



УДК 577.214.622

ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ЭКСПРЕССИЯ ЛИМФОТОКСИНОВ МЫШИ В КЛЕТКАХ *Escherichia coli* И ПОЛУЧЕНИЕ АНТИТЕЛ К НИМ

© 1999 г. В. Г. Коробко*[@], В. Е. Бойченко^{§&}, Д. В. Купраш[§],
Р. Л. Турецкая[§], С. А. Недоспасов^{§&@#}

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

[§] Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 117984, Москва, ул. Вавилова, 32;

[&] Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва;

[@] Национальный институт рака США, Фредерик (Мэриленд), США

Поступила в редакцию 03.07.98 г.

Принята к печати 07.08.98 г.

В клетках *E. coli* экспрессированы гены, кодирующие фрагменты полипептидных цепей лимфотоксинов (LT) мыши: укороченный с N-конца LT α и внеклеточный домен LT β , с гепта- и гексагистидиновыми эпитопами на N-конце соответственно. Очищенные металлохелатной хроматографией рекомбинантные белки использованы для получения поликлональных антител, специфически распознающих LT мыши.

Ключевые слова: лимфотоксин-альфа (LT α); лимфотоксин-бета (LT β); антитела; рекомбинантные белки; экспрессия в *E. coli*.

Лимфотоксин-альфа (LT α) был описан 30 лет назад [1] и после молекулярного клонирования был идентифицирован как близкий гомолог фактора некроза опухолей (TNF) [2]. У человека и мыши гены, кодирующие LT α (называемый в прошлом TNF β) и TNF (иногда называемый TNF α), расположены тандемно на небольшом расстоянии друг от друга [3, 4]. До 1993 г. LT α считался лимфоцитспецифическим аналогом TNF, который передает сигнал через два TNF-рецептора с M 55 и 75 кДа. Открытие LT β [5] и рецептора LT β [6] помогло сформулировать концепцию, согласно которой основная функция LT – органогенез лимфатических узлов, выявленная на нокаутных моделях с инактивированными генами LT α и LT β , – осуществляется мембранным LT α /LT β гетеротримером [7–9], причем эта функция отлична от “функций защиты организма”, одним из главных медиаторов которой является TNF [10]. Несмотря на значительный прогресс в гетерологической экспрессии белков TNF и LT человека и получении поликлональных и моноклональных антител к ним, без которых было бы невозможно изуче-

ние биологической функции этих цитокинов, рекомбинантные LT мыши и антитела к ним до недавнего времени описаны не были.

В настоящей работе мы сделали первый шаг для получения молекулярных реагентов на мембранный комплекс LT мыши. Нами осуществлена гетерологическая экспрессия в кишечной палочке и очистка укороченного мышинового LT α и внеклеточного домена мышинового LT β и получены первые поликлональные антитела, способные специфически узнавать LT α и LT β мыши.

Для получения антигена мы сконструировали экспрессионную плазмиду, содержащую искусственный ген, кодирующий укороченный на 23 а.о. с N-конца мышинный LT α . Такой белок аналогичен по длине и гомологичен по структуре укороченному LT α человека, продуцируемому некоторыми В- и Т-клеточными линиями [11, 12]. Кроме того, укороченный человеческий белок эффективно синтезируется клетками *E. coli* как растворимый цитоплазматический белок, что позволяет очищать его, используя традиционные биохимические методы [13–15]. В качестве источника гена LT α мыши использовали плазмиду pmuLT [предоставлена В.В. Кравченко (Исследовательский институт Скрипс, Ла Хойя, США)], содержащую искусственный ген, кодирующий зрелый полноразмерный мышинный белок LT α . Этот ген был получен лигированием большей части 4-го

Сокращения: LT – лимфотоксин; TNF – фактор некроза опухолей; hG-CSF – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор человека; IPTG – изопропилтио- β -D-галактопиранозид.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 135-9964; e-mail: snedos@imb.imb.ac.ru).

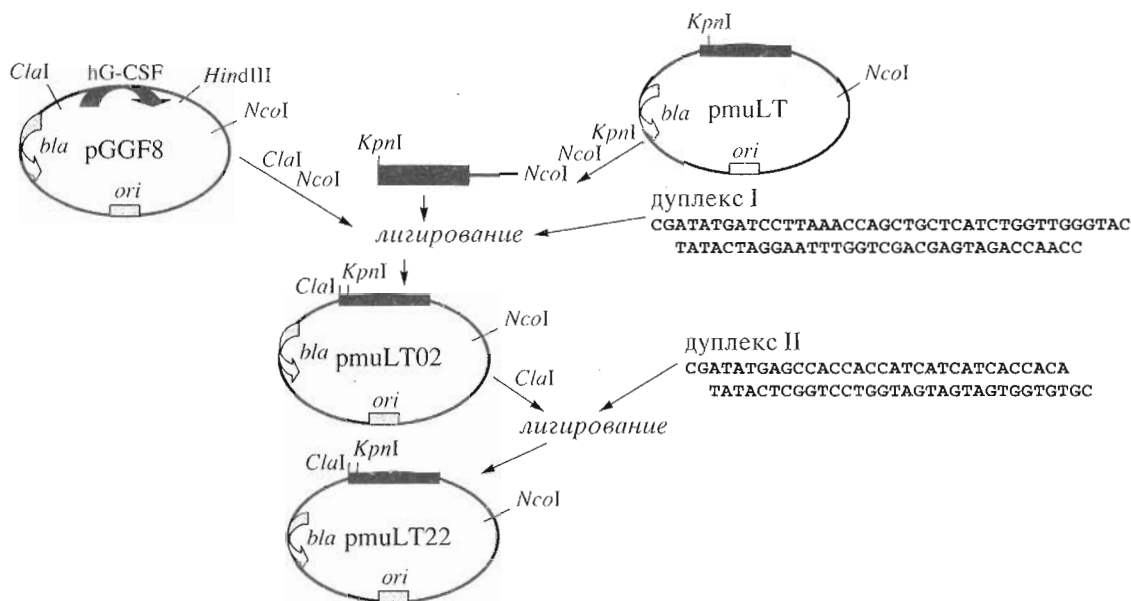


Рис. 1. Схема конструирования плазмиды pmuLT22, содержащей ген, кодирующий укороченный белок LT α мыши с гистиридиновым эпитопом. Указаны сайты рестриктаз, использованные для клонирования; bla – ген β -лактамазы, ori – участок начала репликации плазмидной ДНК.

экзона [16] с синтетическим дуплексом, кодирующим недостающую часть зрелого белка. Экспрессия этого гена в клетках *E. coli* приводила к накоплению мышинового LT α в виде нерастворимых телец включения (В.В. Кравченко, С.А. Недоспасов – неопубликованные данные).

В качестве вектора для клонирования укороченного гена LT α мыши использовали плазмиду pGGF8 – продуцент рекомбинантного гранулоцитарного колониестимулирующего фактора человека (hG-CSF) [17]. В результате трехкомпонентного лигирования *KpnI-NcoI*-фрагмента плазмиды pmuLT, синтетического дуплекса I и *ClaI-NcoI*-векторной части плазмиды (рис. 1) была получена плаزمида pmuLT02, содержащая ген, кодирующий укороченный с N-конца на 23 а.о. LT α мыши. При выращивании клеток *E. coli* SG20050, трансформированных этой плазмидой, наблюдали образование рекомбинантного белка в виде нерастворимых агрегатов. С целью упрощения выделения рекомбинантного белка мы сконструировали плазмиду pmuLT22, содержащую ген, кодирующий укороченный LT α мыши с гептагистиридиновым эпитопом на N-конце, клонированием синтетического олигонуклеотидного дуплекса II в плазмиду pmuLT02 по сайту *ClaI*. Плазмиды pmuLT22 детерминирует эффективный конститутивный биосинтез рекомбинантного белка LT α -His₇ под контролем тандема триптофановых промоторов и сайта инициации трансляции с энхансером гена *X* бактериофага T7.

LT β в отличие от LT α является трансмембранным белком второго типа (N-конец находится

внутри клетки), поэтому с точки зрения получения реагентов на нативный мембранный комплекс представлялось перспективным использование в качестве антигена внеклеточного C-концевого домена, синтезированного в *E. coli*. Поэтому в качестве вектора для экспрессии мы использовали плазмиду pmuLTbHis, предоставленную М.Б. Алимжановым (Институт медицинской микробиологии, иммунологии и гигиены, Мюнхен, Германия), кодирующую аминокислотную последовательность 152-306 LT β мыши [18, 19] с N-концевым гексагистиридиновым эпитопом. Для этого сначала из мРНК, полученной из активированных конканавалином А спленоцитов мыши, был синтезирован с помощью RT-PCR соответствующий фрагмент кДНК LT β , который затем был клонирован в экспрессионный плазмидный вектор pQE30 (Qiagen Inc., США). В результате получили плазмиду pmuLTbHis.

Плазмиды pmuLT22 обеспечивала в клетках *E. coli* высокий уровень конститутивного биосинтеза рекомбинантного белка LT α -His₇, тогда как в случае плазмиды pmuLTbHis высокий уровень синтеза белка LT β -His₆ достигался при индукции IPTG [20]. Рекомбинантные белки LT α -His₇ и LT β -His₆ были очищены в одну стадию хроматографией на Ni²⁺-сефарозе. Чистота полученных таким образом препаратов рекомбинантных LT α -His₇ и LT β -His₆ по данным SDS-ПААГ была не менее 90% (рис. 2).

Следует отметить, что, хотя рекомбинантные белки LT α -His₇ и LT β -His₆ могли быть выделены в растворимой форме только в присутствии 7 М

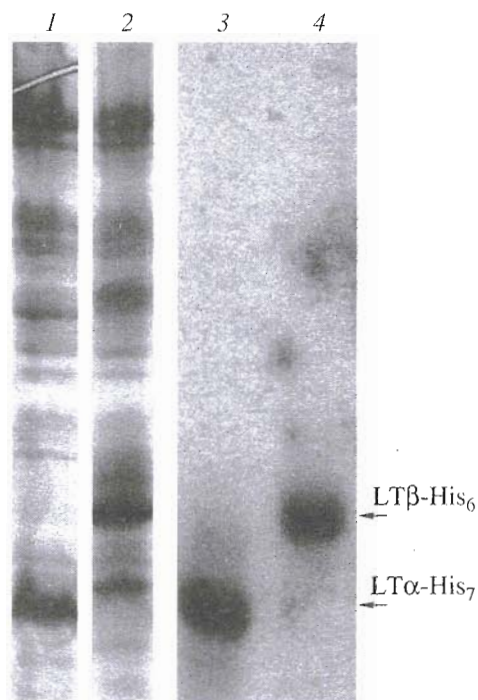


Рис. 2. Электрофорез в 13% SDS-ПААГ лизатов клеток *E. coli* M15 [pRep4], трансформированных плазмидой rmlLT22 (1) и клеток *E. coli* SG20050, трансформированных плазмидой rmlLTbHis (2), а также препаратов рекомбинантных белков LT α -His $_7$ (3) и LT β -His $_6$ (4), очищенных металлохелатной хроматографией.

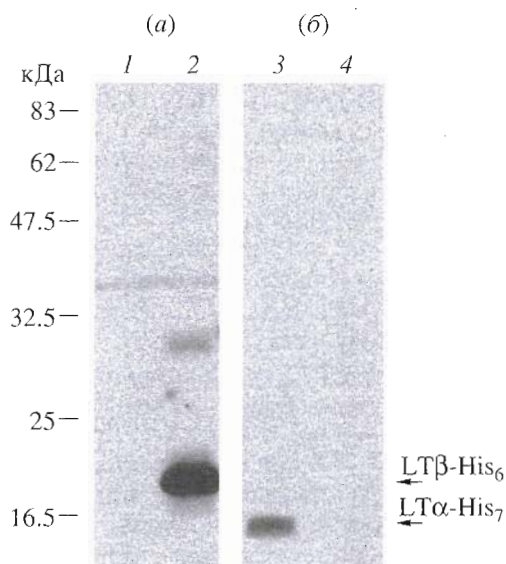


Рис. 3. Иммуноблоттинг с антителами к LT β -His $_6$ (а) и LT α -His $_7$ (б) лизатов клеток *E. coli* M15 [pRep4], трансформированных плазмидой rmlLT22 (1, 3) и клеток *E. coli* SG20050, трансформированных плазмидой rmlLTbHis (2, 4). Указано положение белков-маркеров молекулярной массы.

мочевины, они, как показали дальнейшие эксперименты, были пригодны для получения антител. Для этого их сначала высаживали этанолом, суспендировали в полном адъюванте Фрейнда и использовали для иммунизации. Сыворотки были протестированы на способность узнавать соответствующие рекомбинантные белки методом иммуноблоттинга. Оказалось, что антитела к внеклеточному домену LT β эффективно узнают рекомбинантный LT β -His $_6$, не реагируют с полным размерным LT α и TNF мыши (данные не представлены) и показывают очень слабую перекрестную реакцию с укороченным LT α -His $_7$. Соответственно антитела к LT α -His $_7$ эффективно узнают этот белок в иммуноблоттинге и не взаимодействуют с LT β -His $_6$ мыши (рис. 3).

Таким образом, нами получены специфические иммунологические реагенты на LT α и LT β мыши, которые являются кандидатами на узнавание нативного мембранного LT-комплекса. В дальнейшем мы планируем использовать эти антитела для детекции лимфотоксинов мыши.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали следующие материалы и реагенты: акриламид, бисакриламид, меркаптоэтанол, персульфат аммония, трис-гидроксиметиламинометан (Трис), *N,N,N,N*-тетраметилэтилендиамин (Merck, Германия); глицерин, додецилсульфат натрия, этилендиаминтетрауксусную кислоту, борную кислоту (Serva, Германия); триптон, дрожжевой экстракт, агар (Difco, Англия); агарозу (FMC, США); эндонуклеазы рестрикции *Kpn*I, *Nco*I, *Cla*I, а также ДНК-полимеразу из *Thermus aquaticus* и ДНК-лигазу фага T4 производства Life-Biotechnologies (США). Использовали штаммы *E. coli* M15 [pREP4] *recA*⁺ (*F*⁻, *lac*⁻, *ara*⁻, *gal*⁻, *mtl*⁻, *uvrA*⁺, *Nal*^S, *Str*^S, *rif*^S) фирмы Qiagen Inc. (США) и *E. coli* SG20050 *recA* [*F*⁻, *araD*139, Δ (*argF-lac*) U169, *flbB*5301, *deoC*1, *rpsL*150, *relA*1, Δ *lon*-100, *csp*-50::Mu dI] [21]. Приготовление компетентных клеток, трансформацию бактерий, выделение плазмидной ДНК, ферментативную обработку, электрофорез ДНК и белка, выделение РНК и иммуноблоттинг проводили по стандартным методикам [22]. Строение полученных плазмид подтверждали определением нуклеотидной последовательности участков ДНК с использованием набора для определения нуклеотидной последовательности фирмы USB (США). Для иммунодетекции использовали систему ECL (Amersham, Англия).

Для наработки белка LT α -His $_7$ клетки *E. coli* SG20050, содержащие плазмиду rmlLT22, выращивали в течение 18 ч при 37°C на LB-среде, содержащей 100 мкг/мл ампициллина.

Для индукции транскрипции гена, кодирующего внеклеточный домен LT β мыши, 100 мкл ночной культуры штамма *E. coli* M15 (или *E. coli* SG13007), содержащего плазмиду pRep4 с *lac*-репрессором и плазмиду pmuLT β His, инокулировали в 150 мл среды, содержащей 100 мкг/мл ампициллина, выращивали до достижения величины поглощения 0.6 при 550 нм, затем индуцировали добавлением IPTG до концентрации 0.25 мМ и продолжали культивирование в течение 6 ч при 37°C.

Для выделения белков, содержащих гистидиновый эпитоп, клетки из 1 л культуры осаждали центрифугированием (Sorvall RT6000B, 3500 об/мин, 15 мин) и разрушали в 30 мл 50 мМ фосфатного буфера (pH 7.5), содержащего 150 мМ NaCl и 0.1 мМ фенилметилсульфонилфторид, ультразвуком в течение 2 мин при 0°C пульсами по 5 с при выходной мощности 16 Вт на соникаторе Vibra-Cell (Sonic Materials Inc., США). Содержимое клеток отделяли центрифугированием (16000 об/мин). Осадок растворяли в 50 мл 6 М гуанидинхлорида (pH 7.5) и после осветления (18000 об/мин, 30 мин) наносили на колонку с 12 мл сефарозы 6B (Fast Flow, Sigma, США) с привитой иминодиуксусной кислотой, предварительно промытой 100 мл 0.1 М раствора NiSO $_4$. Колонку отмывали раствором 7 М мочевины (pH 7.5) и проводили хроматографию при помощи фронтальной элюции раствором 7 М мочевины с повышающейся кислотности по протоколу, описанному в работе [20]. Фракции анализировали при помощи электрофореза в SDS-ПААГ. Фракции, содержащие не менее 90% целевого белка, объединяли и хранили при 4°C.

Для иммунизации кроликов белок осаждали из раствора 7 М мочевины 80% этанолом, осадок промывали 90% этанолом, подсушивали на воздухе и суспендировали в стерильном фосфатно-солевом буфере. Иммунизацию проводили по модифицированной методике [23] в присутствии полного адъюванта Фрейнда LT (100 мкг белка на инъекцию). Иммунные сыворотки собирали через 3 недели после иммунизации.

Авторы выражают искреннюю благодарность В.В. Кравченко (Исследовательский институт Скриппс, Ла Хойя, США) и М.Б. Алимжанову (Институт медицинской микробиологии, иммунологии и гигиены, Мюнхен, Германия) за предоставление плазмид pmuLT и pmuLT β His.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки РФ (Государственная программа "Новейшие методы биоинженерии", раздел "Генная и клеточная инженерия", проект № 102). С.А. Недоспасов и Р.Л. Турецкая являются исследователями Медицинского института Говарда Хьюза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ruddle N.H., Waksman B.H. // Science. 1967. V. 157. P. 1060–1062.
2. Pennica D., Nedwin G.E., Hayflick J.S., Seeburg P.H., Derynck R., Palladino M.A., Kohr W.J., Aggrawal B.B., Goeddel D.V. // Nature. 1984. V. 312. P. 724–729.
3. Nedospasov S.A., Hirt B., Shakhov A.N., Dobrynin V.N., Kawashima E., Accolla R.S., Jongeneel C.V. // Nucl. Acids Res. 1986. V. 14. P. 7713–7725.
4. Nedospasov S.A., Shakhov A.N., Turetskaya R.L., Mett V.A., Azizov M.M., Georgiev G.P., Korobko V.G., Dobrynin V.N., Filipov S.A., Bystrov N.S., Boldyreva E.F., Chuvpilo S.A., Chumakov A.M., Shingarova L.N., Ovchinnikov Y.A. // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1986. V. 51. P. 611–624.
5. Browning J.L., Ngam-ek A., Lawton P., DeMarinis J., Tizard R., Chow E.P., Hession C., O'Brine-Greco B., Foley S.F., Ware C.F. // Cell. 1993. V. 72. P. 847–856.
6. Crowe P.D., van Arsdale T.L., Walter B.N., Ware C.F., Hession C., Ehrenfels B., Browning J.L., Din W.S., Goodwin R.G., Smith C.A. // Science. 1994. V. 264. P. 707–710.
7. De Togni P.J., Goellner N.H., Ruddle N.H., Streetter P.R., Fick A., Mariathasan A., Smith S.C., Carlson R., Shornick L.P.J.H., Russell J.H., Karr R., Chaplin D.D. // Science. 1994. V. 264. P. 703–707.
8. Koni P.A., Sacca R., Lawton P., Browning J.L., Ruddle N.H., Flavell R.A. // Immunity. 1997. V. 6. P. 491–500.
9. Alimzhanov M.B., Kuprash D.V., Kosco-Vilbois M.H., Luz A., Turetskaya R.L., Tarakhovskiy A., Rajewsky K., Nedospasov S.A., Pfeffer K. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. V. 94. P. 9302–9307.
10. Beutler B. // J. Investig. Med. 1995. V. 43. P. 227–235.
11. Aggarwal B.B., Henzel W.J., Moffat B., Kohr W.J., Harkins R.N. // J. Biol. Chem. 1985. V. 260. P. 2334–2344.
12. Browning J.L., Douglas I., Ngam-ek A., Bourdon P.R., Ehrenfels B.N., Miatkowski K., Zafari M., Yampaglia A.M., Lawton P., Meier W., Benjamin C.P., Hession C.J. // Immunol. 1995. V. 154. P. 33–46.
13. Seow H.-F., Goh C.R., Krishnan L., Porter A.G. // Biotechnology. 1989. V. 7. P. 363.
14. Schoenfeld H.J., Poeschi B., Frey J.R., Loetscher H., Hunziker W., Lustig A., Zulauf M. // J. Biol. Chem. 1991. V. 266. P. 3863–3869.
15. Коробко В.Г., Давыдов И.В., Добрынин В.Н., Пустошилова Н.М., Лебедев Л.Р., Гилева И.П., Петренко В.А. // Биоорг. химия. 1993. Т. 19. С. 414–419.
16. Li C.B.P.W., Gray P.F., Lin K.M., McGrath F.H., Ruddle N.H. // J. Immunol. 1987. V. 138. P. 4496–4501.
17. Шингарова Л.Н., Кашиян С.К., Петровская Л.Е., Петренко Л.А., Пустошилова Н.М., Синичкина С.А., Коробко В.Г. // Биотехнология. 1998. № 6. С. 24–35.

18. Lawton P.J., Nelson J., Tizard R., Browning J.L. // *J. Immunol.* 1995. V. 154. P. 239–246.
19. Pokholok D.K., Maroulakou I.G., Kuprash D.V., Alimzhanov M.B., Kozlov S.V., Novobrantseva T.L., Turetskaya R.L., Green J.E., Nedospasov S.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995. V. 92. P. 674–678.
20. Stueber D., Matile H., Garotta G. // *Immunological Methods* / Eds I. Lefcovits, P. Pernis. N.Y.: Acad. Press, 1990. V. IV. P. 121–152.
21. Trisler P., Gottesman S. // *J. Bacteriol.* 1984. V. 160. P. 184–191.
22. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
23. Carroll S.A., Laughon A. // *DNA Cloning*. Vol. III. A Practical Approach / Ed. D.M. Glover. Oxford–Washington DC: IRL Press, 1987. P. 89–112.

Heterologous Expression of Murine Lymphotoxins in *Escherichia coli* and the Preparation of Antibodies

V. G. Korobko*, ****, V. E. Boichenko**, ***, D. V. Kuprash**,
R. L. Turetskaya**, and S. A. Nedospasov**, ***, *****

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

** *Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences,
ul. Vavilova 32, Moscow, 117984 Russia*

*** *Belozersky Institute of Physicochemical Biology, Moscow State University,
Vorob'evy gory, Moscow, 119899 Russia*

**** *National Institute of Health, Frederick, MD, 21702 USA*

Genes encoding fragments of polypeptide chains of murine lymphotoxins (LT), namely, LT- α truncated from the *N*-terminus and the LT- β extracellular domain, containing *N*-terminal hepta- and hexahistidine epitopes, respectively, were expressed in *E. coli* cells. The recombinant proteins purified by metalchelate chromatography were used to obtain polyclonal antibodies that specifically recognize murine LT.

Key words: lymphotoxin- α (LT α), lymphotoxin- β (LT β), antibodies, recombinant proteins, expression in E. coli

[#] *To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 135-9964; e-mail: snedos@imb.imb.ac.ru.*