



УДК 577.112:577.214.622

## ШАПЕРОН Caf1M СТАБИЛИЗИРУЕТ ГИБРИДНЫЕ БЕЛКИ, СОДЕРЖАЩИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ СУБЪЕДИНИЦЫ F1-АНТИГЕНА *Yersinia pestis*

© 2001 г. Л. Е. Петровская, Е. А. Крюкова, А. Л. Каюшин, В. Г. Коробко<sup>#</sup>Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 23.11.2000 г. Принята к печати 01.02.2001 г.

Поверхностная оболочка возбудителя чумы *Yersinia pestis* представляет собой гомополимер белка Caf1. Экспорт субъединиц происходит при участии периплазматического шаперона Caf1M. Для изучения механизма его функционирования были сконструированы два гена гибридных белков, включающих сигнальную последовательность Caf1, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) человека или рецепторный антагонист интерлейкина-1 (IL-1ra) человека и зрелый Caf1, и исследована их экспрессия в различных штаммах *Escherichia coli*. Показано, что в отсутствие шаперона Caf1M большая часть молекул Caf1 в составе гибридных белков подвергается в периплазме протеолизу, предположительно при участии протеиназы DegP. При коэкспрессии гена шаперона Caf1M доля полноразмерной формы обоих гибридных белков в периплазматическом пространстве значительно увеличивается, что, вероятно, объясняется стабилизацией пространственной структуры субъединицы и повышением ее устойчивости в составе гибрида. В клетках штамма JCB571, дефектного по гену периплазматической дисульфидизомеразы DsbA, аналогичного эффекта не наблюдается, поскольку шаперон находится в неактивном состоянии из-за отсутствия дисульфидной связи в его молекуле.

**Ключевые слова:** капсульный антиген Caf1; шаперон Caf1M; GM-CSF; IL-1ra; секреция; гибридные белки.

### ВВЕДЕНИЕ

Процесс формирования поверхностных структур прокариотических клеток представляет большой интерес как с теоретической, так и с практической точки зрения. Взаимодействие пилей грамотрицательных бактерий, в частности некоторых патогенных штаммов *Escherichia coli*, с эпителиальной тканью играет ключевую роль в развитии многих распространенных заболеваний [1, 2]. Наряду с этим, экспорт субъединиц пилей и их полимеризация обеспечиваются серией межбелковых взаимодействий, изучение которых имеет универсальное значение для понимания механизмов самосборки клеточных органелл.

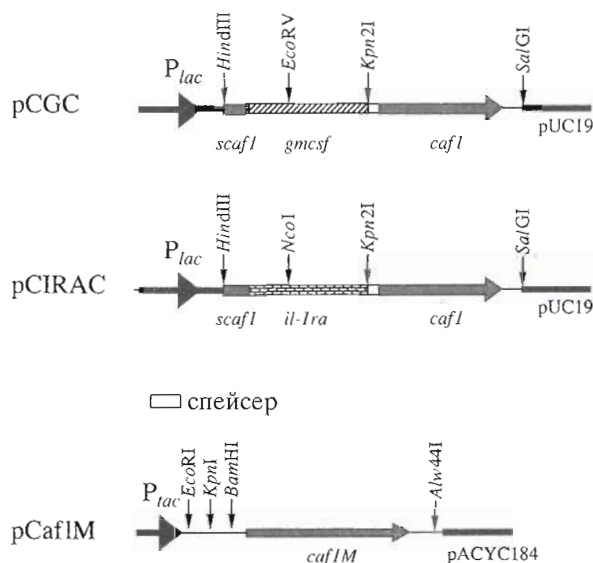
Пили патогенных штаммов *E. coli* – это сложные палочковидные структуры, состоящие из субъединиц нескольких типов, например, PapA, PapE, PapF, PapG, PapH и PapK в случае P-пилей [3]. Более просто устроена поверхностная оболочка возбудителя чумы *Yersinia pestis*, которая представляет собой гомополимер поверхностно-

го антигена F1 (Caf1) [4]. Аналогичная капсула формируется на поверхности клеток *E. coli*, в которых экспрессируется соответствующий оперон *Y. pestis*, включающий в себя гены субъединицы Caf1, шаперона Caf1M и белка-привратника Caf1A [5].

Подобно другим секретлируемым белкам Caf1 синтезируется в виде предшественника с сигнальной последовательностью, которая отщепляется в процессе транспорта через плазматическую мембрану. В периплазматическом пространстве происходит образование комплекса этого белка с шапероном Caf1M [6]. Показано, что Caf1M обладает структурной гомологией с шаперонами PapD и FimC, выполняющими сходную функцию в процессе формирования P-пилей и пилей 1-го типа [7]. Молекулы этих шаперонов имеют форму бумеранга, образованного двумя иммуноглобулин-подобными доменами [8]. В углублении между ними происходит связывание C-концевого пептида соответствующей субъединицы, имеющего длину 15–20 а.о. При этом взаимодействующие остатки шаперона и субъединицы образуют ряд водородных связей (структура типа бета-молнии) [9]. Формирование такого комплекса способствует правильному сворачиванию субъединиц и предохраняет их от агрегации [10].

Сокращения: GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор; Caf1 – капсульный антиген F1 *Y. pestis*; IL-1 – интерлейкин-1; ra – рецепторный антагонист; IPTG – изопропил-β-тиогаляктопиранозид.

<sup>#</sup>Автор для переписки (e-mail: korobko@mail.ibch.ru).



**Рис. 1.** Схемы строения полученных в работе плазмид. *gmcsf*, *il-1ra*, *caf1* – гены соответствующих белков (см. сокращения); *scaf1* – фрагмент ДНК, кодирующий сигнальную последовательность Caf1.

Гомология между структурами шаперонов Caf1M и PapD, а также сходство C-концевого пептида Caf1 и субъединиц P-пилей позволяет предположить, что в процессе экспорта мнимомеров капсулы *Y. pestis* Caf1M выполняет функции, аналогичные функциям PapD в процессе формирования P-пилей. Действительно, в отсутствие шаперона или в условиях, когда он неактивен, количество Caf1 в периплазматическом пространстве *E. coli* существенно снижается [11].

Для изучения причин зависимости количества Caf1 в периплазме от наличия шаперона Caf1M мы сконструировали два гена гибридных белков, включающих зрелый Caf1 и его сигнальную последовательность, а также гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) человека или рецепторный антагонист интерлейкина-1 (IL-1ra) человека, и исследовали экспрессию этих генов в различных штаммах *E. coli*.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Строение генов гибридных белков.** Гибридные белки широко используются в молекулярной биологии как инструмент для изучения процесса биосинтеза рекомбинантных белков, в частности, фолдинга белков после транслокации в периплазматическое пространство. Исследуемый гибридный белок при этом должен обладать каким-либо легко детектируемым признаком, позволяющим вести мониторинг. Для изучения свойств F1-антигена *Y. pestis* в качестве одной из частей, составляющих гибридные белки, мы выбрали цитокины человека GM-CSF и IL-1ra, поскольку проблема

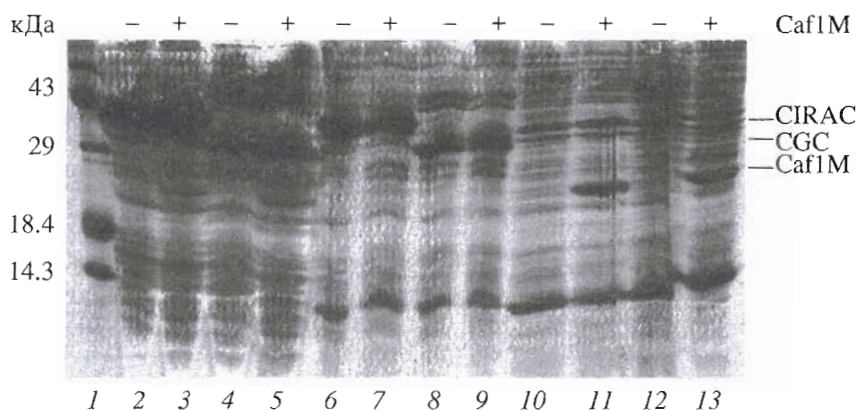
правильной укладки этих белков при экспрессии в клетках бактерий представляет не только теоретический, но также большой практический интерес.

Из работ, посвященных изучению процесса сборки пилей патогенных штаммов *E. coli* [9, 10], а также из результатов компьютерного моделирования комплекса Caf1 с Caf1M [11] было известно, что одним из участков связывания шаперона является C-концевой пептид субъединицы. Это определило порядок расположения составных частей генов гибридных белков – ген *gmcsf* (или *il-1ra*) в 5'-концевой части, ген *caf1* – в 3'-концевой. Их последовательности были объединены при помощи фрагмента ДНК, кодирующего гибкий пептидный спейсер  $(Gly_4Ser)_3$ . Для транспорта гибридных белков в периплазму в 5'-концевой части гибридных генов мы поместили кодирующую последовательность сигнального пептида Caf1. Ранее нами было показано, что этот пептид обеспечивает правильный процессинг и транслокацию через внутреннюю мембрану клеток *E. coli* рекомбинантного GM-CSF человека [12].

Таким образом, на основе вектора pUC19 были получены рекомбинантные плазмиды pCGC и pCIRAC, содержащие искусственные гены двух гибридных белков под контролем *lac*-промотора (рис. 1): первая плаزمида (pCGC) кодирует сигнальную последовательность Caf1, GM-CSF с N-концевой аминокислотной заменой (Pro2Ala3 на Asp), спейсер  $(Gly_4Ser)_3$  и зрелый Caf1 (гибридный ген *sgc*); вторая плазмида (pCIRAC) вместо гена GM-CSF содержит ген, кодирующий рецепторный антагонист IL-1 с заменой на N-конце (AlaAspAsp вместо Arg1; гибридный ген *cirac*). Произведенные нами замены на N-конце GM-CSF и IL-1ra были направлены на нейтрализацию суммарного положительного заряда этой части зрелых белков, который в случае ряда других белков затрудняет секрецию [13, 14]. Установлено, что замены или делеции в этой области не оказывают существенного влияния на структуру и биологическую активность указанных цитокинов [15, 16].

### Экспрессия гибридных генов в клетках *E. coli*.

Для экспрессии гибридных генов на первом этапе мы использовали клетки *E. coli* JM101. Электрофорез по Лэммли лизатов клеток, трансформированных плазмидой pCIRAC или pCGC, показал, что в результате индукции *lac*-промотора IPTG в них происходит накопление гибридных белков, молекулярная масса которых соответствует расчетной для процессированных продуктов экспрессии (35 и 31 кДа соответственно, рис. 2, дорожки 2, 4). В индуцированных клетках, трансформированных плазмидой pCaf1M (рис. 1) совместно с pCIRAC или pCGC, наблюдается совместный синтез гибридных белков и шаперона Caf1M (рис. 2, дорожки 3, 5). При фракционировании клеток об-



**Рис. 2.** Анализ экспрессии гибридных генов в клетках *E. coli* штамма JM101, трансформированных плазмидой pCGC (дорожки 4, 5, 8, 9, 12, 13), в том числе совместно с плазмидой pCaf1M (дорожки 5, 9, 13), и плазмидой pCIRAC (дорожки 2, 3, 6, 7, 10, 11), в том числе совместно с плазмидой pCaf1M (дорожки 3, 7, 11), электрофорезом в 13% ПААГ. 1 – маркеры молекулярной массы; 2–5 – суммарный клеточный белок; 6–9 – фракция нерастворимых клеточных белков; 10–13 – фракция растворимых клеточных белков; + указывает присутствие в периплазме клеток шаперона Caf1M.

наружилось, что оба гибрида практически целиком находятся во фракции нерастворимых белков независимо от присутствия в клетке шаперона (рис. 2, дорожки 6–13).

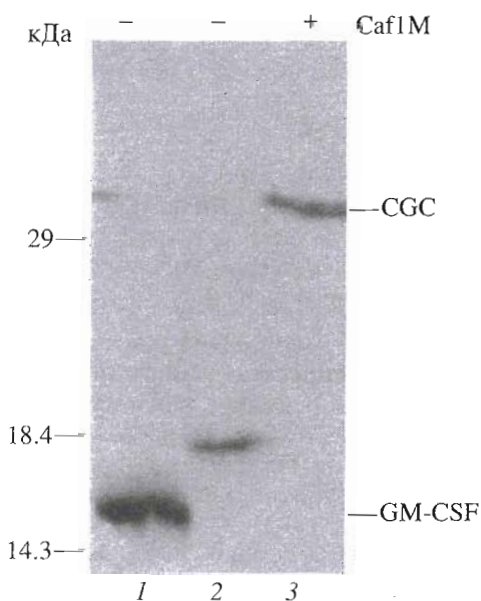
Ранее [12] нами был сконструирован искусственный ген гибридного предшественника, состоящего из GM-CSF и сигнальной последовательности Caf1. Его экспрессия в клетках *E. coli* сопровождалась процессингом и транспортом зрелого белка в периплазматическое пространство клетки. Однако значительная часть GM-CSF, как было показано нами [12] и другими авторами [17], после отщепления сигнальной последовательности остается в связанном с внутренней мембраной нерастворимом состоянии. Причиной этого предположительно является преждевременное (до завершения освобождения из мембраны) сворачивание молекул цитокина, амфипатическая природа которого допускает существование конформаций с повышенным сродством к липидному окружению [18].

В процессе транслокации сконструированных нами гибридных белков их C-концевая часть, соответствующая Caf1, также, по-видимому, вносит определенный вклад в связывание с мембраной. Аналогичное явление улавливания внутренней клеточной мембраной было обнаружено при синтезе не связанных с шапероном и, следовательно, имеющих экспонированные гидрофобные поверхности, субъединиц Р-пилей [10].

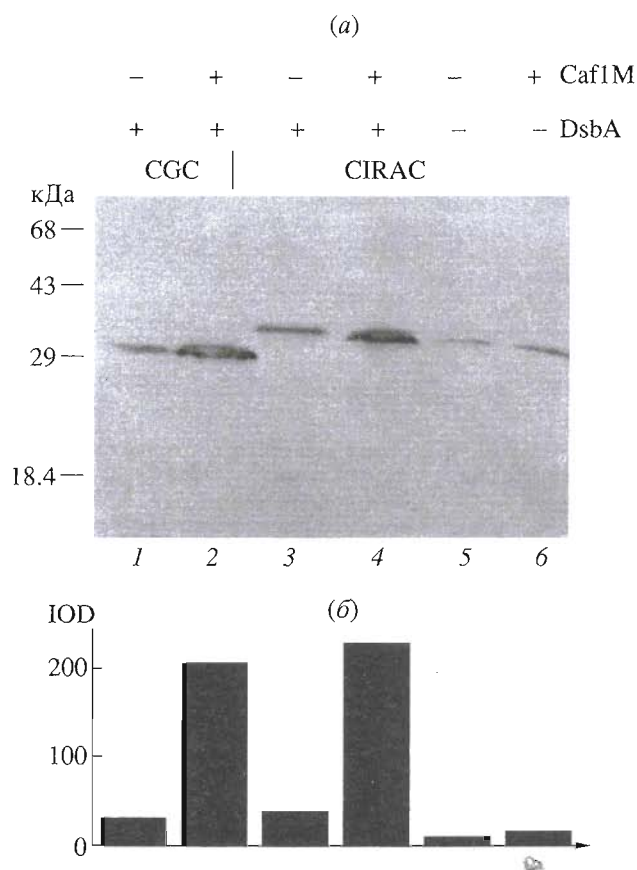
**Влияние шаперона Caf1M на экспрессию гена гибридного белка CGC.** С целью более тщательного изучения периплазматической фракции клеток *E. coli*, экспрессирующих гибридный ген *gsc*, был проведен иммуноблотинг белков этой фракции с антителами к GM-CSF. При этом был выявлен белок с молекулярной массой около 18 кДа, тогда как полноразмерный гибридный белок

практически отсутствовал (рис. 3, дорожка 2). Этот белок не взаимодействует с антителами к Caf1 (рис. 4, дорожка 1), из чего следует, что он представляет собой продукт протеолитической деградации гибрида в периплазматическом пространстве, причем участок, подвергающийся расщеплению, является частью Caf1.

При одновременной экспрессии гена шаперона Caf1M в исследуемой фракции появляется белок, имеющий массу 31 кДа (рис. 3, дорожка 3). Использование для анализа более чувствитель-



**Рис. 3.** Иммуноблотинг с антителами к GM-CSF образцов периплазматической фракции индуцированных клеток штамма JM101, трансформированных плазмидами pFGM13 (контроль экспрессии гена *gmscf* (1), pCGC (2), pCGC + pCaf1M (3)).



**Рис. 4.** Иммуноблоттинг (а) с антителами к Caf1 образцов периплазматической фракции индуцированных клеток штаммов JM101 (1, 2), JCB570 (3, 4) и JCB571 (5, 6), трансформированных рCGC (1), рCGC + рCaf1M (2), рCIRAC (3, 5), рCIRAC + рCaf1M (4, 6) и диаграмма (б) интегрированной оптической плотности (IOD) полос в каждой дорожке (получена А.В. Завьяловым с помощью MCID Image Analyzer в Университете г. Турку, Финляндия).

ных антител к Caf1 позволило обнаружить полно-размерный процессированный белок CGC в обоих случаях, однако при коэкспрессии шаперона Caf1M его количество в периплазме увеличивается примерно в 10 раз (рис. 4, дорожки 1, 2).

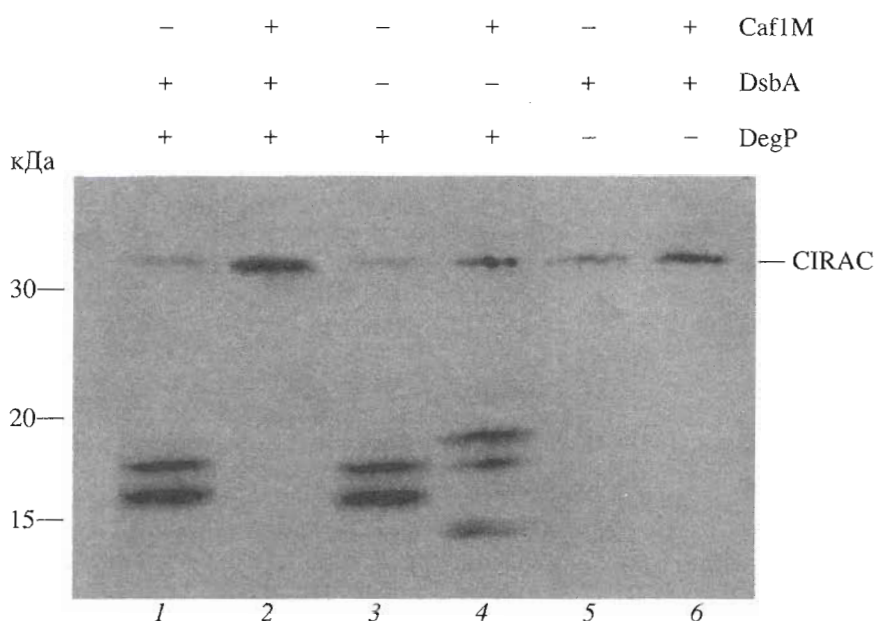
**Влияние шаперона Caf1M и дисульфидизомеразы DsbA на экспрессию гена гибридного белка CIRAC.** Чтобы определить влияние как шаперона Caf1M, так и периплазматической дисульфидизомеразы DsbA на биосинтез гибридного белка CIRAC, мы исследовали экспрессию кодирующего его гибридного гена в клетках двух изогенных штаммов *E. coli* JCB570 и JCB571, дефектного по гену *dsbA*. При использовании штамма JCB570 мы обнаружили, как и в случае гибридного белка CGC, зависимость количества и состава продуктов экспрессии от присутствия шаперона Caf1M. При иммуноблоттинге с антителами к IL-1ra в периплазматической фракции индуцированных клеток в основном обнаруживаются два белка с молеку-

лярной массой 16 и 18 кДа, а также небольшое количество белка с молекулярной массой 35 кДа, соответствующего полноразмерному процессированному гибриду (рис. 5, дорожка 1). Если в периплазматическом пространстве присутствует Caf1M, то количество полноразмерного гибридного белка сильно возрастает одновременно с уменьшением количества продуктов деградации (рис. 5, дорожка 2). Иммуноблоттинг белков этой фракции с антителами к Caf1 также показал, что количество гибридного белка с молекулярной массой около 35 кДа в периплазматическом пространстве клеток *E. coli* существенно возрастает при коэкспрессии гена шаперона (рис. 4, дорожки 3, 4).

Аналогичный эксперимент был проведен с периплазматической фракцией, полученной из индуцированных клеток изогенного штамма JCB571 (*dsbA*<sup>-</sup>), трансформированных плазмидой рCIRAC. При этом в отсутствие шаперона Caf1M иммуноблоттинг выявил, главным образом, продукты распада гибридного белка (рис. 5, дорожка 3). Однако совместная экспрессия генов шаперона и гибридного белка CIRAC в штамме, дефектном по гену *dsbA*, не приводит к заметному увеличению количества полноразмерного гибрида, как это наблюдалось для штамма JCB570, что видно из результатов иммуноблоттинга с антителами к IL-1ra (рис. 5, дорожка 4) и к Caf1 (рис. 4, дорожки 5, 6). При использовании антител к IL-1ra наблюдается частичное изменение набора окрашиваемых белков по сравнению с образцом, в котором шаперон отсутствует.

Известно, что для образования комплекса шаперона с Caf1 необходимо наличие дисульфидной связи между Cys101 и Cys140 в молекуле Caf1M [11]. В клетках штамма JCB571, дефектного по гену периплазматической дисульфидизомеразы DsbA, шаперон из-за отсутствия этой связи находится в неактивном состоянии и не может способствовать стабилизации гибридных белков. Этим можно объяснить наблюдаемую нами разницу в степени влияния шаперона на уровень синтеза полноразмерного белка CIRAC в клетках штаммов JCB570 и JCB571. Следует отметить, что, несмотря на сниженную в отсутствие DsbA активность, Caf1M все же сохраняет способность связываться с субъединицей [11], чем, по-видимому, объясняется изменение характера протеолитического расщепления гибридного белка и небольшое увеличение количества полноразмерной формы в присутствии шаперона (рис. 5, дорожки 3, 4).

**Влияние протеиназы DegP на экспрессию гена гибридного белка CIRAC.** По мере того как секретуемые белки приобретают нативную пространственную структуру, они становятся устойчивыми к протеолизу [19]. В частности, ранее нами было показано, что рекомбинантный GM-CSF, выделенный из периплазматической фракции клеток *E. coli*, сохраняет стабильность в присутствии протеиназы K (неопубликованные данные). Мож-



**Рис. 5.** Иммуноблотинг с антителами к IL-1 $\alpha$  образцов периплазматической фракции индуцированных клеток штаммов JCB570 (1, 2), JCB571 (3, 4), KS474 (5, 6), трансформированных плазмидами pCIRAC (1, 3, 5), pCIRAC + pCaf1M (2, 4, 6).

но предположить, что в отсутствие шаперона Caf1M большая часть молекул Caf1 в составе гибридных белков сворачивается неправильно и поэтому становится мишенью протеолитической атаки. Расщепление, по-видимому, осуществляется периплазматической протеиназой DegP, усиленный синтез которой входит в систему стрессового ответа клетки и индуцируется при накоплении аномальных белков в периплазме, в частности при экспрессии субъединиц Р-пилей [10].

Для определения роли периплазматической протеиназы DegP мы провели экспрессию гена гибридного белка CIRAC в штамме KS474, дефектном по гену *degP*. Количество белка в периплазматическом пространстве индуцированных клеток оказалось незначительным, как следует из результатов иммуноблотинга с антителами к IL-1 $\alpha$  (рис. 5, дорожка 5). При этом продукты деградации не обнаруживались, что косвенно подтверждает наше предположение об участии DegP в процессе деградации гибридного белка в периплазме. В присутствии шаперона количество белка значительно возрастает (рис. 5, дорожка 6).

Таким образом, при коэкспрессии гена шаперона Caf1M значительно увеличивается доля полноразмерной формы обоих гибридных белков в периплазматическом пространстве клеток различных штаммов. Аналогичные результаты были получены при экспрессии гена искусственного гибридного белка IL1 $\beta$ -Caf1 [20]. В соответствии с предложенной моделью это явление можно объяснить стабилизацией пространственной структуры субъединицы и повышением ее устойчивости в составе гибрида. Детали этого процесса пока точ-

но не установлены, но можно предположить, что С-концевой пептид Caf1 образует ряд водородных связей с F1-G1-последовательностью шаперона, как это происходит при формировании комплекса PapG-PapD [9]. Взаимодействие экспонированных гидрофобных участков субъединиц друг с другом в отсутствие шаперона приводит к неправильному сворачиванию и агрегации.

Подобный механизм установлен для субъединиц Р-пилей и пилей 1-го типа. Кроме того, для них показано, что образование комплекса с шапероном способствует освобождению субъединиц, временно связанных с внутренней клеточной мембраной [10]. Весьма вероятно, что шаперон Caf1M обладает аналогичными свойствами. При биосинтезе гибридного белка в периплазматическом пространстве штамма KS474 степень его протеолитической деградации сведена к минимуму, однако коэкспрессия с геном шаперона еще увеличивает его выход. Мы предполагаем, что это объясняется именно солиubilизацией мембраносвязанной фракции гибридного белка, происходящей при участии шаперона. Сравнение количества белка, взаимодействующего с антителами к IL-1 $\beta$ , в периплазматическом пространстве клеток, синтезирующих гибридный белок IL1 $\beta$ -Caf1 отдельно и в присутствии шаперона, также показало, что Caf1M способствует солиubilизации связанного с мембраной гибрида [20].

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали реактивы и ферменты, перечисленные в [12].

**Плазмиды:** pACYC-trx получена в лаборатории химии генов Л.Н. Шингаровой, содержит ген *trx* *E. coli* под контролем *tac*-промотора в pACYC184; pCIC содержит ген гибридного белка *caf-illbeta-caf1* в pTrc99 [20]; pFGM13 [12]; pUC19-IL1ra [21]; pFS2 [4].

**Штаммы *E. coli*:** XL-1 Blue (*recA1, endA1, gyrA96, thi1, hsdR17, supE44, relA, Δ(lac-proAB), F'proAB, LacI<sup>q</sup>ΔDM15, Tn10*) фирмы Stratagene; JM101 (*supE, thi, Δ(lac-proAB), F'traD86, proAB, LacI<sup>q</sup>ΔDM15*) [22]; JCB570 (MC1000 *phoR zih12:Tn10*) [23]; JCB571 (JCB570 (*dsbA::kan*)) [23]; KS474 (*F<sup>-</sup> ΔlacX74, galE, galK, thi, rpsL(strA), DphoA (PvuII), degP41(ΔPstI-Kan')*) [24].

Клонирование рекомбинантных ДНК и трансформацию клеток бактерий проводили стандартными методами в клетках *E. coli* XL-1 Blue [25]. Использовали рестриктазы (Fermentas, Литва) и ДНК-лигазу, выделенную в лаборатории химии генов ИБХ РАН. Амплификацию ДНК методом ПЦР проводили обычно в 100 мкл реакционной смеси следующего состава: 2 нг матрицы, 10 мкл 10-кратного буфера для ПЦР фирмы Stratagene, по 50 пмоль олигонуклеотидных праймеров, по 2.5 нмоль каждого dNTP, 2 ед. акт. ДНК-полимеразы *Pfu* (Stratagene). Режим амплификации: 5 мин при 95°C, 25 циклов (1 мин при 95°C, 1 мин при температуре отжига праймеров, 2 мин при 72°C), 7 мин при 72°C. По окончании ПЦР полученный фрагмент ДНК обрабатывали рестриктазами, если это было запланировано, и выделяли электрофорезом в 1–2% легкоплавкой агарозе.

**Конструирование плазмиды pCaf1M.** Последовательность ДНК, кодирующую шаперон Caf1M, амплифицировали на матрице pFS2 с использованием праймеров (5')GTTGTCGGTACCATTCCGTAAGGAGG и (5')GTTAACGTGCACACAGGAA-CAGC (сайты узнавания *KpnI* и *Alw44I* выделены). Фрагмент обработали рестриктазами *KpnI* и *Alw44I* и клонировали в вектор, полученный в результате расщепления ДНК плазмиды pACYC-trx теми же рестриктазами и выделения большого фрагмента.

**Конструирование плазмиды pCGC.** Для объединения кодирующих последовательностей GM-CSF и Caf1 мы ввели сайт узнавания рестриктазы *Kpn2I* в 3'-концевую часть гена *gmcsf*, для этого провели амплификацию ДНК на матрице pFGM13 с праймерами (5')ATCGGAAATGTTCCGACSTTCAAG и (5')ATTATTCGCGACTCCTGCACTGGTTCCAGC (сайт узнавания *Kpn2I* выделен). Образовавшийся фрагмент обработали *Kpn2I* и лигировали с векторным фрагментом, полученным при обработке ДНК pFGM13 рестриктазами *EcoRV* и *SalGI* в присутствии *Kpn2I-SalGI*-фрагмента плазмиды pCIC, кодирующего спейсер (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> и Caf1.

**Конструирование плазмиды pCIRAC.** Ранее нами была получена плазида pFRA75 (неопубликованные данные), содержащая кодирующую по-

следовательность сигнального пептида Caf1 и ген *il-1ra* из плазмиды pUC19-IL1ra. При ее конструировании был проведен олигонуклеотиднаправленный мутагенез, в результате которого в N-концевую часть молекулы зрелого IL-1ra были внесены аминокислотные замены (AlaAspAsp вместо Arg1) для нейтрализации положительного заряда этой части белка.

Для соединения последовательностей, кодирующих IL-1ra и Caf1, сначала амплифицировали ДНК pFRA75 с использованием праймеров (5')GGAATCCATGGAGGGAAGAT и (5')ATTATTCGCGACTCGTCCTCCTGAAAGTAG (выделены сайты узнавания рестриктаз *NcoI* и *Kpn2I* соответственно). Полученный фрагмент после гидролиза рестриктазами *NcoI* и *Kpn2I* лигировали с векторным фрагментом, полученным гидролизом ДНК плазмиды pCGC рестриктазами *HindIII* и *Kpn2I*, в присутствии *HindIII/NcoI*-фрагмента плазмиды pFRA75.

Строение полученных плазмид подтверждали рестриктным анализом и определением нуклеотидной последовательности участков ДНК, клонированных при помощи ПЦР. Секвенирование ДНК проводили по методике и с использованием набора Sequenase v. 2.0 фирмы USB.

Индукцию транскрипции и анализ экспрессии гибридных генов в клетках *E. coli* проводили как описано в работе [12] для плазмид, содержащих ген *gmcsf*. Для совместной экспрессии гибридных генов и гена шаперона Caf1M компетентные клетки трансформировали одновременно двумя совместимыми плазмидами (например, pCGC и pCaf1M) и затем выращивали на среде с ампициллином и хлорамфениколом. Выделение периплазматической фракции осмотическим шоком проводили как описано в работе [26]. Фракционирование клеток проводили с помощью обработки ультразвуком как в сообщении [12].

Для иммуноблотинга [27] разделенные электрофорезом по методу Лэммли [28] белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану BA85 (Schleicher and Schuell). Для визуализации полос использовали кроличьи поликлональные антитела к GM-CSF человека (получены в Институте инженерной иммунологии, пос. Любучаны, Московская обл.), козьи поликлональные антитела к IL-1ra (R and D) и кроличьи поликлональные антитела к Caf1 (Институт инженерной иммунологии). В качестве вторых антител применяли конъюгат иммуноглобулинов козла против иммуноглобулинов кролика и конъюгат иммуноглобулинов кролика против иммуноглобулинов козла с пероксидазой хрена (Sigma). Визуализацию комплексов проводили с использованием набора ECL (Amersham).

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов INCO-Copernicus ERBIC 15CT960913,

РФФИ № 00-04-48111, № 00-15-97947 и ГНТП “Новейшие методы биоинженерии”. Авторы выражают благодарность Н.В. Баттчиковой, А.В. Завьялову, В.П. Завьялову, Ю.А. Берлину, Л.Н. Шингаровой за предоставленные плазмиды, Т.В. Черновской за кроличьи поликлональные антитела к Caf1, Ш. МакИнтайр за бактериальные штаммы и обсуждение работы.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Roberts J.A., Marklund B.-I., Iver D., Haslam D., Kaack M.B., Baskin G., Louis M., Mollby R., Winberg J., Normark S. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. P. 11889–11893.
2. Langermann S., Palaszynski S., Barnhart M., Auguste G., Pinkner J.S., Burlein J., Barren P., Koenig S., Leath S., Jones C.H., Hultgren S.J. // Science. 1997. V. 276. P. 607–611.
3. Kuehn M.J., Heuser J., Normark S., Hultgren S.J. // Nature. 1992. V. 356. P. 252–255.
4. Galyov E.E., Smirnov O.Yu., Karlyshev A.V., Volkovoy K.I., Denesyuk A.I., Nazimov I.V., Rubtsov K.S., Abramov V.M., Dalvadyanz S.M., Zav'yalov V.P. // FEBS Lett. 1990. V. 277. P. 230–232.
5. Galyov E.E., Karlyshev A.V., Chernovskaya T.V., Dolgikh D.A., Smirnov O.Yu., Volkovoy K.I., Abramov V.M., Zav'yalov V.P. // FEBS Lett. 1991. V. 286. P. 79–82.
6. Chapman D.A.G., Zavalov A.V., Chernovskaya T.V., Karlyshev A.V., Zav'yalova G.A., Vasiliev A.M., Dudich I.V., Abramov V.M., Zav'yalov V.P., MacIntyre S. // J. Bacteriol. 1999. V. 181. P. 2422–2429.
7. Hung D.L., Knight S.D., Woods R.M., Pinkner J.S., Hultgren S.J. // EMBO J. 1996. V. 15. P. 3792–3805.
8. Holmgren A. // EMBO J. 1992. V. 11. P. 1617–1622.
9. Soto G.E., Dodson K.W., Ogg D., Liu C., Heuser J., Knight S., Kihlberg J., Jones C.H., Hultgren S. // EMBO J. 1998. V. 17. P. 6155–6167.
10. Jones C.H., Danese P.N., Pinkner J.S., Silhavy T.J., Hultgren S.J. // EMBO J. 1997. V. 16. P. 6394–6406.
11. Zav'yalov V., Chernovskaya T., Chapman D., Karlyshev A., MacIntyre S., Zavalov A., Vasiliev A., Denesyuk A., Zav'yalova G., Dudich I., Korpela T., Abramov V. // Biochem. J. 1997. V. 324. P. 571–578.
12. Петровская Л.Е., Крюкова Е.А., Якимов С.А., Вульфсон А.Н., Алибаева Р.А., Шингарова Л.Н., Гузаев А.А., Абрамов В.М., Коробко В.Г. // Биоорганическая химия. 1995. Т. 21. С. 912–919.
13. Summers R.G., Harris C.R., Knowles J.R. // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. P. 20082–20088.
14. Geller B., Zhu H.Y., Cheng S., Kuhn A., Dalvey R.E. // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. P. 9442–9447.
15. Kanakura Y., Cannistra S.A., Brown C.B., Nakamura M., Seelig G.F., Prosser W.W., Hawkins J.C., Kaushansky K., Griffin J.D. // Blood. 1991. V. 77. P. 1033–1043.
16. Evans R.J., Bray J., Childs J.D., Vigers G.P.A., Brandhuber B.J., Skalicky J.J., Thompson R.C., Eisenberg S.P. // J. Biol. Chem. 1995. V. 270. P. 11477–11483.
17. Burgess A.W., Begley C.G., Johnson G.R., Lopez A.F., Williamson J., Mermod J.J., Simpson R.J., Schmitz A., DeLamarter J.F. // Blood. 1987. V. 69. P. 43–51.
18. Rourke A.M., Cha Y., Collins D. // Biochemistry. 1996. V. 35. P. 11913–11917.
19. Randall L.L., Hardy S.J. // Cell. 1986. V. 46. P. 921–928.
20. Zavalov A., Battchikova N., Petrovskaya L., MacIntyre S., Korpela T., Korobko V.G., Zav'yalov V. Microbial Protein Expression System. Patent Application № 991014 // Finland. 4.5.1999.
21. Лебедеенко Е.Н., Берлин Ю.А. // Биоорганическая химия. 1993. Т. 19. С. 586–588.
22. Janisch-Perron C., Vieira J., Messing J. // Gene. 1985. V. 33. P. 103–119.
23. Bardwell J.C.A., McGovern K., Beckwith J. // Cell. 1991. V. 67. P. 581–589.
24. Strauch K.L., Johnson K., Beckwith J. // J. Bacteriol. 1989. V. 171. P. 2689–2696.
25. Мануатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование: Пер. с англ. М.: Мир, 1984.
26. Ducancel F., Boulain J.-C., Tremeau O., Menez A. // Prot. Engineering. 1989. V. 3. P. 139–143.
27. Towbin H., Strahelin T., Gordon J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. P. 4350–4354.
28. Laemmli U.K. // Nature. 1970. V. 227. P. 680–685.

## Chaperone Caf1M Stabilizes Hybrid Proteins Containing Sequences of F1 Antigen Subunit from *Yersinia pestis*

L. E. Petrovskaya, E. A. Kryukova, A. L. Kayushin, and V. G. Korobko

e-mail: korobko@mail.ibch.ru

Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,  
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, GSP Moscow, 117997 Russia

The *Yersinia pestis* (causative agent of plague) capsule antigen is a homopolymer of Caf1 protein. Export of the subunits is mediated by the periplasmic chaperone Caf1M. To study the mechanism of Caf1M activity, two hybrid genes including coding sequences for the Caf1 signal peptide, human granulocyte–macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) or interleukin-1 (IL-1) receptor antagonist, and mature Caf1 were constructed and expressed in *Escherichia coli*. We have shown that in the absence of Caf1M the majority of Caf1 moieties within the hybrid proteins undergo proteolysis in the periplasmic space, presumably by the DegP protease. The coexpression of a gene for chaperone Caf1M significantly increased the amount of full-size hybrid proteins in the periplasm, probably as a result of stabilization of the subunit's spatial structure within the hybrid. This effect was not observed in JCB571 cells, which lack periplasmic disulfide isomerase DsbA, essential for Caf1M activity. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2001, vol. 27, no. 4; see also <http://www.maik.ru>.

**Key words:** capsular antigen Caf1, chaperone Caf1M, GM-CSF, IL-1ra, secretion, fusion proteins