAACAAATGGCTACTAATGTGAACTGC
k22	TCGAGCAGTTCACATTAGTAGCCATTTGTTCCGGAGTCATATCATTACA
k31	<u>T</u> ATGGCTTGTAAATGATATGACTC
k32	<u>C</u> GGAGTCATATCATTACAAGCCA

Выделены сайты, использованные в процессе клонирования гена: жирным шрифтом – сайты рестриктаз *EcoRI* и *XhoI*, жирным курсивом – *HindIII*, светлым курсивом – липкие концы сайтов *NcoI* и *XhoI*, подчеркнуты липкие концы сайтов *NdeI* и *HpaII*.

hkgf. Данный фрагмент использовали далее для конструирования экспрессионных плазмид.

В качестве вектора на первом этапе работы была использована плазмида pBTIL-3 [7], несущая промотор *tac*, высокоэффективный участок связывания рибосом гена белка 10 фага T7 (*RBS₁₀*) и содержащая удобные для клонирования гена сайты *NcoI* и *HindIII*. В результате лигирования вектора pBTIL-3/*NcoI-HindIII* с синтетическими олигонуклеотидами k21 и k22, кодирующими 5'-концевую последовательность гена *hkgf* (1-48 п. о.), и *XhoI-HindIII*-фрагментом гена была получена плазмида pBT-kgf (рис. 1а), в которой синтез зрелого белка hKGF контролируется промотором

tac. Структура синтетического гена приведена на рис. 1б. Ген содержит стартовый кодон ATG и последовательность ДНК, кодирующую зрелый белок hKGF, т.е. последовательность Cys32–Thr194 белка-предшественника (в соответствии с нумерацией аминокислотных остатков, приведенной в работе [2]).

Известно, что hKGF обладает высоким сродством к гепарину [1], поэтому продукцию рекомбинантного белка в штамме *E. coli* TG1(pBT-kgf) в присутствии 0.5 мМ IPTG оценивали методом SDS-электрофореза связывающейся с гепарин-сэфарозой фракции суммарного клеточного белка. К сожалению, уровень продукции hKGF в штамме

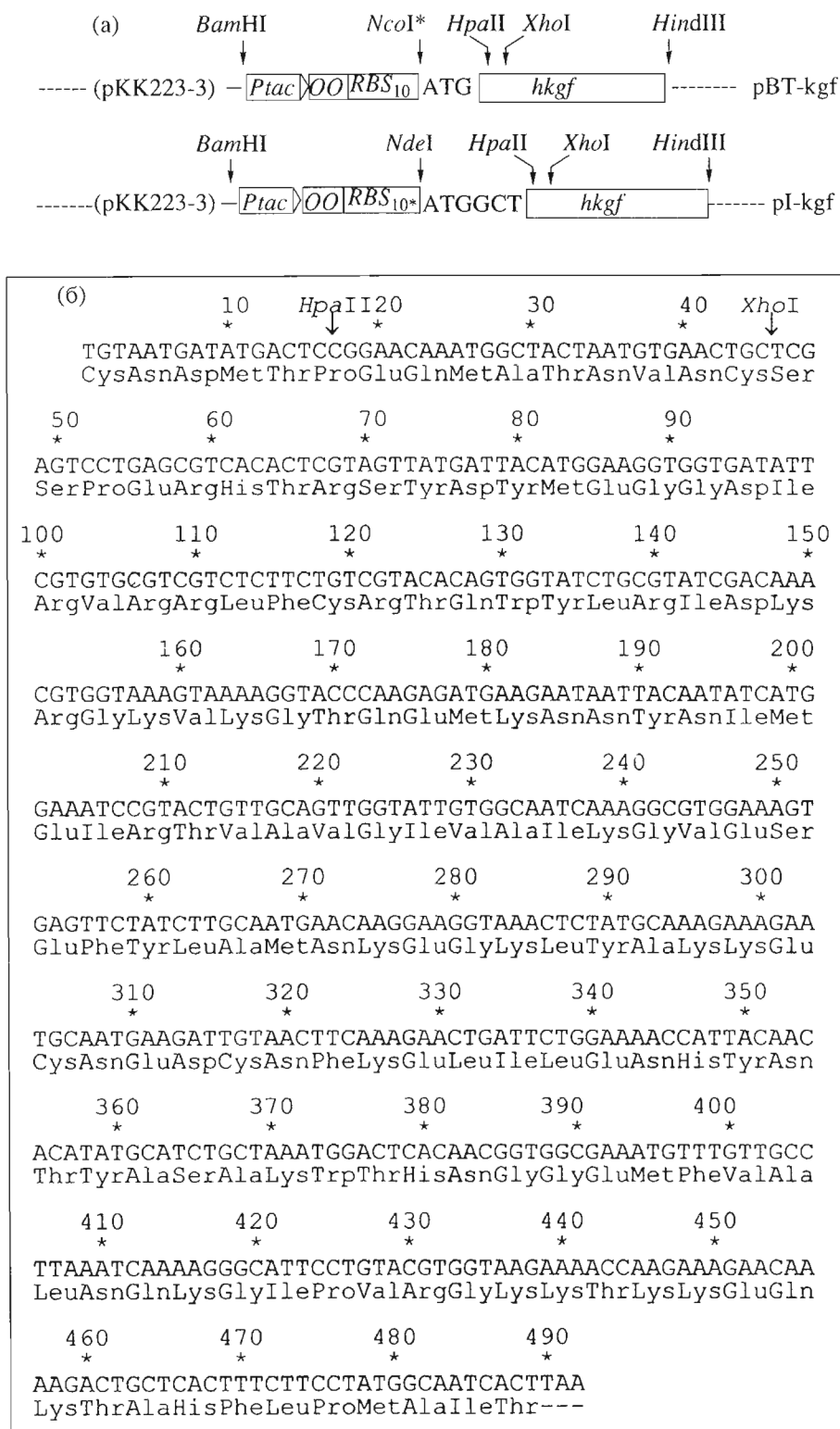


Рис. 1. Схемы плазмид, обеспечивающих экспрессию гена *hkgf* (а); структура синтетического гена и соответствующая аминокислотная последовательность зрелого белка hKGF (фрагмент Cys32 – Thr194 белка-предшественника в соответствии с нумерацией аминокислотных остатков, приведенной в работе [2]) (б). *Ptac* – промотор; *O* – операторный участок связывания *lac*-репрессора; *RBS₁₀* и *RBS₁₀** – сайты связывания рибосом гена 10 фага T7 из плазмид рBTIL-3 [7] и рТОТЕ2IL-3 [9]; ATG – стартовый кодон; *hkgf* – ген фактора роста кератиноцитов человека. Штриховая линия – последовательность плазмиды рКК223-3. Указаны сайты рестрикции, использованные при клонировании гена; *NcoI** – сайт, утраченный в результате клонирования.

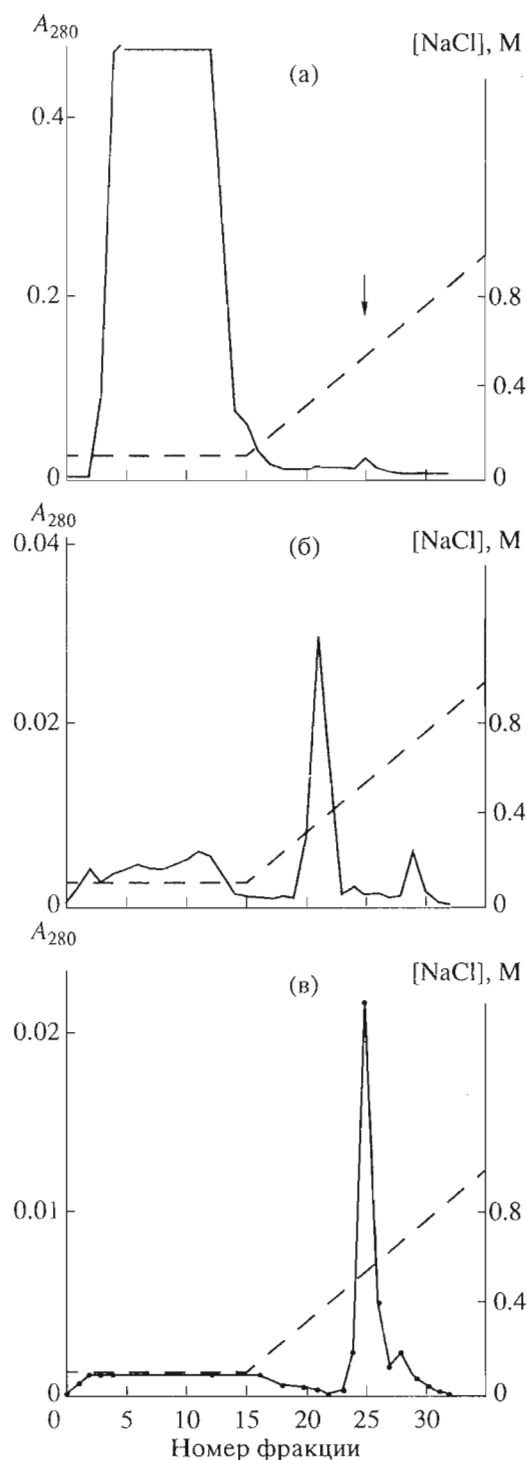


Рис. 2. Очистка рекомбинантного hKGF ионообменной (а, в) и аффинной (б) хроматографией (последовательность стадий: а, б, в). Стрелкой указано положение пика hKGF.

TG1(pBT-kgf) был невысок – менее 0.6% суммарного клеточного белка (данные не представлены).

Как известно [8], тип аминокислотного остатка во второй позиции в последовательности полипеп-

тида оказывает влияние на эффективность трансляции прокариотических белков. В частности, остаток цистеина в этой позиции снижает эффективность трансляции. Также было показано, что включение кодона, соответствующего остатку Ala31 (последний аминокислотный остаток лидерной последовательности белка-предшественника hKGF), в структуру гена *hkgf* повышает уровень экспрессии без изменения биологической активности рекомбинантного hKGF [5].

Поэтому нами была сконструирована экспрессионная плазмида, несущая модифицированный ген зрелого hKGF, включающий добавочный кодон Ala31 белка-предшественника. *NdeI-HindIII*-фрагмент ДНК, содержащий модифицированный ген, был получен при лигировании *HpaII-HindIII*-фрагмента плазмиды pBT-kgf (19-492 п. о. кодирующей последовательности) с олигонуклеотидами k31 (не фосфорилирован) и k32 (фосфорилирован), кодирующими 5'-концевой участок гена, с последующим расщеплением лигазной смеси рестриктазой *HindIII*. *BamHI-NdeI*-фрагмент ДНК, несущий промотор *tac* и *RBS* гена белка 10 фага T7, был выделен из плазмиды pTOTE2IL-3 [9]. Смесь этих двух фрагментов лигировали с вектором pKK223-3/*BamHI-HindIII* и лигазной смесью трансформировали клетки *E. coli* TG1. Структура 5'-концевой последовательности гена *hkgf* и наличие добавочного кодона GCT после стартового кодона ATG в полученной плазмиде pI-kgf (рис. 1а) были подтверждены секвенированием соответствующего участка плазмиды.

Для продукции рекомбинантного hKGF использовали штамм TG1(pI-kgf). Синтез белка индуцировали добавлением 0.5 мМ IPTG. Уровень продукции оценивали с помощью SDS-электрофореза фракции суммарного белка клеток, связывающейся с гепарин-сефарозой, и последующего денситометрического сканирования полиакриламидных гелей. Было показано, что количество рекомбинантного hKGF составляет около 1–1.5% суммарного клеточного белка.

Методика выделения и очистки hKGF описана в “Экспериментальной части”. Использование трех хроматографических стадий в процедуре очистки (рис. 2) позволяет получить практически индивидуальный белок (по результатам SDS-электрофореза, рис. 3). Выход очищенного hKGF составляет около 0.5 мг на 1 л культуры TG1(pI-kgf) (количество белка оценивали исходя из известной величины A_{214} , равной 140 для 1%-ного раствора [1]). Молекулярная масса полипептида составляет около 21 кДа, что соответствует интактному KGF [5] (рис. 3).

Как ранее отмечалось, hKGF – достаточно токсичный продукт для клеток *E. coli*; кроме того, он интенсивно расщепляется протеиназами цитоплазмы клеток в процессе его биосинтеза с образованием полипептидов массой 16–17 кДа в качестве промежуточных продуктов его деграда-

ции [5]. По-видимому, эти два эффекта существенно ограничивают возможность использования клеток *E. coli* для достижения высокоэффективной продукции рекомбинантного KGF. Уровень продукции hKGF в штамме TG1(pI-kgf) сравним с ранее описанным для T7-системы экспрессии в клетках BL21(DE3)plysE [5]. Однако мы не наблюдали образования значительного количества продуктов деградации с молекулярной массой 16–17 кДа при продукции hKGF в штамме TG1(pI-kgf). Возможно, это связано с некоторыми различиями в составе набора протеиназ в цитоплазме использованных клеток-хозяев.

При изучении биологической активности препарата рекомбинантного hKGF показано (рис. 4), что он оказывает дозозависимый эффект на включение [³H]тимидина эпидермальными кератиноцитами человека, культивируемыми в среде с низким содержанием ионов Ca²⁺. Максимальный эффект воздействия hKGF (увеличение уровня синтеза ДНК на 68%) наблюдается при концентрации фактора 20 нг/мл. Эти результаты согласуются с данными работы [10], свидетельствующими о том, что пролиферативный эффект KGF проявляется при культивировании ЭКЦ в среде с низким содержанием ионов кальция (около 0.05 мМ). Следовательно, полученный нами рекомбинантный препарат hKGF обладает биологической активностью, присущей нативному фактору роста кератиноцитов.

Как недавно показано [11], KGF способен модулировать терминальную дифференцировку культуры кератиноцитов и программированную гибель клеток. При добавлении к постконфлюэнтной культуре KGF ингибирует активность мембранной трансглутаминазы, ингибируя таким образом образование инволюкриновой оболочки и понижая нуклеарную фрагментацию. При этом влияние KGF более выражено, чем действие эпидермального фактора роста (ЭФР). KGF усиливает пролиферацию фолликулярных ЭКЦ, выступая как эндогенный медиатор развития и роста волосных фолликулов [12].

В качестве паракринного стимулятора пролиферации эпителиальных клеток KGF значительно стимулирует раневое заживление, ускоряя эпителизацию длительно незаживающих трофических ран, при этом через 24 ч после нанесения травмы уровень экспрессии мРНК в мезенхимных тканях повышается в 160 раз [13]. KGF – паракринный фактор роста для эпителия простаты, тогда как ЭФР проявляет себя как аутокринный фактор. В бессывороточной среде эти факторы промотируют рост эпителиальных клеток простаты [14]. Очевидно, что KGF играет важную роль в развитии аденокарциномы. Эпителиальные клетки простаты продуцируют KGF и его рецептор. Развитие аденокарциномы объясняют образованием аутокринной регуляторной петли этого, в норме паракринного, регулятора [15].

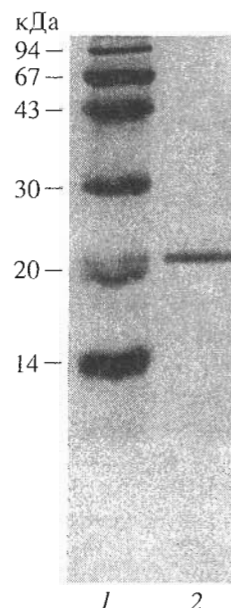


Рис. 3. Электрофореграмма препарата hKGF (фракция 25 рис. 2в) (дорожка 2). Дорожка 1: маркеры молекулярных масс. Слева указаны их молекулярные массы.

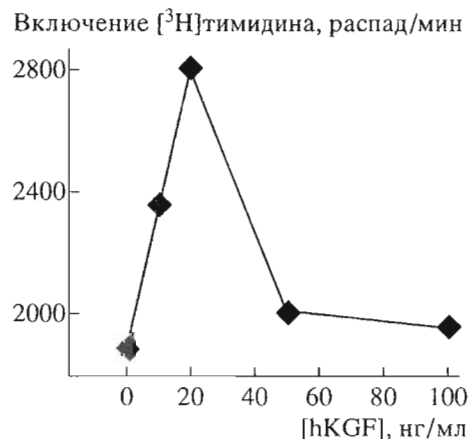


Рис. 4. Стимуляция препаратом рекомбинантного hKGF включения [³H]тимидина эпидермальными клетками кератиноцитов человека. Данные трех экспериментов; величина стандартного отклонения меньше размера символа.

Таким образом, KGF можно рассматривать как важный паракринный стимулятор роста эпителия, участвующий в морфогенезе различных органов, и изучение этих процессов невозможно без применения рекомбинантных препаратов данного белка.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Олигонуклеотиды синтезировали на автоматическом четырехколоночном синтезаторе ДНК

фирмы Milligen/Biosearch, модель 8700, с использованием фосфоамидитного метода. Продукты очищали с помощью ВЭЖХ на ионообменной колонке (4.6 × 250 мм) Synchrom AX 300 (SynChrom Inc., США) с последующей обращенно-фазовой хроматографией на колонке (4 × 250 мм) Nucleosil 300-5-C18 (Macherey-Nagel, Германия) и обессоливали на колонке TSK gel G2000SW (Toyo Soda, Япония).

В работе использовали реактивы фирмы Difco при приготовлении бактериальных сред и реактивы фирмы Sigma при приготовлении сред для культивирования ЭКЦ.

LB среду готовили, как рекомендовано в [16].

Генно-инженерные манипуляции проводили по стандартным методикам [16] или согласно рекомендациям фирм-производителей ферментов (Pharmacia, Швеция; Fermentas, Литва).

SDS-электрофорез белков в полиакриламидном геле осуществляли по методу [17].

Анализ гелей, окрашенных кумасси R-250, проводили на сканере, модель CSD 200 (Beckman, США).

Синтез гена *hkgf* был проведен по следующей схеме:

синтез основной части гена: 14 олигонуклеотидов (k1 и k16 – не фосфорилированы, k2–k7 и k10–k15 – фосфорилированы) смешивали в эквимольных количествах (по 20 пмоль каждого) в 100 мкл лигазного буфера, отжигали, понижая температуру от 85 до 20°C в течение 2 ч, и лигировали; синтезированную ДНК расщепляли рестриктазами *EcoRI* и *HindIII*, *EcoRI-HindIII*-фрагмент выделяли с помощью электрофореза в агарозном геле и клонировали в векторе pUC18/*EcoRI-HindIII*. Полученная плазмида pUC18-*kfg*-с содержала последовательность гена hKGF 49–492 п.о., ограниченную сайтами рестриктаз *XhoI* и *HindIII*.

Конструирование плазмиды pBT-*kfg*. Фрагмент *XhoI-HindIII* из плазмиды pUC18-*kfg*-с, выделенный из агарозного геля, и отожженные олигонуклеотиды k21 и k22 (фосфорилированы) лигировали с вектором pBTIL-3/*NcoI-HindIII* [7]. Лигазной смесью трансформировали клетки *E. coli* TG1. Структуру гена зрелого KGF в полученной плазмиде pBT-*kfg* подтверждали рестрикционным анализом и секвенированием гена по методу Сэнгера.

Конструирование плазмиды pI-*kfg*. Фрагмент *HpaII-HindIII* гена *hkgf* выделяли из плазмиды pBT-*kfg*, расщепленной рестриктазами *HpaII* и *HindIII*, с помощью электрофореза в агарозном геле, лигировали с олигонуклеотидами k31 и k32 (фосфорилированы) и обрабатывали лигазную смесь рестриктазой *HindIII*. *NdeI-HindIII*-фрагмент, кодирующий ген зрелого KGF с добавочным триплетом аминокислотного остатка Ala, выделяли электрофорезом в агарозном геле и лигировали его с вектором pKK223-3/*BamHI-HindIII*

(Pharmacia, Швеция) и фрагментом *BamHI-NdeI* из плазмиды pTOTE2IL-3 [9], содержащим последовательности промотора *tac*, двух *lac*-операторов, а также *RBS* гена белка 10 фага T7. Лигазной смесью трансформировали клетки TG1. Последовательность 5'-концевого фрагмента гена *kfg* в полученной плазмиде pI-*kfg* проверяли секвенированием.

Производство рекомбинантного hKGF. Клетки TG1, несущие рекомбинантные плазмиды, выращивали в LB-среде (300 мл) в присутствии 100 мкг/мл ампициллина при 37°C до достижения величины оптической плотности культуры A_{550} около 0.8 ОЕ и добавляли 0.5 мМ IPTG. Культуры инкубировали 3 ч, затем клетки отделяли центрифугированием. Осадок клеток ресуспендировали в 15 мл раствора 5 мМ EDTA (pH 8.0), содержащего 0.1 мМ фенилметилсульфонилфторид, и разрушали замораживанием и оттаиванием. Лизат клеток центрифугировали, супернатант использовали для выделения KGF.

Выделение и очистка hKGF. Супернатант лизированных клеток в 5 мМ Na-фосфатном буфере (pH 6.5), содержащем 100 мМ NaCl, наносили на колонку (объем 2 мл) S-сефарозы (Pharmacia, Швеция), промывали колонку буфером и элюировали связанные белки линейным градиентом 0.1–1 М NaCl в том же буфере. Объем градиента составлял 20 мл. Аликвоты из фракций градиента анализировали SDS-электрофорезом. Фракции, содержащие KGF, объединяли, разбавляли пятью объемами 20 мМ Трис-Cl-буфера (pH 7.5) и наносили на колонку (объем 2 мл) с гепарин-сефарозой (Pharmacia, Швеция). Колонку промывали буфером 20 мМ Трис-Cl (pH 7.5), содержащим 100 мМ NaCl. Связанный белок элюировали линейным градиентом 0.1 – 1 М NaCl в том же буфере (объем градиента 20 мл). Фракции, содержащие KGF, объединяли, разбавляли пятью объемами 10 мМ Na-фосфатного буфера (pH 6.5), наносили на 1.5-мл колонку с S-сефарозой и элюировали градиентом 0.1 – 1 М NaCl (объем 15 мл) в этом буфере. Препарат hKGF элюировался при концентрациях около 0.5 М NaCl. Фракции, содержащие рекомбинантный белок, объединяли, концентрировали в микроконцентраторе "Центрикон-10" (Amicon, Нидерланды) и хранили при –40°C. Выход препарата hKGF в данном эксперименте составил 150 мкг.

Культивирование эпидермальных кератиноцитов [18]. Биоптаты кожи, взятые у пациентов в ходе хирургических операций, помещали в 0.25% раствор трипсина и инкубировали 16–24 ч при 4°C. После этого эпидермис отделяли от дермы по линии базальной пластинки и пипетированием получали суспензию ЭКЦ. Клетки вносили в культуральные планшеты в концентрации 150 тыс./мл. После 5 сут культивирования в среде DMEM:F12 (Sigma, США) с добавлением ЭФР (10 нг/мл), инсулина (5 мкг/мл) и изопроте-

ренола (10 мМ) при 37°C в атмосфере воздуха и 3% насыщающей влажности культуру переводили на среду MCDB 151 (Sigma, США) (концентрация ионов Ca^{2+} 0.03 мМ) со следующими добавками: бычий сывороточный альбумин (0.25%), инсулин (5 мкг/мл), трансферрин (5 мкг/мл), селенит натрия (5 нг/мл), ЭФР (10 нг/мл), этанол-амин (0.1 мМ), изопротеренол (10 мМ), фактор роста фибробластов (5 нг/мл).

Определение биологической активности hKGF. Препарат hKGF добавляли в культуру через 1 сут после ее выращивания на среде MCDB 151 с добавками. Одновременно вносили [^3H]тимидин (1 мкКи/мл). После инкубации в течение 72 ч клетки фиксировали и определяли количество включившегося [^3H]тимидина. Для этого клетки промывали раствором Хенкса и 2 раза в течение 10 мин обрабатывали холодным 5% раствором трихлоруксусной кислоты. Затем клетки лизировали 0.1 М NaOH и вносили в сцинтилляционную жидкость. Радиоактивность включившегося [^3H]тимидина определяли на сцинтилляционном счетчике.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Rubin J.S., Osada H., Finch P.W., Taylor W.G., Rudikoff S., Aaronson S.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. P. 802-806.
- Finch P.W., Rubin J.S., Miki T., Ron D., Aaronson S.A. // Science. 1989. V. 245. P. 752-755.
- Miki T., Fleming T.P., Bottaro D.P., Rubin J.S., Ron D., Aaronson S.A. // Science. 1991. V. 251. P. 72-75.
- Miki T., Bottaro D.P., Fleming T.P., Smith C.L., Burgess W.H., Chan A.M.-L., Aaronson S.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992. V. 89. P. 246-250.
- Ron D., Bottaro D.P., Finch P.W., Morris D., Rubin J.S., Aaronson S.A. // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. P. 2984-2988.
- Andersson S.G., Kurland C.G. // Microbiol. Revs. 1990. V. 54. P. 198-210.
- Птицын Л.Р., Альтман И.Б. // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1995. Т. 59. С. 83-85.
- Looman A.C., Bodlaender J., Comstoch L.J., Eaton D., Jhurani P., deBoer H.A., vanKnippenberg P.H. // EMBO J. 1987. V. 6. P. 2489-2492.
- Луценко С.В., Гуревич А.И., Птицын Л.Р., Рязанова Л.А., Смирнов В.А., Ажаев А.В. // Биооргани. химия. 1992. Т. 18. С. 391-397.
- Marchese C., Rubin J., Ron D., Faggioni A., Torrishi M., Messina A., Frati L., Aaronson S. // J. Cell. Physiol. 1990. V. 144. P. 326-332.
- Hines M., Allenhoffmann B. // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. P. 6245-6251.
- Danilenko M., Ring B., Yangihara D., Benson W., Wiemann B., Starnes C., Pierce G. // Am. J. Pathol. 1995. V. 147. P. 1-10.
- Werner S., Peter K., Longaker M., Fuller-Pace F., Banda M., Williams L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992. V. 89. P. 6896-6900.
- Peehl D., Wong S., Rubin J. // Growth's Reg. 1996. V. 6. P. 22-31.
- Mcgarvey T., Stearns M. // Pathology. 1995. V. 63. P. 52-62.
- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. М.: Мир, 1984.
- Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680-685.
- Воротеляк Е.А., Васильев А.В., Гусев С.А., Повалий Т.М., Терских В.В. // Изв. РАН. Сер. биол. 1996. Т. 1. С. 117-120.

Production of Recombinant Human Keratinocyte Growth Factor in *Esherichia coli* Cells

L. P. Ptitsin[#], I. B. Al'tman*, M. V. Gurov**, A. V. Vasil'ev***,
E. A. Vorotelyak***, and V. V. Terskih***

*State Research Institute Genetika, Pervyi Dorozhnyi pr. 1, Moscow, 113545 Russia

**NTTs Lekbiotech, AO Biotechnologiya, Moscow, Russia

***Kol'tsov Institute of Developmental Biology, Moscow, Russia

Here we describe the synthesis of the gene encoding human keratinocyte growth factor (hKGF) and the construction of vectors for cytoplasmic production of hKGF in *Esherichia coli* cells. The level of recombinant protein expression was 1-1.5% of the total cell protein. hKGF was purified to homogeneity by three-step ion-exchange and affinity chromatography. The protein is biologically active: it stimulates dose-dependent protein synthesis in cultured human epidermal keratinocytes.

Key words: human keratinocyte growth factor, recombinant, purification; hkgf gene, synthesis; *E. coli*, producer strain

[#] To whom correspondence should be addressed.