



УДК 577.112.088.3

МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ-ЦИТОКИНОВ IV. РЕНАТУРАЦИЯ РЕКОМБИНАНТНОГО ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ИНТЕРЛЕЙКИНА-3

© 2001 г. Р. В. Тихонов, С. Е. Печенов, А. И. Гуревич,
Р. С. Есипов, В. И. Швец*, А. Н. Вульфсон[#]

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

*Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова, Москва

Поступила в редакцию 18.08.2000 г. Принята к печати 13.09.2000 г.

Изучена и оптимизирована стадия ренатурации рекомбинантного человеческого интерлейкина-3, продуцированного в трансформированных клетках *E. coli* в составе тел включения. Показана важность удаления из раствора белка гидрофобных клеточных компонентов небелковой природы, вызывающих необратимую агрегацию белка в условиях ренатурации. Методом КД-спектроскопии установлено влияние pH среды на вторичную структуру денатурированного белка и найдено, что при оптимальном для ренатурации значении pH 8.5 белок обладает вторичной структурой, наиболее близкой к нативной. Выделение по предложенной схеме позволяет получить интерлейкин-3 с выходом 50%, чистотой 99% и биологической активностью 2×10^7 ед. акт./мг.

Ключевые слова: человеческий рекомбинантный интерлейкин-3; тела включения; ренатурация; гидрофобные клеточные компоненты; КД-спектроскопия; ВЭЖХ; тиол-дисульфидный обмен.

ВВЕДЕНИЕ

Интерлейкин-3 относится к одному из важнейших классов белков иммунной системы – лимфокинам. С помощью лимфокинов осуществляется кооперация, координация и регуляция функции клеток, участвующих в иммунном ответе. Механизм действия интерлейкина-3 исследуется до сих пор, но уже имеются данные о применении его как лекарственного препарата при лечении больных с недостаточностью функции костного мозга, вызванной прогрессирующими опухолевыми заболеваниями, лечении рака легких и апластической анемии [2, 3]. Потребность в достаточных количествах IL-3 для проведения медико-биологических испытаний сделала актуальной разработку метода его получения в препаративном масштабе.

В качестве источника для получения IL-3 мы использовали биомассу, выращенную на основе штамма *E. coli* ВКПМ В-6969, трансформирован-

ного рекомбинантной плазмидой рЗРТЕIL3, кодирующей IL-3. Получение плазмиды и трансформация ею клеток штамма-продуцента, а также выделение, очистка и идентификация IL-3 описаны в работах [4, 5]. Разработанная нами ранее методика выделения и очистки включает в себя солюбилизацию отмытых тел включения в гуанидингидрохлориде, ренатурацию белка при pH 8.5 с добавлением смеси окисленного и восстановленного глутатиона, очистку белка катионообменной хроматографией и лиофилизацию. Выход белка по этой методике в среднем не превышал 20–25%, в основном, из-за низкой эффективности стадии ренатурации и низкой воспроизводимости методики. Цель настоящей работы – изучение и оптимизация стадии ренатурации IL-3.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Низкая эффективность стадии ренатурации была обусловлена агрегированием значительно количества IL-3 и выпадением его в осадок. Причиной агрегации чаще всего является межмолекулярное взаимодействие экспонированных гидрофобных участков белковых глобул [6]. Наиболее заметно степень агрегации зависит от кон-

Сообщение III см. [1].

Сокращения: IL-3 – рекомбинантный человеческий интерлейкин-3; офВЭЖХ – обращенно-фазовая ВЭЖХ.

[#]Автор для переписки (тел.: (095) 330-72-74; e-mail: wan@ibch.ru).

центрации белка, температуры и значения pH. На стадии ренатурации агрегация рекомбинантных белков может быть также обусловлена их взаимодействием с гидрофобными компонентами клетки, которые переходят в раствор вместе с белком при солюбилизации тел включения. Молекула IL-3 представляет собой четырехспиральный узел с гидрофобной сердцевиной [7], формированию которой в ходе ренатурации могут препятствовать гидрофобные взаимодействия с небелковыми компонентами клетки.

Для освобождения от этих компонентов был использован найденный нами простой способ удаления гидрофобных примесей на носителе Н-γ-геле, удерживающем гидрофобные соединения и инертном по отношению к гидрофильным молекулам [8]: После введения такой стадии предпочистки потери белка вследствие преципитации были незначительны и выход ренатурированного IL-3 значительно возрос.

Другими факторами, влияющими на выход ренатурированного белка являются pH, способ образования дисульфидной связи, температура среды и концентрация белка.

Величина pH и природа буферного раствора влияют на общий заряд, соотношение числа нейтральных и заряженных участков полипептидной цепи, степень их взаимодействия, т.е. на характеристики, определяющие вторичную структуру и конформацию молекулы. Одним из распространенных методов изучения вторичной структуры белков является КД-спектроскопия. Мы предположили, что изучение вторичной структуры денатурированного белка в зависимости от pH и сравнение этой структуры с нативной позволит найти оптимальный pH для ренатурации. Непосредственное снятие спектра солюбилизованного белка после предпочистки невозможно по причине его недостаточной чистоты. Для проведения экспериментов мы использовали полученный по методике [5] IL-3, денатурированный затем обработкой 2-меркаптоэтанолом в 8 М мочеvine. Анализ КД-спектров денатурированного IL-3, снятых при разных pH, показал, что вторичная структура белка наиболее близка к нативной при pH 8.5 (рис. 1), что позволяет считать это значение pH оптимальным. Подтверждение правильности результата было получено позже при анализе образцов IL-3, ренатурированных при различных pH, с помощью офВЭЖХ (рис. 2).

Ренатурация белков *in vitro*, сопровождаемая замыканием дисульфидных связей, проходит при определенном потенциале, создаваемом окислительно-восстановительными агентами, такими, как окисленный и восстановленный глутатион, цистин и цистеин и т.п. или их комбинациями. IL-3 со-

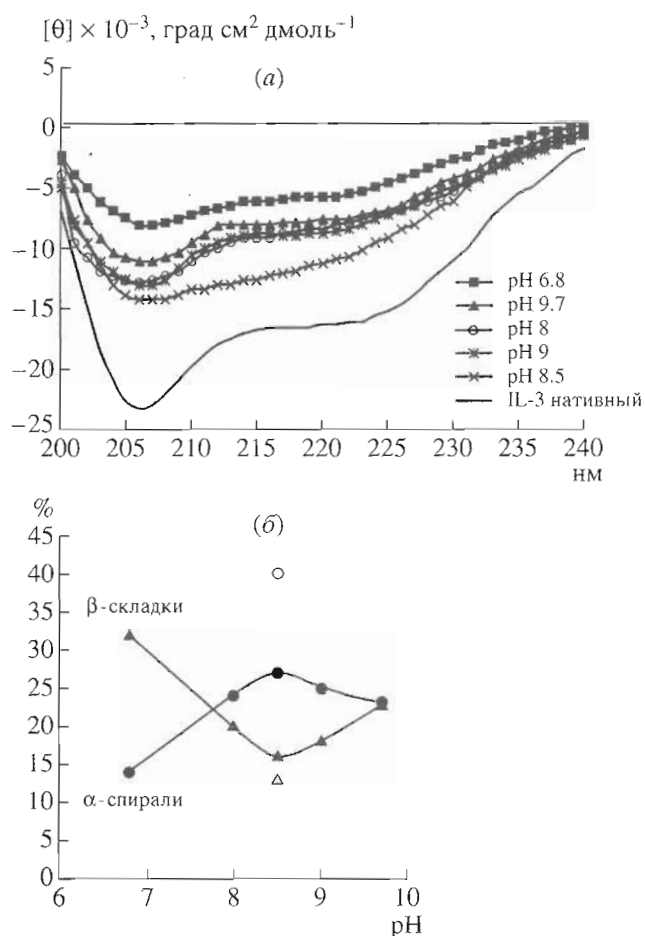


Рис. 1. Зависимость вторичной структуры денатурированного IL-3 от pH. *a* – КД-спектры денатурированного IL-3 при разных pH в сравнении с нативным белком; *б* – содержание α-спиральной и β-складчатой структуры (незакрашенные символы соответствуют содержанию соответствующей структуры в нативном белке).

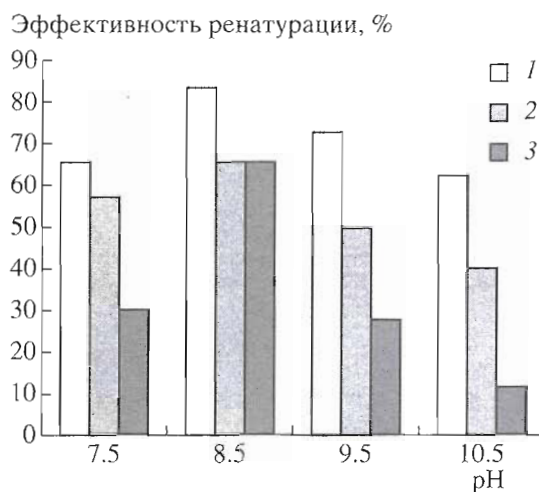


Рис. 2. Эффективность ренатурации IL-3 при разных pH (при 8°C) без цистина (1), в присутствии 2 (2) и 4 мМ цистина (3) (по данным офВЭЖХ).

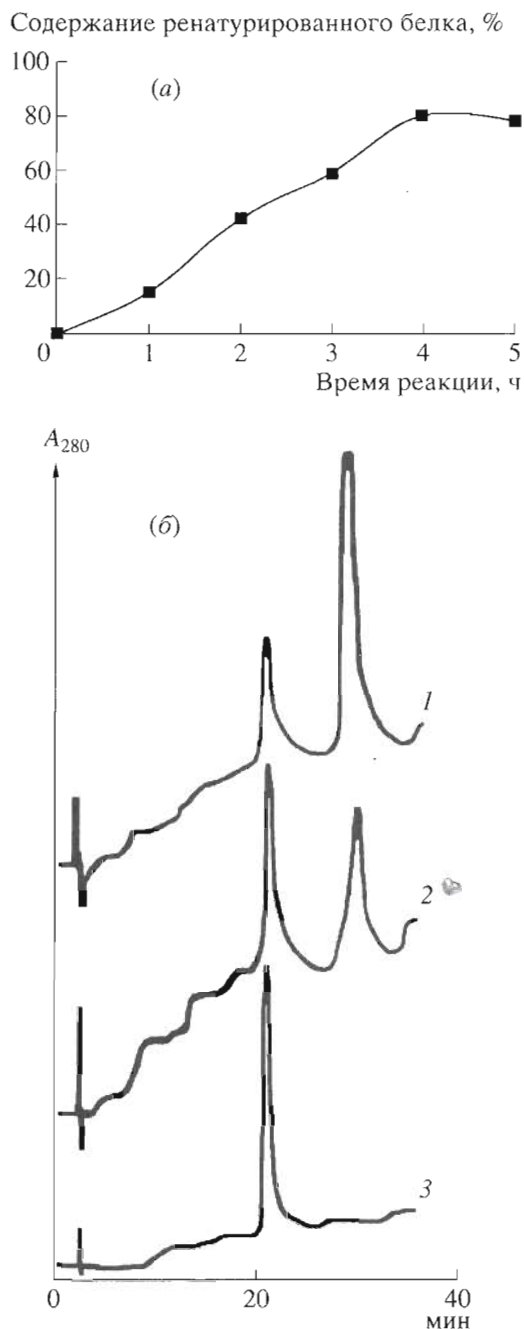


Рис. 3. Кинетика ренатурации IL-3 в оптимальных условиях (см. "Эксперимент. часть") (а); офВЭЖХ реакционной смеси через 1 (1) и 2 ч (2); 3 – ренатурированный и очищенный IL-3 (см. "Эксперимент. часть") (б).

держит одну дисульфидную связь [4]. Остатки цистеина в IL-3 в составе тел включения существуют в виде свободных тиолов, что подтверждается реакцией Эллмана [9]. Для предотвращения их окисления кислородом воздуха до стадии ренатурации во все растворы белка добавляли 2-меркаптоэтанол до концентрации 10 мМ. При исследова-

нии различных способов образования дисульфидной связи были получены примерно одинаковые результаты. В итоге мы использовали наиболее простой способ – окисление остатков цистеина кислородом воздуха. Образование дисульфидной связи происходит при снижении концентрации 2-меркаптоэтанол до 2 мМ путем разбавления раствора тел включения (после стадии предпочистки) буферным раствором. Добавление цистина привело к снижению выхода ренатурированного белка (рис. 2). Цистин инициирует дисульфидный обмен, служащий способом репарации неприродно замкнутых связей. Дисульфидный обмен в данном случае увеличивает долю олигомеров, т.к. внутримолекулярное перезамыкание дисульфидной связи не приводит к новым продуктам, а возможное межмолекулярное перезамыкание ведет к агрегации и выводу молекул из реакции из-за преципитации.

Дополнительное повышение выхода ренатурированного белка было достигнуто при понижении температуры ренатурации с 20 до 8°C. Нативная конформация белка является наиболее термодинамически выгодной, поэтому при понижении температуры образование нативной структуры предпочтительно. При этом также уменьшается риск потери белка в результате его расщепления примесями клеточных ферментов, протеолитическая активность которых заметно падает при понижении температуры.

В результате проведенных экспериментов была также найдена оптимальная концентрация буферного компонента – 20 мМ Трис-НСl, оптимальная концентрация белка – 1 мг/мл, и исследована кинетика ренатурации. Анализ реакционной смеси с помощью офВЭЖХ показал, что ренатурация завершается за 4–5 ч (рис. 3). На рис. 3 приведены также промежуточные хроматограммы, демонстрирующие переход денатурированного IL-3 в ренатурированный.

Заключительную стадию очистки ренатурированного IL-3 проводили с помощью катионообменной хроматографии на SP-Toyopearl 650M. Результаты получения IL-3 в препаративном масштабе приведены в таблице. Биологическая активность полученного белка составила 2×10^7 ед. акт./мг [4]. КД-спектр полученного IL-3 совпадает с известным [10].

Таким образом, удаление гидрофобных клеточных компонентов, предотвращающих агрегацию, и оптимизация процесса ренатурации позволили достичь высокого выхода при получении IL-3 в препаративном масштабе.

Результаты выделения и очистки IL-3

Стадия выделения	Суммарный белок, мг	IL-3, мг	Чистота, % (по данным SDS-гель-электрофореза)	Выход, %
Дезинтеграция	750	255	34	100
Отмывка и солюбилизация тел включения	375	225	60	88
Предочистка на Н-γ-геле	338	220	65	86
Ренатурация	208	160	77	63
Хроматография на SP-Тоуорpearl 650M	141	140	99	55
Обессоливание	128	127	99	50

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы реактивы: ацетонитрил (ос. ч. для жидкостной хроматографии), ацетат аммония (ос. ч.), натрий фосфорнокислый двузамещенный (ч.д.а.), мочеви́на (ос.ч.), гидроксид натрия (ч.д.а.), хлорид натрия (ч.д.а.), соляная кислота (ч.д.а.), лимонная кислота (ос.ч.) отечественного производства; додецилсульфат натрия, Тритон X-100, Трис (Serva, Германия), EDTA (Boehringer, Германия), 2-меркаптоэтанол, акриламид, *N, N'*-метиленбисакриламид, персульфат аммония, TEMED, TFA, кумасси R-250, кумасси G-250 (Sigma, США); набор белков-стандартов для электрофореза и гель-фильтрации (Pharmacia, Швеция), вода, очищенная на установке MilliQ (Millipore, США); отечественный хроматографический сорбент Н-γ-гель (ВНИИОЧБ, Санкт-Петербург; совместная разработка с ИБХ РАН); сефадекс G-25 Superfine (Pharmacia, Швеция), SP-Тоуорpearl 650M (Tosoh, Япония).

Биомасса штамма *E. coli* ВКПМ В-6969 рЗРТЕ2IL3 выращена в группе микробиологии лаборатории биотехнологии с комплексной опытной установкой ИБХ РАН.

Дезинтеграция биомассы. Отделенные центрифугированием из 300 мл культуральной жидкости и промытые буферным раствором (50 мМ натрийфосфат, pH 8.5, 0.2 М NaCl, 10 мМ EDTA) клетки биомассы *E. coli* (5 г) с содержанием IL-3 34% суммарного клеточного белка (по данным SDS-гель-электрофореза в ПААГ), суспендировали в 50 мл того же буферного раствора. Клетки разрушали при обработке суспензии ультразвуком 4 раза по 5 мин при 60% мощности прибора (Sonifier 250, Branson, США) в ледяной бане с перерывами на охлаждение. Тела включения отделяли центрифугированием в течение 20 мин при 5000 g (Labofuge A, Heraeus, Германия).

Отмывка и солюбилизация тел включения. Осадок ресуспендировали в 50 мл того же буферного раствора, суспензию центрифугировали в тех же условиях. Осадок отмывали, как описано выше, 50 мл 50 мМ натрийфосфатом (pH 8.5) с 10 мМ EDTA и 1% Тритоном X-100 (2 раза), 50 мл 50 мМ натрийфосфатом (pH 8.5) с 10 мМ EDTA и 5 М мочевиной (1 раз) и 50 мл 50 мМ натрийфосфатом (pH 8.5) (1 раз).

Полученный осадок, содержащий IL-3 в составе тел включения, растворяли в 100 мл буферного раствора (pH 5.0), содержащего 30 мМ лимонную кислоту, 8 М мочеви́ну и 10 мМ 2-меркаптоэтанол. Для лучшего растворения суспензию озвучивали в течение 1-2 мин при 40% мощности прибора.

Предочистка на Н-γ-геле. Раствор тел включения (110 мл) наносили (4 мл/мин) на колонку с Н-γ-гелем (2.5 × 3 см), промытую и уравновешенную буферным раствором (pH 5.0), содержащим 30 мМ лимонную кислоту, 5 М мочеви́ну и 10 мМ 2-меркаптоэтанол. Под контролем УФ-детектора (λ 280 нм) собирали несорбируемые вещества.

Ренатурация. Полученный элюат несорбируемых веществ, содержащий IL-3, после доведения pH до 8.5 1 М NaOH разбавляли буферным раствором, содержащим 20 мМ Трис-HCl (pH 8.5) в пять раз (до концентрации белка 1 мг/мл и 2-меркаптоэтанол до 2 мМ), охлаждали до 8°C и оставляли в открытом стакане при перемешивании на 5 ч. Содержание ренатурированного белка контролировали офВЭЖХ-анализом реакционной смеси.

Хроматографическая очистка IL-3. После ренатурации pH раствора доводили до 5.0 1 М HCl и наносили его на колонку с SP-Тоуорpearl 650M (1.5 × 5 см), промытую и уравновешенную 20 мМ лимонной кислотой (pH 5.0). Элюцию IL-3 (2 мл/мин) проводили в линейном градиенте NaCl (0–0.5 М) в том же буферном растворе (общий объем 400 мл). Фракции, содержащие IL-3, чистотой не менее 99% (по данным SDS-гель-электрофореза и офВЭЖХ) собирали (60 мл) и подвергли гель-фильтрации через колонку с сефадексом G-25 Superfine (2.5 × 80 см), уравновешенную 30 мМ аммоний-ацетатным буферным раствором (pH 5.0). Элюцию (2 мл/мин) проводили тем же буферным раствором; фракции, содержащие IL-3, объединяли и лиофилизовали. Полученный лиофилизованный белок хранили при –20°C.

Аналитическую офВЭЖХ проводили на колонке Delta Pak C18 (4 × 150 мм) (Waters, США) с помощью прибора фирмы Beckman (США), состоящего из двух насосов 110В, инжектора 210А, контроллера градиента 406, УФ-детектора 160 и интегратора 740 (Waters, США). Элюцию проводили в градиенте концентрации ацетонитрила

(30–45% за 30 мин) в присутствии 0.1 % ТФА при скорости потока 0.7 мл/мин. Детекция при 280 нм.

SDS-гель-электрофорез выполняли по методу Лэммли [11] в пластинах (6.0 × 8.5 × 0.08 см) 12.5% ПААГ в присутствии 0.1% SDS с нагрузкой 10 мкг белка на дорожку. Содержание IL-3 в различных препаратах определяли в гелях, окрашенных ку-масси R-250, сканированием на денситометре Ultrosan XL (Pharmacia, Швеция).

КД-спектры получены с помощью спектрополяриметра 500С (Jasco, Япония) в кюветках длиной 0.01 см в лаборатории спектрального анализа ИБХ РАН. Для снятия спектров денатурированного белка при различных рН навески лиофилизованного IL-3 растворяли в 8 М мочеvine, содержащей 100 мМ 2-меркаптоэтанол, инкубировали раствор при 40°C в течение 1 ч, затем раствор разбавляли в 8 раз 50 мМ натрийфосфатом с соответствующим значением рН и инкубировали 2 ч при 4°C. Концентрация белка 0.5 мг/мл. Для сравнения снимали спектр ренатурированного IL-3 той же концентрации в 30 мМ Трис (рН 8.5), содержащем 1 М мочеvinу. Расчет процентного содержания α -спиральной, β -складчатой и неупорядоченной структуры проводили с использованием программы K2D (<http://www.embl-heidelberg.de>; <http://www.kal-el.ugr.es/k2d/k2d.html>). Алгоритм программы приведен в работах [12, 13].

Концентрацию белка в растворах определяли по методу Бредфорд [14].

Авторы выражают благодарность Костроминой Т.И. за культивирование биомассы трансформированных клеток, Москвиной С.М. за участие в экспериментах, Якимову С.А. за проведение анализов оФВЭЖХ, Белачеу И.А. и Юнда И.П. за

электрофоретический анализ, Куделиной И.А. за снятие КД-спектров.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 00-15-97947).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Klyushnichenko V.E., Tikhonov R.V., Pechenov S.E., Yakimov S.A., Shingarova L.N., Korobko V.G., Wulfson A.N. // *Protein Expr. Purif.* 1998. V. 14. P. 261–266.
2. Gianella-Borradori A. // *Stem Cells (Dayt)*. 1994. V. 12. P. 241–248.
3. Newland A.C. // *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1996. V. 38. P. 83–88.
4. Луценко С.В., Гуревич А.И., Каневский В.Ю., Смирнов В.А., Назимов И.В., Ажикина Т.Л., Чернов И.П., Ростопищев В.М., Солина Н.В., Ажаев А.В. // *Биоорганическая химия*. 1991. Т. 17. С. 1649–1654.
5. Гуревич А.И., Качалина Т.А., Мирошников А.И., Свердлов Е.Д., Ажикина Т.А., Ростопищев В.М., Есипов Р.С., Вульфсон А.Н., Тихонов Р.В., Костромина Т.И. // *Пат. РФ № 2099421*. 1997.
6. De Bernardes Clark E., Hevehan D., Szela S., Maachupalli-Reddy J. // *Biotechnol. Prog.* 1998. V. 14. P. 47–54.
7. Feng Y., Klein B. K., McWherter C. A. // *J. Mol. Biol.* 1996. V. 259. P. 524–541.
8. Вульфсон А.Н., Тихонов Р.В., Печенов С.Е., Ключиниченко В.Е., Мирошников А.И. // *Биоорганическая химия*. 1997. Т. 23. С. 721–726.
9. Ellman G.L. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1959. V. 82. P. 70–77.
10. Freeman J.J., Parr G.R., Hecht R.I., Morris J.C., McKearn J.P. // *Int. J. Biochem.* 1991. V. 23. P. 353–360.
11. Laemmli U.K. // *Nature*. 1970. V. 227. P. 680–685.
12. Andrade M.A., Chacon P., Merelo J.J., Moran F. // *Protein Eng.* 1993. V. 6. P. 383–390.
13. Merelo J.J., Andrade M.A., Prieto A., Moran F. // *Neurocomputing*. 1994. V. 6. P. 1–12.
14. Bradford M.M. // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248–254.

Methods of Preparation of Recombinant Cytokines.

IV. Renaturation of Recombinant Human Interleukin-3

R. V. Tikhonov*, S. E. Pechenov*, A. I. Gurevich*, R. S. Esipov*, V. I. Shvets**, and A. N. Wulfson**

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

**Lomonosov Moscow State Academy of Fine Chemical Technology, Moscow, Russia

Renaturation of recombinant human interleukin-3 produced as inclusion bodies in the transformed cells of *Escherichia coli* was studied and optimized. Importance was shown of removing from the protein solution the hydrophobic cellular components causing irreversible aggregation of the protein under renaturation conditions. An effect of pH on the secondary structure of the denatured protein was revealed by CD spectroscopy. It was thereby found that at pH 8.5, which is the optimal value for denaturation, the protein has the secondary structure most close to the native one. The isolation according to the scheme proposed allows preparation of interleukin-3 in 50% yield with 99% purity and biological activity 2×10^7 U/mg.

Key words: CD spectroscopy, HPLC, hydrophobic cellular components, inclusion bodies, recombinant human interleukin-3, renaturation, thiol–disulfide exchange

* To whom correspondence should be addressed; phone: +7 (095) 330-7274; e-mail: wan@ibch.ru.

For the full text of English translation of this article, see *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2001, vol. 27, no. 1. It is also available (free) in PDF format through the Web Site <http://www.maik.rssi.ru/>.