



УДК 577.322:591.145.2–812.6

ЭКСПРЕССИРУЮЩАЯ КОНСТРУКЦИЯ ДЛЯ НАРАБОТКИ В *Escherichia coli* НЕЙРОТОКСИНА II ИЗ ЯДА КОБРЫ *Naja oxiana* В ВИДЕ ГИБРИДА С ТИОРЕДОКСИНОМ

© 2004 г. Е. Н. Люкманова, А. А. Шульга[#], Д. А. Арсеньева, К. А. Плужников,
Д. А. Долгих, А. С. Арсеньев, М. П. Кирпичников

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 16.09.2002 г. Принята к печати 04.11.2002 г.

Нейротоксин II из яда кобры *Naja oxiana* – короткий α -нейротоксин, являющийся высокоспецифичным конкурентным ингибитором никотинового ацетилхолинового рецептора. Ген нейротоксина II экспрессирован в составе гибридной конструкции с геном тиоредоксина и с линкером, кодирующим сайт узнавания энтеропептидазы, а также остаток метионина. Основным способом расщепления гибридного белка был выбран гидролиз бромцианом; обработка энтеропептидазой проходит с меньшей эффективностью. Выход нейротоксина II составил 6 мг/л бактериальной культуры. Идентичность полученного рекомбинантного белка природному нейротоксину II подтверждена анализом N-концевой последовательности, данными масс-спектрометрии и методом ЯМР.

Ключевые слова: α -нейротоксины, никотиновый ацетилхолиновый рецептор, тиоредоксин, экспрессия в *Escherichia coli*.

ВВЕДЕНИЕ

Кобра *Naja oxiana* относится к семейству змей Elapidae, яды которых являются наиболее сильными действующими. Среди самых токсичных компонентов этих ядов – α -нейротоксины. α -Нейротоксины – высокоспецифичные конкурентные ингибиторы никотиновых ацетилхолиновых рецепторов, представляющих собой лигандзависимые ионные каналы, встроенные в постсинаптическую мембрану нейронов [1].

Разнообразие семейства никотиновых ацетилхолиновых рецепторов обусловлено существованием большого числа гомологичных субъединиц их формирующих. Каждый рецептор состоит из пяти субъединиц, комбинация которых и определяет функциональное многообразие рецепторов. Так, для нейрональных nAChR существует 12 гомологичных субъединиц, для nAChR мускульного типа – 5 [2, 3]. Благодаря своей способности преобразовывать межклеточные сигналы nAChR играют ключевую роль в возникновении и развитии целого ряда болезней нервной системы: шизофрении, эпилепсии, депрессии [1], никотиновой и алкогольной зависимостей [4], болезни

Альцгеймера, паркинсонизма [5], мышечной дистрофии [6].

Существует два типа α -нейротоксинов: короткие (четыре дисульфидные связи, 60–62 а. о.) и длинные (пять дисульфидных связей, 66–75 а. о.). Эффективно связываться с нейрональными nAChR способны только длинные α -нейротоксины, в то время как с мускульными nAChR взаимодействуют α -нейротоксины обоих типов. Это различие объясняется строением центральной петли коротких и длинных α -нейротоксинов [7].

Благодаря высокой специфичности связывания, небольшим размерам и жесткой структуре нейротоксины являются удобным инструментом для изучения свойств nAChR. Кроме того, наличие для α -нейротоксинов большого числа гомологичных аминокислотных последовательностей делает возможным анализ структурно-функциональных взаимосвязей в их молекулах. Данные о структуре и свойствах α -нейротоксинов и знание механизма их действия на молекулярном уровне необходимы для разработки терапевтических средств лечения болезней нервной системы.

Нейротоксин II из яда кобры *Naja oxiana* принадлежит семейству коротких α -нейротоксинов (рис. 1) и является высокоспецифичным конкурентным ингибитором мускульного nAChR. Для изучения влияния мутаций нейротоксина II на его структуру и взаимодействие с nAChR необходимо наличие продуктивной экспрессирующей систе-

Сокращения: NTII – нейротоксин II; nAChR – никотиновый ацетилхолиновый рецептор; TRX – тиоредоксин; ПЦР – полимеразная цепная реакция; IPTG – изопропилтио- β -D-галактопиранозид; PMSF – фенилметилсульфонилфторид; COSY – корреляционная спектроскопия.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 335-28-88; факс: (095) 335-50-33; эл. почта: shua@nmr.ru).

мы. Однако цитоплазматическая экспрессия генов нейротоксина в *E. coli* практически невозможна, поскольку в бактериальной цитоплазме не образуются дисульфидные связи и поэтому молекула нейротоксина, синтезированного в бактериальной клетке, не стабилизированная дисульфидными связями, становится очень чувствительной к протеолитической деградации.

По этой причине была сконструирована экспрессирующая система, позволяющая синтезировать нейротоксин II в составе гибридного белка с тиоредоксином из *E. coli*, способствующим формированию дисульфидных связей в молекуле токсина. Для последующего отделения нейротоксина II от белка-носителя был предусмотрен специальный линкер (Gly-Ser)₅Gly-(Asp)₄-Lys-Leu-Met, в котором содержится последовательность (Asp)₄-Lys, узнаваемая высокоспецифичной протеиназой – энтеропептидазой, а также остаток метионина, по которому осуществляется гидролиз гибридного белка бромцианом.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Тиоредоксин – широко распространенный и участвующий во многих клеточных процессах белок [9]. Способность к обратимому окислению активного центра (-Cys-Gly-Pro-Cys-) тиоредоксина с образованием дисульфидной связи позволяет рассматривать его как окислительно-восстановительную пару в ряде биохимических реакций. Тиоредоксин обладает рядом полезных свойств для создания на его основе гибридных белков. Во-первых, тиоредоксин способен накапливаться в цитоплазме *E. coli* (до 40% общей массы клеточных белков), оставаясь при этом в растворимой форме. Кроме того, благодаря своим небольшим размерам (11675 Да) тиоредоксин, включенный в гибридный белок, не увеличивает чрезмерно его массу. Расположение на поверхности белковой молекулы N- и C-концов тиоредоксина удобно для присоединения других белков. Также тиоредоксин можно рассматривать как своеобразный шаперон, отвечающий за формирование дисульфидных связей. Это подтверждается тем фактом, что коэкспрессия с тиоредоксином резко увеличивает растворимость восьми факторов транскрипции и киназ, которые иначе синтезируются как нерастворимые [10]. Применение экспрессирующей системы, в которой используется тиоредоксин в качестве N-концевого партнера привело к получению в растворимой форме и с хорошим выходом одиннадцати факторов роста и цитокинов млекопитающих [11], а также фрагментов полипептидной цепи γ -интерферона человека [12]. Это свойство тиоредоксина особенно важно для коэкспрессии с нейротоксином II, молекула которого содержит четыре дисульфидные связи, необ-

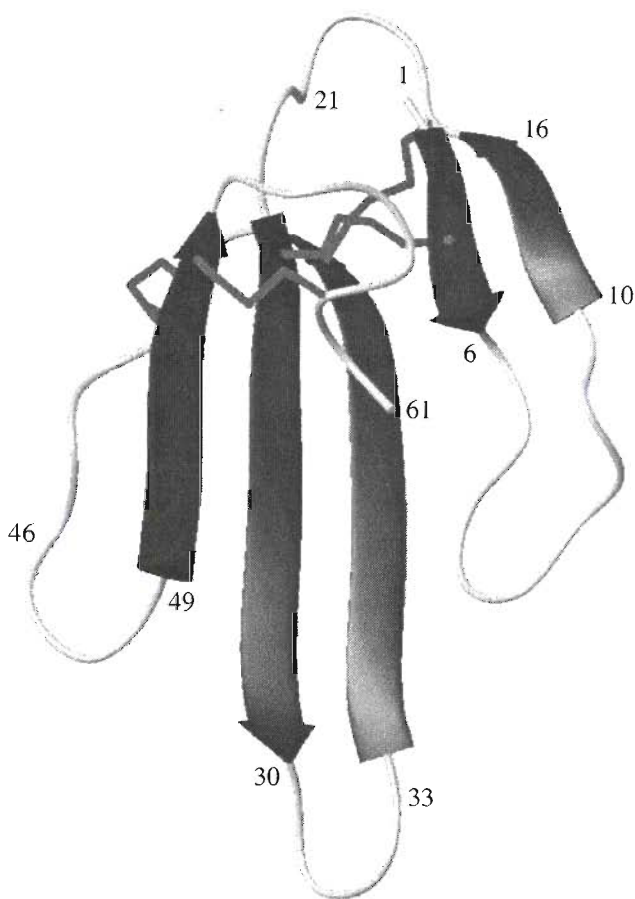


Рис. 1. Пространственная структура нейротоксина II из яда кобры *Naja oxiana* [8]. Стрелками обозначены участки β -структуры, для наглядности цифрами отмечены номера некоторых аминокислотных остатков, изломанными линиями темно-серого цвета показаны дисульфидные связи.

ходимые для формирования биологически активной структуры [13].

Клонирование гена тиоредоксина *E. coli* проводили при помощи метода ПЦР на основании известной нуклеотидной последовательности [14]. Источником хромосомной ДНК служил штамм *E. coli* TG1. Для амплификации гена использовали два праймера *ptr5* и *ptr3*, фланкирующих кодирующую часть гена белка с 5'- и 3'-концов соответственно (таблица). Нуклеотидная последовательность праймеров включала сайты рестрикции, необходимые для последующего клонирования в экспрессирующем векторе. Олигонуклеотид *ptr5* содержал сайт рестрикции *NdeI*, а *ptr3* – *NaeI*. Фрагмент ДНК, синтезированный в ходе ПЦР, фосфорилировали с помощью полинуклеотидкиназы фага T4 и затем ген, кодирующий тиоредоксин, клонировали в вектор *pBluescript II SK(-)*, предварительно расщепленный рестриктазой *SmaI* и дефосфорилированный (рис. 2a). Секвенирование по методу Сенгера продемонстрировало идентич-

Последовательности олигонуклеотидов, использованных в работе

Обозначение	Структура олигонуклеотида 5'–3'
<i>Pir5</i>	<u>CATATGAGCGATAAAATTATTCACC</u> <i>NdeI</i>
<i>Pir3</i>	<u>GCCGGCCAGGTTAGCGTCGAGG</u> <i>NaeI</i>
<i>E30R</i>	GGGCAACACTGGTGCGGTCCGTG
<i>E30L</i>	CACCAGTGTTGCCAGAAATCGAC
<i>Q62R</i>	CGATCATAACCCTGGCACTG
<i>Q62L</i>	CAGGGTTATGATCGATGTT CAG
<i>Nno1</i>	<u>TCTAGAATGTCACAACCAGC</u> <i>XbaI</i>
<i>Nno2</i>	AGTCTTCCCAGCCGCCAACTACCAAACTTGCTCTGGCGAAA
<i>Nno3</i>	CCAACTGCTACAAAAAGTGGTGGTCCGACCACCGTGGTA
<i>Nno4</i>	CCATCATCGAGCGCGGTTGTGGCTGTCCGAAAGTTAAACCG
<i>Nno5</i>	GGTGTAAACCTGAACTGCTGTCTGACCGATCGTTGCAACAAC TAAGAGCTC <i>SacI</i>
<i>Nno6</i>	GGAAGACTGCTGGTTG
<i>Nno7</i>	GCAGTTGGTTTCGCCA
<i>Nno8</i>	GATGATGGTACCACGG
<i>Nno9</i>	TTTACACCCGGTTTAA
<i>Nno10</i>	GAGCTCTTAGTTGTTGCAAC
<i>Nno11</i>	<u>GGATCCTTAGTTGTTGCAACGATCGGTACGACAGCAGTTCAGGTTTACACC</u> <i>BamHI</i>
<i>(SpH1/SpH2)5</i>	<u>GGCTCTGGTTCTGGTTCTGGTTCTGGTTCTGGTGATGACGATGACAAG</u> (<i>NaeI</i>) (тупой конец)
<i>(SpH1/SpH2)3</i>	CGTAAAGCTTGT CATCGTCATCACCAGAACCAGAACCAGAACCAGAGCC (<i>HindIII</i>) (липкий конец)
<i>Pir5M37A</i>	GCGGTCCGTGCAAAGCGATCGCCCCG
<i>Pir3M37A</i>	CGGGGCGATCGCTTTCACGGACCGC

ность клонированного гена тиоредоксина последовательности гена, известной из литературы. Полученная плаزمида получила название *pBlue-script II SK(-)/trx*.

Сборка гена и клонирование нейротоксина II. Для сборки гена, кодирующего нейротоксин II, были синтезированы десять олигонуклеотидов. Олигонуклеотиды *nno1–nno5* в сумме представляли собой последовательность, кодирующую ген нейротоксина II. Олигонуклеотид *nno1* (5'-конец) содержал сайт рестрикции *XbaI*, а *nno5* (3'-конец) – стоп-кодон TAA, непосредственно за которым следовал сайт рестрикции *SacI*. Выбор кодонов, использованных для последовательностей олигонуклеотидов, основывался на частоте их встречаемости в хорошо экспрессирующихся генах *E. coli*. Олигонуклеотиды *nno6–nno9* использовались в качестве подложки в реакции лигирования для

специфического сближения концов олигонуклеотидов кодирующей цепи.

Смесь олигонуклеотидов *nno1–nno9* (в равном молярном соотношении) фосфорилировали полинуклеотидкиназой фага T4, а затем в течение ночи проводили лигирование. Аликвоту реакционной смеси использовали в дальнейшем в ПЦР с применением праймеров *nno1* и *nno10*. Последний праймер был комплементарен 3'-концу олигонуклеотида *nno5*. Фрагмент ДНК, синтезированный в ходе ПЦР и имевший длину 193 п.о., фосфорилировали с помощью полинуклеотидкиназы фага T4 и клонировали по *SmaI*- сайту фагмидного вектора *pBlue-script II SK(-)* (рис. 2б). Секвенирование показало, что все клоны, содержащие вставку нужной длины, имели нежелательные мутации, в основном делеции. Для получения правильной нуклеотидной последовательности был выбран клон, имеющий только одну делецию вблизи 3'-

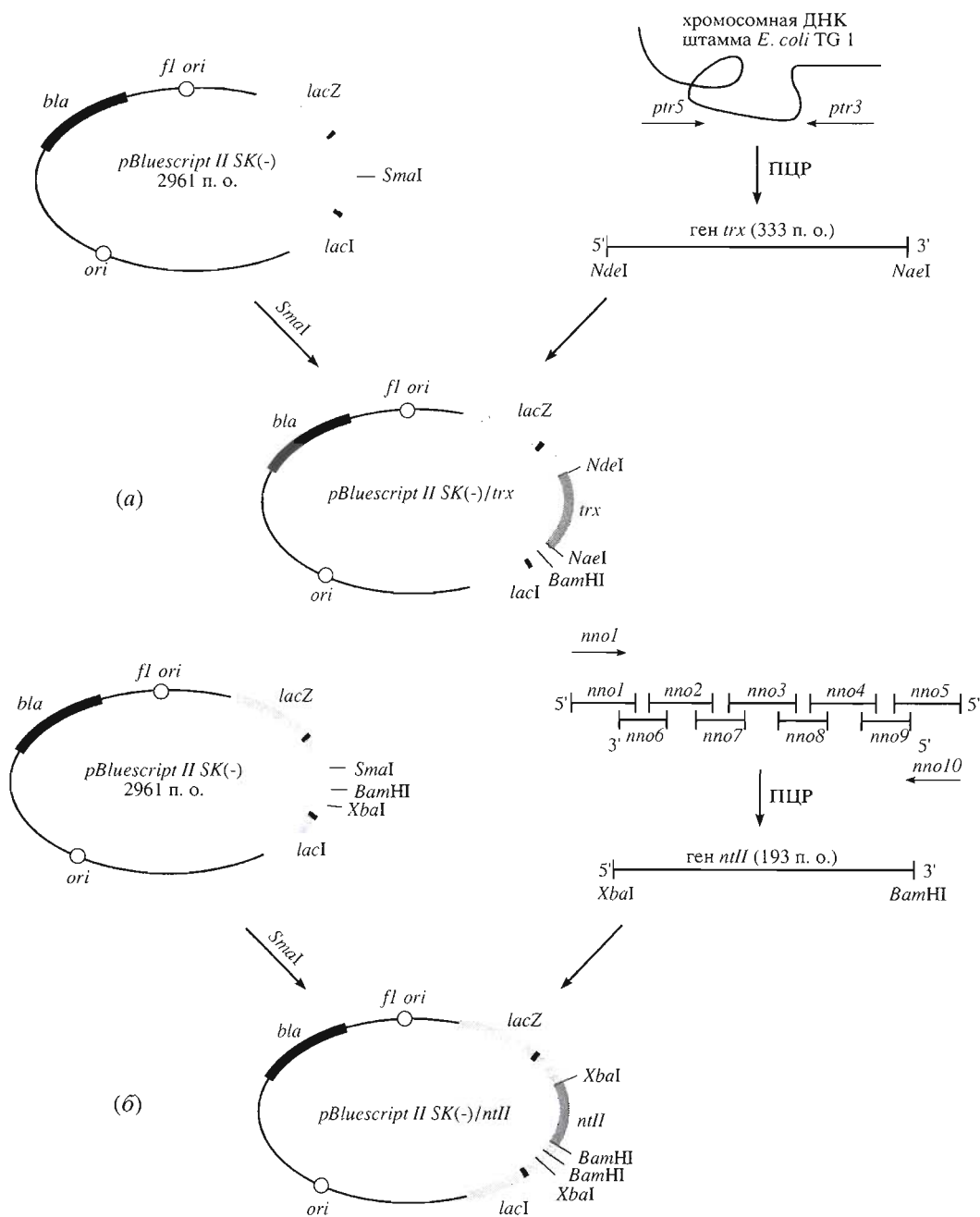


Рис. 2. Схемы клонирования гена тиоредоксина (а) и гена нейротоксина II (б) в плазмидный вектор *pBluescript II SK(-)*. Сокращения: *ori* – точка начала репликации, *lacI* – ген Lac-репрессора, *lacZ* – ген β-галактозидазы, *bla* – ген β-лактамазы, обуславливающей устойчивость к ампициллину.

конца гена. ДНК этого гена амплифицировали в ходе ПЦР с использованием праймера *nno1* (5'-конец) и корректирующего праймера *nno11* (3'-конец), полностью комплементарного олигонуклеотиду *nno5*, за исключением 5'-конца, где вместо сайта *SacI* был включен сайт *BamHI*. Синтезированный фрагмент ДНК был проклонирован в тот же вектор и по той же схеме, что и ранее (рис. 2б). Таким образом, была получена плаزمид, получившая название *pBluescript II SK(-)/ntlI*.

Генно-инженерная конструкция для экспрессии гена нейротоксина II. Сборка экспрессирующей конструкции была осуществлена в три этапа. Из плазмиды *pBluescript II SK(-)/trx* с помощью рестриктаз *NdeI* и *BamHI* был вырезан фрагмент ДНК, содержащий ген тиоредоксина. Далее этот фрагмент подвергся трехкомпонентному лигированию с двумя фрагментами вектора *pGEMEX-1*: *AatII-BamHI* и *AatII-NdeI*. В результате получили конструкцию, в которой под контролем промото-

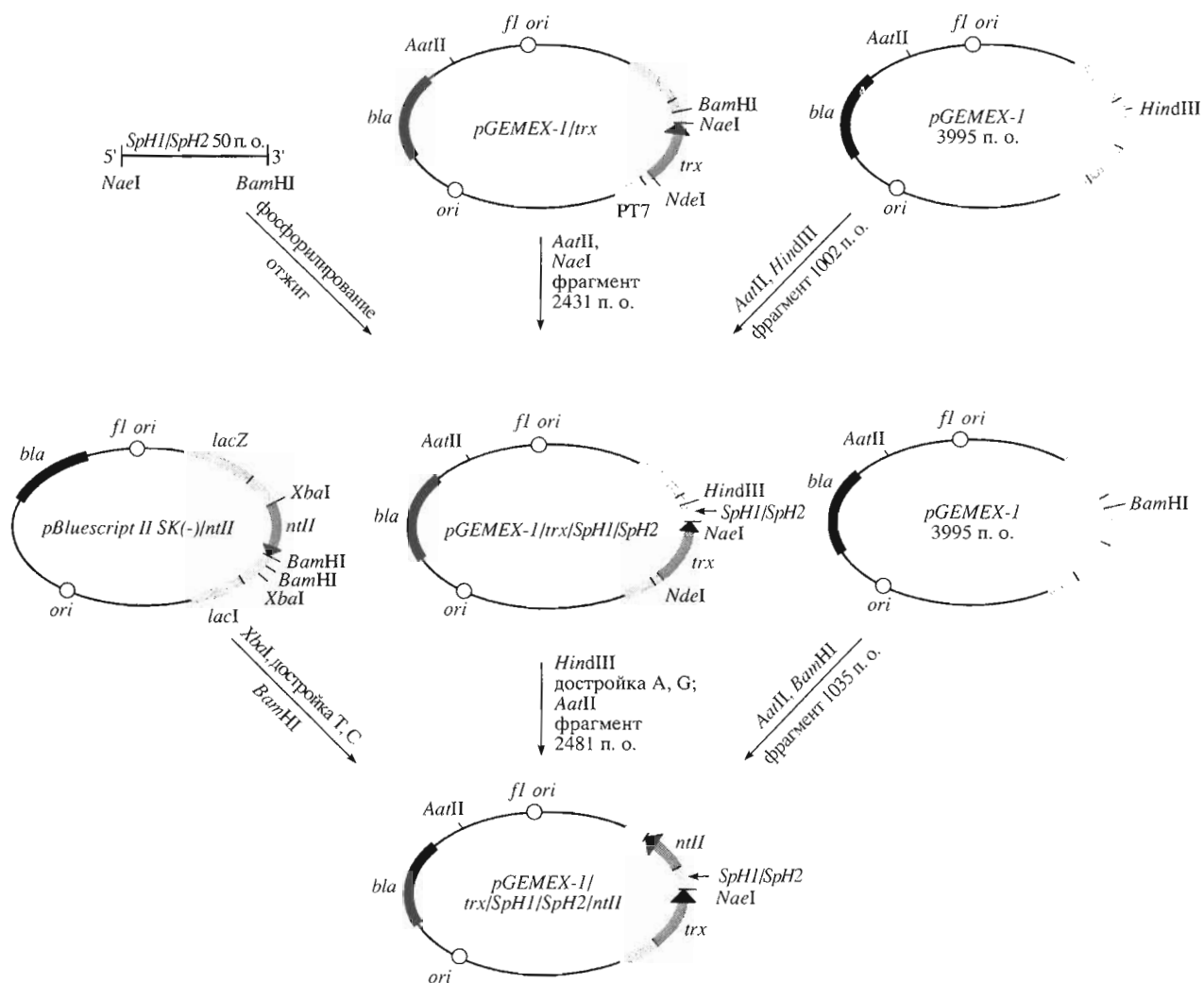


Рис. 3. Схема конструирования экспрессирующего вектора для слитного гена тиоредоксин–линкер–нейротоксин II на основе вектора *pGEMEX-1*.

ра РНК-полимеразы фага Т7 находится ген тиоредоксина. Вектор получил название *pGEMEX-1/trx* (рис. 3).

Для последующего отделения нейротоксина II от белка-носителя был предусмотрен специальный линкер (Gly-Ser)₅-Gly-(Asp)₄-Lys, получивший название SpH1/SpH2. Его аминокислотная последовательность содержит сайт (Asp)₄-Lys, узнаваемый высокоспецифичной протеиназой – энтеропептидазой, которая селективно гидролизует пептидную связь, находящуюся непосредственно после остатка лизина. При расщеплении полипептидной цепи энтеропептидазой можно получить целевой белок, не содержащий на N-конце дополнительных аминокислот. С N-конца к сайту узнавания энтеропептидазы примыкала последовательность из чередующихся остатков глицина и серина, что придавало линкеру гибкость и гидрофильность, а также уменьшало вероятность возникновения стерических затруднений при работе

фермента ($M_w \sim 150$ кДа). Нуклеотидная последовательность *SpH1/SpH2*, кодирующая линкер, проектировалась с таким расчетом, чтобы обеспечить подсоединение гена нейротоксина II к 3'-концу гена тиоредоксина, сохраняя, во-первых, рамку считывания гена нейротоксина, а во-вторых, исключая попадание между сайтом узнавания энтеропептидазы и началом последовательности нейротоксина II лишних аминокислотных остатков.

Для соединения нуклеотидных последовательностей линкера и гена тиоредоксина повторно применялось трехкомпонентное лигирование, подобно тому, как это было сделано ранее. В данном случае использовались следующие компоненты: а) фрагмент вектора *pGEMEX-1/trx*, обработанного рестриктазами *AatII* и *NaeI*, содержащий ген тиоредоксина, 2) два отожженных олигонуклеотида (*SpH1/SpH2*)₅ и (*SpH1/SpH2*)₃ (см. таблицу), формирующих линкер SpH1/SpH2 и обработанных

рестриктазой *Hind*III, 3) меньший из фрагментов вектора *pGEMEX-1*, полученных с помощью рестриктаз *Aat*II и *Hind*III. В результате реакции лигирования был получен вектор на основе *pGEMEX-1*, в котором за последовательностью гена тиоредоксина располагалась последовательность линкера. Было просеквенировано шесть клонов, и плаزمиды с правильной нуклеотидной последовательностью гена тиоредоксина и линкера была названа *pGEMEX-1/trx/SpH1/SpH2* (рис. 3).

На третьем этапе необходимо было ввести в получившуюся конструкцию ген нейротоксина II. Для этого также была выбрана стратегия трехкомпонентного лигирования. Плазмидная ДНК вектора *pBluescript II SK(-)/ntII* (рис. 2б) была обработана рестриктазой *Xba*I, а образовавшиеся липкие концы частично достроены dTTP и dCTP с помощью фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I. Далее этот вектор обрабатывался рестриктазой *Bam*HI и таким образом был получен фрагмент, содержащий ген *ntII*. Параллельно вектор *pGEMEX-1/trx/SpH1/SpH2* (рис. 3) подвергали расщеплению рестриктазой *Hind*III, и образовавшиеся липкие концы были частично достроены с помощью фрагмента Кленова в присутствии dATP и dGTP. Потом ДНК была обработана рестриктазой *Aat*II и таким образом был получен фрагмент, содержащий ген тиоредоксина, соединенный с последовательностью линкера. Следует обратить внимание, что в результате частичных достроек *Xba*I- и *Hind*III-концов получились двуххвостные комплементарные концы. В качестве третьего компонента реакции лигирования выступал меньший фрагмент, получающийся при расщеплении плазмиды *pGEMEX-1* рестриктазами *Aat*II и *Bam*HI (рис. 3).

Правильность сборки проверялась рестриктным анализом с использованием ферментов, применявшихся в конструировании. ДНК выделенных клонов секвенировали с использованием двух праймеров *SP6* и *T7* (Promega, США). При этом не было обнаружено никаких отклонений от запланированной последовательности. Полученный в результате экспрессирующий вектор получил название *pGEMEX-1/trx/SpH1/SpH2/ntII*.

Введение мутаций E30H, Q62H в ген тиоредоксина. В нашей работе использовалась мутантная форма тиоредоксина *E. coli* (E30H, Q62H), в которой боковые цепи трех остатков гистидина, включая природный His6, пространственно сближены, что позволяет проводить высокоэффективную очистку гибридного белка тиоредоксин-нейротоксин II с помощью металлохелатной аффинной хроматографии [15]. Мутации вводили последовательно при помощи ПЦР. Сначала осуществили замену E30H, затем в мутантный ген ввели вторую мутацию Q62H. Схема мутагенеза включала два этапа. На первом этапе нарабаты-

вали фрагменты ДНК, располагающиеся по обе стороны от места введения мутации. Для этого использовали пару мутагенных праймеров (E30R/E30L или Q62R/Q62L, таблица) и пару фланкирующих праймеров (T7 или SP6). Последняя пара праймеров специфически отжигается на последовательностях, фланкирующих гибридный ген с 5'- и 3'-концов соответственно. На втором этапе фрагменты ДНК рекомбинировали по перекрывающимся последовательностям при помощи ПЦР. Полученный полноразмерный ген, кодирующий гибридный белок с мутациями E30H, Q62H, расщепили рестриктазами *Nde*I и *Hind*III и клонировали в вектор *pGEMEX-1* по образовавшимся липким концам. ДНК выделенных клонов секвенировали в пределах вставки методом Сенгера, используя для этого T7- и SP6-праймеры.

В результате генно-инженерных манипуляций был получен вектор для экспрессии нейротоксина II в составе гибридного белка с тиоредоксином. Ген гибридного белка в этом векторе находился под контролем T7-промотора.

Введение в линкер аминокислотных остатков Leu-Met. Были получены аналитические количества гибридного белка с линкером *SpH1/SpH2*, однако расщепить энтеропептидазой такой гибридный белок не удалось. Вероятно, причиной этого является дисульфидная связь между 3-м и 23-м остатками нейротоксина II, которая может создавать стерические затруднения при работе энтеропептидазы.

Для решения этой проблемы линкер был удлинен еще на две аминокислоты: Leu-Met. Использование гибридного белка с таким линкером могло позволить, во-первых, получить нейротоксин II с нативным концом при расщеплении связи Leu-Met бромцианом, а во-вторых, в этом случае "мешающая" S-S-связь отодвигалась на два аминокислотных остатка, что могло ослабить стерические затруднения для работы энтеропептидазы. В случае удачного расщепления такого гибридного белка энтеропептидазой можно было бы косвенно подтвердить гипотезу о том, что протеолизу мешала близость дисульфидной связи.

Сборку экспрессирующего вектора проводили в три этапа (рис. 4). Плазмиду *pGEMEX-1/trx/SpH1/H2* обрабатывали рестриктазой *Hind*III, и затем образовавшиеся липкие концы достраивали с помощью фрагмента Кленова. Полученную таким образом линейную матрицу обрабатывали рестриктазой *Aat*II, и в результате получили фрагмент, несущий в себе ген тиоредоксина и достроенную последовательность линкера. На следующей стадии вектор *pGEMEX-1/ntII* расщепляли рестриктазой *Nde*I и достраивали фрагментом Кленова. Далее полученную таким образом линейную матрицу подвергали расщеплению рестриктазой *Bam*HI. На третьей стадии плазмиду

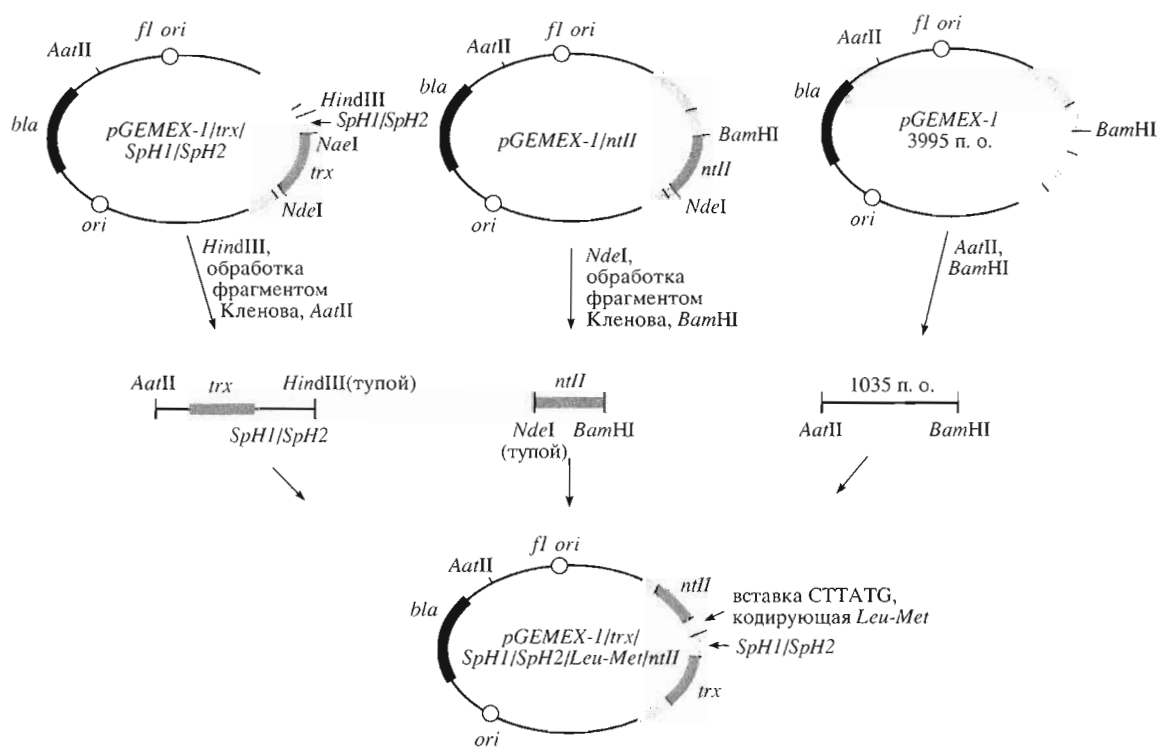


Рис. 4. Схема сборки экспрессирующего вектора *pGEMEX-1/trx/SpH1/SpH2/Leu-Met/nII*.

pGEMEX-1 обрабатывали рестриктазами *AatII* и *BamHI* с целью выделения фрагмента *AatII*–*BamHI* (1035 п. о.). Полученные три фрагмента объединяли и лигировали. Полученные клоны анализировали путем гидролиза рестриктазой *HindIII*. В правильной конструкции на 3'-конце *SpH1/SpH2* должен восстанавливаться сайт *HindIII*, и при обработке плазмиды рестриктазой *HindIII* должен был бы выщепляться фрагмент длиной около 200 п.о. ДНК отобранных клонов секвенировали. Результирующий вектор получил название *pGEMEX-1/trx/SpH1/SpH2/Leu-Met/nII* (рис. 4), в котором линкер, соединяющий гены нейротоксина и тиоредоксина, в результате двух достроек фрагментом Кленова был удлинен на два аминокислотных остатка.

Биосинтез рекомбинантного белка тиоредоксин-нейротоксин II. Нарботку рекомбинантного белка осуществляли в штамме *E. coli* BL21(DE3)(pLysS), содержащем хромосомную копию гена РНК-полимеразы фага T7 под контролем промотора *lacUV5*. Выращивание клеток при температуре 37°C имело ярко выраженную тенденцию к внутриклеточной преципитации гибридного белка Тгх/NT II. Наиболее простым из известных способов повышения выхода растворимого белка является понижение температуры культивирования [16]. При 20°C весь белок Тгх-NT находился в растворимой форме, но образовывал крупные ассоциаты, содержащие не менее пяти молекул гибрида. Такой вывод был сделан

на основе данных, полученных в ходе пробного выделения белка. При гель-фильтрации белок выходил в исключенном объеме колонки, что соответствует молекулярной массе продукта не менее 100 кДа. Дальнейшее понижение температуры культивирования до 12°C позволило решить проблему растворимости белка. При этой температуре практически весь белок находился в растворимом состоянии, причем не менее 60% в мономерной форме.

Культивирование клеток BL21(DE3)(pLysS), несущих плазмиду *pGEMEX-1/trx/Leu-Met/nII*, проводили при температуре 12°C в среде ТВ [17] с добавлением фосфатов в течение суток после добавления индуктора IPTG. Индукцию осуществляли при достижении показателя оптического поглощения клеток 1.0. Выход рекомбинантного белка при концентрации индуктора 0.025 мМ составил примерно 50 мг с литра культуры.

Выделение и очистка рекомбинантного белка тиоредоксин-нейротоксин II. Очистку гибридного белка тиоредоксин-нейротоксин II проводили в два этапа. На первой стадии растворимые клеточные белки разделяли на металлохелатной аффинной смоле. На этой стадии удавалось почти полностью избавиться от низкомолекулярных примесных белков и нуклеиновых кислот (рис. 5, дорожка 3). На втором этапе полученный гибридный белок очищали при помощи хроматогра-

фии на анионообменной смоле Mono-Q HR (рис. 5, дорожка 4).

Расщепление гибридного белка TRX/SpH1/SpH2/Leu-Met/NTII. В результате гидролиза выделенного и очищенного гибридного белка тиоредоксин-нейротоксин II с линкером ((Gly-Ser)₅-Gly-(Asp)₄-Lys-Leu-Met) малой субъединицей энтеропептидазы были получены продукты расщепления с молекулярными массами около 12 и 7 кДа, что соответствует молекулам тиоредоксина и нейротоксина II (рис. 5). Таким образом, удлинение линкера позволило повысить эффективность гидролиза гибридного белка энтеропептидазой, однако ферментативный способ отделения целевого белка от белка-носителя не является оптимальным, поскольку предполагает использование больших количеств дорогостоящего коммерческого препарата энтеропептидазы EKMax™. Для расщепления 8.5 мкг гибридного белка понадобилось 0.5 ед. акт. энтеропептидазы, при этом эффективность реакции составила около 50%.

Поэтому основным способом для получения нейротоксина II стала обработка гибридного белка бромцианом. Эффективность такого расщепления составила около 30%.

Замена остатка метионина в аминокислотной последовательности тиоредоксина. Для того чтобы повысить выход целевого белка на стадии гидролиза гибрида бромцианом, аминокислотный остаток M37 тиоредоксина был заменен на остаток аланина сайт-направленным мутагенезом с помощью пары праймеров *ptr5M37A* и *ptr3M37A* (таблица). Известно [9], что остаток метионина в молекуле тиоредоксина не участвует в катализе окислительно-восстановительных реакций, а аланин является аминокислотой, встречающейся как внутри, так и снаружи белковых глобул. Поэтому можно было бы ожидать, что такая замена не приведет к каким-либо существенным структурным и функциональным изменениям. В результате такой замены эффективность расщепления гибридного белка бромцианом повысилась примерно до 50%, при этом замена остатка метионина на остаток аланина в молекуле тиоредоксина не повлияла на уровень биосинтеза гибридного белка. Выход конечного продукта нейротоксина II составил около 6 мг с литра бактериальной культуры.

Анализ рекомбинантного нейротоксина II. В результате реакции с бромцианом мы получили нейротоксин II с нативным N-концом, что подтверждено анализом N-концевой последовательности методом Эдмана. Сравнительный масс-спектрометрический анализ природного нейротоксина и рекомбинантного белка, а также электрофорез в 12% SDS-ПААГ-геле в Трис-трициновой буферной системе, доказали идентичность их молеку-

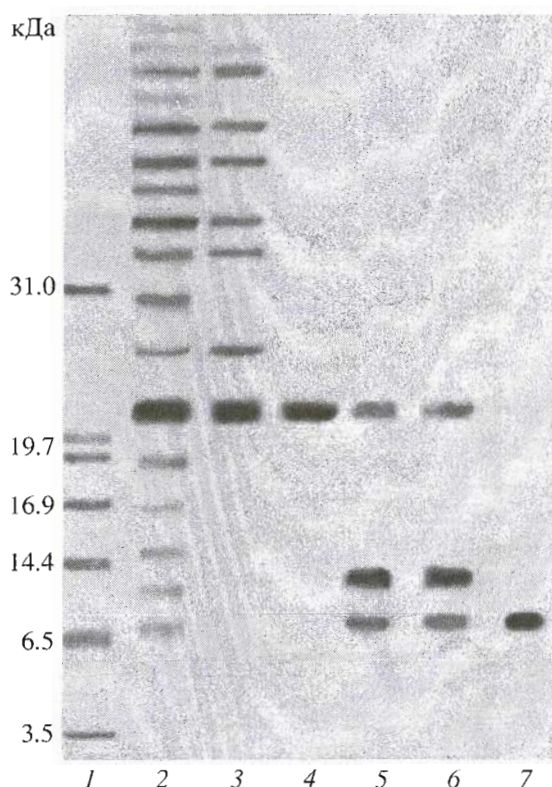


Рис. 5. Электрофоретический анализ в 12% SDS-ПААГ-геле в Трис-трициновой буферной системе стадий очистки гибридного белка и результаты гидролиза гибридного белка малой субъединицей энтеропептидазы и бромцианом. 1 – смесь маркерных белков (BioRad, США), слева от рисунка указаны молекулярные массы, 2 – общий клеточный белок, 3 – препарат после очистки на металлохелатной аффинной смоле, 4 – препарат после очистки на Mono-Q (Pharmacia, Швеция), 5 – расщепление гибридного белка энтеропептидазой, 6 – гидролиз гибридного белка бромцианом, 7 – рекомбинантный нейротоксин II после очистки на Mono-S (Pharmacia, Швеция).

лярных масс. Сравнение спектров ¹H-ЯМР рекомбинантного и природного нейротоксинов показало, что белки обладают идентичной пространственной структурой и NH-C^αH-области их спектров COSY совпадают (данные не показаны).

Таким образом, нами разработана экспрессирующая система, которая позволяет получать нейротоксин II – белок, содержащий четыре дисульфидные связи, в растворимой форме и с нативным N-концом. Выход конечного продукта в нашей системе составляет примерно 6 мг с литра бактериальной культуры, что является вполне достаточным для структурных исследований взаимодействия нейротоксина II с nAHP.

Следует заметить, что наша экспрессирующая система обладает рядом преимуществ перед уже существующими системами экспрессии токсинов, которых описано немало. В работе [18] ген эрабутоксина А экспрессировали в *E. coli*,

сшивая его с геном фрагмента белка А. Однако выход рекомбинантного белка в этой системе составил всего 2 мг с 1 г сухих клеток, что примерно соответствует 2 мг белка с 1 л бактериальной культуры. В еще одной работе этих же авторов [19] также не удалось достичь уровня биосинтеза целевого белка – α -кобротоксина из яда *N. kaouthia* выше 1.2 мг/л бактериальной культуры. Группой американских ученых была опубликована работа [20], в которой α -бунгаротоксин нарабатывали в клетках *Pichia pastoris* в виде секретирующегося белка, но и тут выход белка составил около 1 мг/л. Наиболее успешной является работа китайских коллег [21], демонстрирующая систему для экспрессии в *E. coli*, которая позволяет получать короткий α -нейротоксин из яда кобры в составе гибридного белка с тиоредоксином. Гибридный белок секретировался в периплазматическое пространство клеток *E. coli*. Выход нейротоксина в этой работе достигает 12 мг/л бактериальной культуры, однако рекомбинантный нейротоксин, полученный в результате кислотного гидролиза гибридного белка, имеет дополнительный аминокислотный остаток пролина на N-конце молекулы.

Достигнутый нами уровень экспрессии предполагает, что использование нашей экспрессирующей системы позволит нарабатывать в миллиграммовых количествах и мутантные варианты нейротоксина II (даже в случае вероятного падения уровня экспрессии после мутагенеза в несколько раз). Получение различных мутантных вариантов нейротоксина II и дальнейшее их исследование позволит не только изучить механизмы, лежащие в основе взаимодействия молекул нейротоксинов с никотиновыми ацетилхолиновыми рецепторами, но и выяснить принципиальную разницу между короткими и длинными нейротоксинами, узнать, что же является определяющим во взаимодействии разных лигандов с тем или иным типом рецепторов. Это, несомненно, приведет к созданию эффективных терапевтических средств для лечения различных заболеваний нервной системы.

В ближайшем будущем планируется проведение дальнейших экспериментов по выявлению идентичности рекомбинантного нейротоксина II и природного нейротоксина II, в том числе, сравнительных биологических испытаний.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Все генно-инженерные манипуляции выполнялись как описано в работе [17].

Конструирование генов и векторов. Реакция ПЦР для амплификации гена, кодирующего тиоредоксин, проводилась в следующих условиях. Реакционная смесь содержала 10 нг хромосомной

ДНК штамма *E. coli* TG1, 0.2 мМ дезоксинуклеозидтрифосфаты (dATP, dGTP, dTTP, dCTP), 1 мкМ праймеры *ptr5* и *ptr3*, 1 ед. акт. термостабильной полимеразы Vent в 50 мкл реакционного буфера: 20 мМ Трис-HCl, pH 8.8, 10 мМ KCl, 2 мМ MgSO₄, 10 мМ (NH₄)₂SO₄, 0.1% Тритон X-100. Цикл амплификации включал в себя: денатурацию ДНК при 96°C в течение 1 мин, отжиг праймера при 60°C в течение 1 мин, синтез ДНК при 74°C в течение 1 мин. Всего проводили 35 циклов на приборе для ПЦР фирмы TECHNE.

Реакционная смесь для проведения реакции амплификации гена нейротоксина II содержала в 50 мкл реакционного буфера 1 нг ДНК, полученной в результате лигирования олигонуклеотидов *nno1-nno9*, четыре дезоксинуклеозидтрифосфата (0.2 мМ каждый), праймеры *nno1* и *nno10* (1 мкМ каждый), 1 ед. акт. термостабильной полимеразы Vent. Условия проведения ПЦР были те же и отличались только температурой отжига. Температура отжига в этой и последующих реакциях рассчитывалась по формуле $T(^{\circ}\text{C}) = (\text{число A/T-пар}) \times 2^{\circ}\text{C} + (\text{число C/G-пар}) \times 4^{\circ}\text{C}$.

Для введения мутаций *E30H* и *Q62H* в ген тиоредоксина была проведена реакция ПЦР. Реакционная смесь объемом 50 мкл содержала 100 нг плазмидной ДНК, четыре дезоксинуклеозидтрифосфата (0.2 мМ каждый), праймеры (1 мкМ каждый) и 1 ед. акт. термостабильной полимеразы Vent.

Замена аминокислотного остатка метионина в последовательности тиоредоксина на аланин была проведена с помощью сайт-направленного мутагенеза по методике (Stratagene, США).

Экспрессия рекомбинантных генов. Клетки штамма *E. coli* BL21(DE3)(pLysS) трансформировали рекомбинантным вектором и рассеивали на чашки с антибиотиками: ампициллином (100 мкг/мл) и хлорамфениколом (34 мкг/мл). Для наращивания клеточной массы с поверхности чашек собирали примерно 0.5–2.0 колонии/мл и суспендировали их в среде ТВ (12 г/л бактотриптона, 24 г/л дрожжевого экстракта, 0.04% глицерина и 1/10 объема раствора фосфатов: 0.17 М КН₂РО₄, 0.72 М К₂НРО₄, pH 7.4), содержащей ампициллин (100 мкг/мл). Культивирование проводили при 12°C и постоянном перемешивании до достижения оптического поглощения культуры на длине волны 600 нм величины 1 О.Е. (примерно 24 ч). После этого добавляли IPTG до концентрации 0.025 мМ и выращивание продолжали в тех же условиях в течение ночи.

Выделение гибридного белка. Клетки собирали центрифугированием (2500 g, 45 мин, 4°C) и суспендировали в фосфатном лизисном буфере (20 мМ Na₂НРО₄, 0.1 М NaCl, pH 8.0). Суспензию перенесли в стеклянный стакан, предварительно поставленный в баню со льдом, после чего добавля-

ли PMSF до конечной концентрации 1 мМ. Клетки разрушали ультразвуком на приборе УЗДН-2Т (10 имп. по 20–30 с с перерывами по 3 мин). Клеточный дебрис отделяли центрифугированием (4000 g, 90 мин, 4°C). Осветленный клеточный лизат наносили на металлохелатную аффинную смолу Chelating Sepharose FF, заряженную Ni²⁺ и уравновешенную 50 мМ Na₂HPO₄, 0.1 М NaCl, 1 мМ имидазола, pH 7.6. Белки элюировали возрастающим градиентом концентрации имидазола (от 1 мМ до 0.1 М). Гибридный белок выходил с колонки при концентрации имидазола примерно 0.012 М. Удалив избыток соли при помощи диализа и сконцентрировав белок ультрафильтрацией, его очищали на анионообменной колонке Mono-Q HR 10/10 (FPLC, Pharmacia, Швеция), уравновешенной 20 мМ Трис-HCl, pH 7.6, в возрастающем градиенте концентрации NaCl (от 0 до 1 М). Гибридный белок TRX/SpH1/SpH2/Leu-Met/NT II элюировался с колонки при концентрации NaCl 0.12 М. Выделенный таким образом белок диализовали против воды Milli-Q и лиофилизовали.

Расщепление гибридного белка бромцианом проводили в 70% трифторуксусной кислоте с 300-кратным мольным избытком BrCN в расчете на количество остатков метионина; концентрация гибридного белка 0.5–1.0 мг/мл. Инкубацию осуществляли в темноте при комнатной температуре в течение 16 ч. Реакционную смесь разбавляли водой в 10–20 раз и лиофильно высушивали.

Выделение рекомбинантного нейротоксина II. Продукты реакции гидролиза гибридного белка бромцианом фракционировали на катионообменной колонке Mono-S HR 10/10 (FPLC, Pharmacia, Швеция), уравновешенной 50 мМ NaOAc, 0.01 М NaCl, pH 5.0. Белки элюировали в градиенте концентрации NaCl (от 0.01 до 1 М). Нейротоксин II элюировался с колонки при концентрации соли примерно 0.14 М.

Аналитические методы. Все этапы наработки, выделения и очистки белков контролировали с помощью электрофореза в 12% SDS-ПААГ-геле в Трис-трициновой буферной системе.

Анализ N-концевых аминокислотных последовательностей полученных белков проводили автоматической деградацией по Эдману [22] с использованием газофазного секвенатора 470А (Applied Biosystems, США).

Чистоту и аутентичность рекомбинантного нейротоксина анализировали при помощи масс-спектрометрии на установке Finningan MAT SSQ 710 (Finningan, США), оборудованной простым квадрупольным масс-анализатором и электрораспыляющей приставкой (Analytica of Branford, США). Измеренная молекулярная масса рекомбинантного нейротоксина II (6875.7 Да) соответствовала его расчетной массе – 6876.7 Да.

Спектры ¹H-ЯМР снимали при 30°C в H₂O (10% D₂O), pH 3.0 на спектрометре UNITY-600 (Varian, США) с рабочей частотой протонов 600 МГц. Концентрация исследуемых белков составляла 1 мМ.

Авторы выражают благодарность сотрудникам ИБХ Н.С. Быстрову за синтез праймеров, использованных в работе, А.А. Тагаеву, Э.В. Бочарову и З.О. Шенкареву – за помощь в проведении экспериментов по идентификации рекомбинантного нейротоксина II.

Работа проводилась при частичной финансовой поддержке INTAS-RFBR-95-1068 и РФФИ (грант № 00-04-48318а).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hucho F., Weise C. // *Angew. Chem.* 2001. V. 40. P. 3100–3116.
2. Elgoyhen A.B., Vetter D.E., Katz E., Rothlin C.V., Heinemann S.F., Boulter J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. V. 98. P. 3501–3506.
3. Hevers W., Luddens H. // *Mol. Neurobiol.* 1998. V. 18. P. 35–86.
4. Cardoso R.A., Brozowski S.J., Chavez-Noriega L.E., Harpold M., Valenzuela C.F., Harris R.A. // *J. Pharmacol. Exp. Therapeutics.* 1999. V. 289. P. 774–780.
5. Paterson D., Norberg A. // *Prog. Neurobiol.* 2000. V. 61. P. 75–111.
6. Sine S.M., Quiram P., Papanikolaou F., Kreienkamp H.J., Taylor P. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. P. 8808–8816.
7. Maslennikov I.V., Shenkarev Z.O., Zhmak M.N., Ivanov V.T., Methfessel C., Tsetlin V.I., Arseniev A.S. // *FEBS Lett.* 1999. V. 444. P. 275–280.
8. Golovanov A.P., Lomize A.L., Arseniev A.S., Utkin Y.N., Tsetlin V.I. // *Eur. J. Biochem.* 1993. V. 213. P. 1213–1223.
9. Takahashi N., Creighton T.E. // *Biochemistry.* 1996. V. 35. P. 8342–8353.
10. Yasukawa T., Kanei-Ishii C. // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. P. 25328–25331.
11. Vallie E.R., Diblasio E.A. // *Biotechnology.* 1993. V. 11. P. 187–191.
12. Williams G., Ruegg N. // *Biochemistry.* 1995. V. 34. P. 1787–1797.
13. Grant G.A., Lurtje C.W., Summers R., Xu X.L. // *Biochemistry.* 1998. V. 37. P. 12166–12171.
14. Hoog J.O., von Bahr-Lindstrom H., Josephson S., Wallace B.J., Kushner S.R., Jornvall H., Holmgren A. // *Bio-sci. Rep.* 1984. V. 4. P. 917–923.
15. Lu Z., DiBlasio-Smith E.A. // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. P. 5059–5065.
16. Schein C.H., Noteborn M.H.M. // *Biotechnology.* 1988. V. 6. P. 291–295.
17. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor; N.Y.; Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989.
18. Drevet P., Lemaire C., Gasparini S., Zinn-Justin S., Lajeunesse E., Ducancel F., Pinkasfeld S., Courcon M.,

- Tremeau O., Boulain J.C., Menez A.* // Protein Expr. Purif. 1997. V. 10. P. 293–300.
19. *Antil S., Servent D., Menez A.* // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. P. 34851–34858.
20. *Levandoski M.M., Caffery P.M., Rogowski R.S., Lin Y., Shi Q.-L., Hawrot E.* // J. Neurochemistry. 2000. V. 74. P. 1279–1289.
21. *Wang Y., Jing L., Xu K.* // J. Biotechnol. 2002. V. 94. P. 235–244.
22. *Edman P., Henschen A.* // Protein Sequence Determination / Ed. S.B. Needleman. 2nd ed. Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 1975. P. 232–279.

A Large-Scale Expression in *Escherichia coli* of Neurotoxin II from *Naja oxiana* Fused with Thioredoxin

E. N. Lyukmanova, A. A. Shulga[#], D. A. Arsenieva, K. A. Pluzhnikov,
D. A. Dolgikh, A. S. Arseniev, and M. P. Kirpichnikov

Phone: +7 (095) 335-2888; fax: +7 (095) 335-5033; e-mail: shua@nmr.ru

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

Neurotoxin II from the venom of cobra *Naja oxiana* is a short type α -neurotoxin, which competitively inhibits nicotinic acetylcholine receptor. The toxin gene was expressed as a construct fused with the thioredoxin gene and the linker encoding the enteropeptidase recognition site and a Met residue between the genes. The fusion protein was mainly cleaved by cyanogen bromide, since enteropeptidase was less effective. The yield of neurotoxin II was 6 mg/l of the bacterial culture. The resulting recombinant protein was identified with native neurotoxin II by its *N*-terminal analysis, mass spectrometry, and NMR spectroscopy. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004, vol. 30, no. 1; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: expression in *Escherichia coli*, α -neurotoxins, nicotinic acetylcholine receptor, thioredoxin