



УДК 577.151.02:577.175.76:577.213.3

РЕКОМБИНАНТНЫЙ ТИМОЗИН α_1 **© 2004 г. Р. С. Есипов[#], А. И. Гуревич, В. Н. Степаненко, Л. А. Чупова,
Д. В. Чувиковский, А. И. Мирошников***Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10*

Поступила в редакцию 24.11.2003 г. Принята к печати 15.12.2003 г.

Осуществлен химико-ферментативный синтез и клонирование в *Escherichia coli* искусственного гена, кодирующего тимозин α_1 . Сконструирована рекомбинантная плаزمид, содержащая гибридный ген белка, в котором соединены аминокислотные последовательности тимозина α_1 и интеина Scv VMA из *Saccharomyces cerevisiae*. Изучена экспрессия полученного гибридного гена в *E. coli*, свойства образующегося гибридного белка и условия его неферментативного расщепления с образованием тимозина α_1 .

Ключевые слова: тимозин α_1 , гибрид тимозина α_1 с интеином, неферментативное расщепление гибридного белка.

ВВЕДЕНИЕ

Тимозин α_1 – один из более чем 30 низкомолекулярных пептидов (28 а.о.), содержащихся в тимусе [1], обладает мощной общей иммуностимулирующей активностью. Тимозин α_1 синтезируется в организме в виде предшественника, от которого затем отщепляется и подвергается *N*-концевому ацелированию. Однако установлено, что *N*-дезацелилтимозин α_1 также проявляет полный спектр биологических активностей нативного пептида [2].

Тимозин α_1 является перспективным лекарственным препаратом и в настоящее время применяется для лечения различных бактериальных инфекций (в том числе резистентного к антибиотикам туберкулеза), вирусных заболеваний (гепатиты В и С), а также в качестве противоопухолевого средства [3].

В настоящее время тимозин α_1 выделяют из тимуса теленка при помощи многостадийной хроматографической очистки [4] или получают полным химическим синтезом. Значительно более перспективным представляется биотехнологический путь с использованием экспрессии рекомбинантного гена в бактериях. Такой путь уже был неоднократно использован ранее для получения тимозина α_1 в составе различных гибридных белков. Еще в 1980 г. группой фирмы “Genentech” был осуществлен микробиологический синтез ги-

брида тимозина α_1 с β -галактозидазой *Escherichia coli* [2]. Однако в таком гибриде доля пептида составляет менее 3%, что обесценивает высокий уровень экспрессии гибридного гена в клетках бактерий. Более целесообразным при конструировании гибрида явилось использование в качестве “носителя” небольшого по размерам белка-фактора некроза опухолей человека (TNF) [4, 5]. Однако во всех этих случаях основные трудности в процессе получения целевого пептида – тимозина α_1 – возникали при расщеплении гибридного белка, в результате которого, как правило, получение целевого полипептида происходило с малым выходом и сопровождалось образованием трудно отделяемых продуктов неспецифических реакций.

В этом отношении более перспективным представляется получение гибрида с интеином, белковым “интроном”, способным к автокаталитическому сплайсингу, т.е. выщеплению из структуры предшественника и сопутствующему лигированию *N*- и *C*-фланкирующих белковых фрагментов, так называемых экстеинов [6, 7]. Механизм реакций, протекающих в *N*- и *C*-концевых доменах интеина и приводящих к сплайсингу, приведен на рис. 1б.

В своей работе мы использовали IMPACT-систему (Intein Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag) фирмы “New English BioLabs”, принципиальное отличие которой от других систем заключается в получении целевого белка без использования сериновых протеназ и других факторов, способных расщеплять гибридный белок. В ней используется модифицированный интеин Scv VMA из *Saccharomyces cerevisiae*, содер-

Сокращения: ПЦР – полимеразная цепная реакция; ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; DTT – дитиотреит; IPTG – изопропил- β -D-тиогаалактозид; TFA – трифторуксусная кислота; ГБ – гибридный белок.

[#] Автор для переписки (тел.: (095) 336-68-33; эл. почта: esipov@ibch.ru).

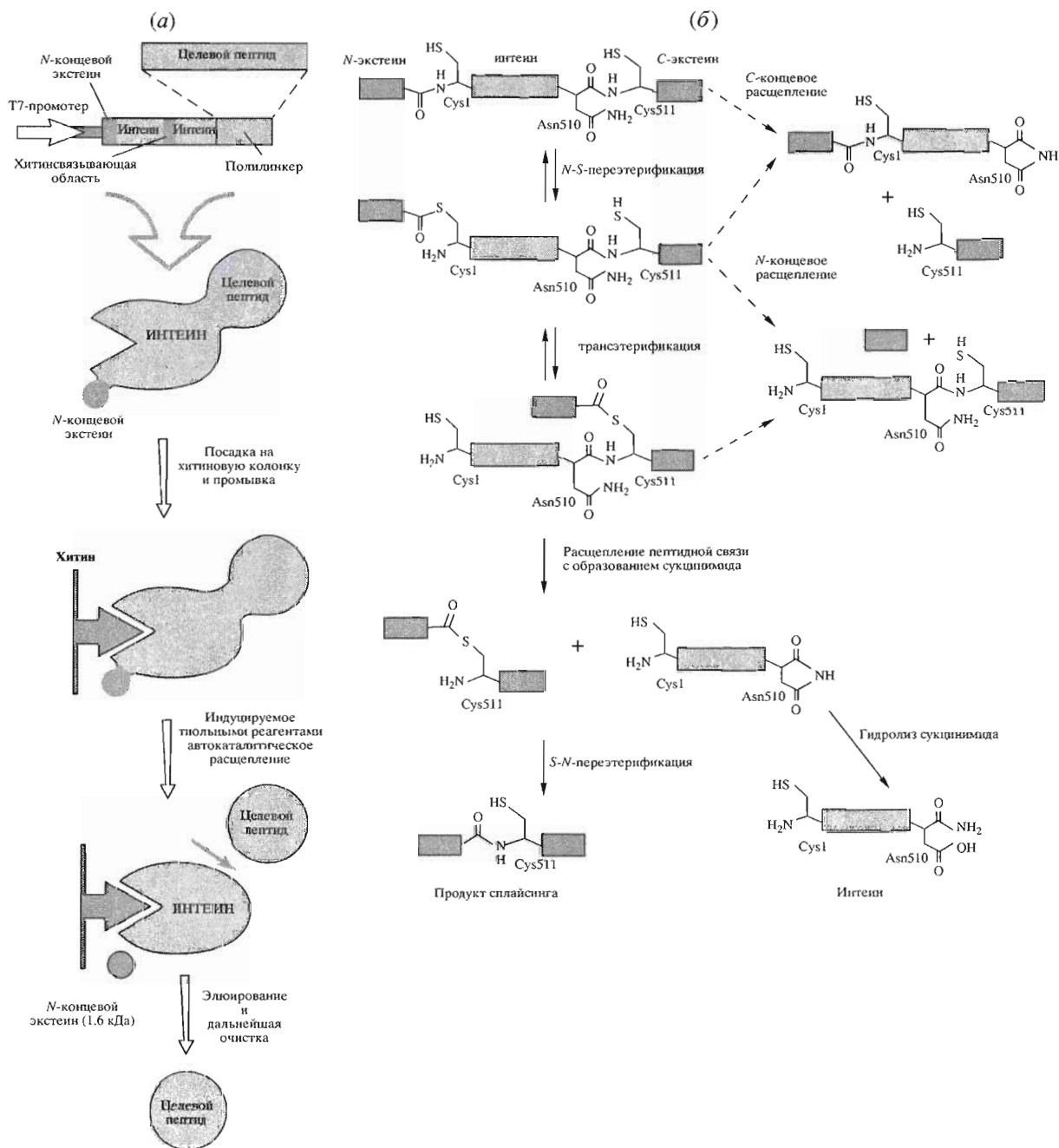


Рис. 1. Структура гибридного белка с интеином и механизм реакций его расщепления: (а) схема реакций при выделении тимозина α_1 на хитиновой колонке; (б) механизм реакций трансрасщепления гибридных белков с интеином.

жащий хитинсвязывающий домен, который позволяет легко отделять гибридный белок путем аффинной хроматографии (см. рис. 1а). В присутствии тиольных реагентов, таких, как дитиотреит, меркаптоэтанол или цистеин, гибридный белок способен к самопроизвольному сайт-специфическому расщеплению, при котором образуется интеин, целевой белок и маленький фрагмент N-экстеина (около 1.6 кДа) (см. рис. 1).

Используя эту экспрессионную систему, мы клонировали искусственный ген тимозина α_1 в

векторе pTYB-11, включающем структуру интеина Scе VMA из *S. cerevisiae*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении механизма белкового сплайсинга, предполагаемая схема которого приведена на рис. 1б, было найдено, что расщепление пептидной связи у N-конца интеина (в большинстве случаев остатка Cys1 или Ser1, и реже – Thr1) индуцируют тиольные реагенты [8]. В этой реакции



Рис. 2. Структура тимозина α_1 и его искусственного гена. (a) – аминокислотная последовательность тимозина α_1 и нуклеотидная последовательность соответствующих кодонов в гене; (б) – структура искусственного гена тимозина α_1 с соответствующими сайтами рестриктаз; (в) – схема синтеза искусственного гена тимозина α_1 .

N-концевой участок интеина претерпевает перегруппировку, в которой Cys1 превращается в тиоэфир, который в свою очередь атакуется нуклеофильным реагентом (например, дитиотреитом), что и ведет к *N*-концевому расщеплению.

С другой стороны, отщепление *C*-эксциптонового фрагмента не нуждается в индукции каким-либо реагентом. Оно происходит спонтанно, но лишь в узких пределах температуры и pH среды. При этом находящийся на *C*-конце интеинового фрагмента остаток Asp (который чаще всего соседствует с остатком His) превращается в сукцинимид [9]. Условия протекания последней реакции были детально изучены [10–13]. Оптимальным для нее является присутствие в соседнем с остатком Asp положении эксциптонового фрагмента остатков Cys, Ser или Thr. Следует отметить, что те же самые аминокислотные остатки в положении 1 *N*-концевого участка интеина необходимы для расщепления *N*-терминальной пептидной связи и последующей реакции лигирования в процессе белкового сплайсинга [8]. Это обстоятельство служит причиной нежелательного образования продуктов сплайсинга уже при культивировании бактериального продуцента, которое существенно снижает выход целевого рекомбинантного белка.

Недавно было установлено, что на процесс сплайсинга существенное влияние оказывает присутствие некоторых ионов металлов; так, в присутствии хлорида цинка хелатирование иона цинка с интеином ингибирует процесс сплайсинга, а также реакцию гидролиза при *N*-терминальном трансрасщеплении (т.е. при взаимодействии отдельно полученных частей молекулы одного и того же интеина) и спонтанную реакцию *C*-терминального трансрасщепления у интеина. Эффект ионов Zn^{2+} снимается в присутствии EDTA [12, 14].

Спонтанное трансрасщепление было обнаружено в структурах, содержащих в *C*-концевом эксциптоне остаток Cys1. Структуры, содержащие в *C*-концевом эксциптоне остаток Ser1, в этом отношении ранее не были изучены. Поэтому тимозин α_1 , имеющий на *N*-конце остаток Ser, кроме своей биологической значимости, представлял собой интересный объект для исследования механизма сплайсинга.

Аминокислотная последовательность тимозина α_1 и нуклеотидная последовательность соответствующих кодонов в гене приведены на рис. 2а. Искусственный ген тимозина α_1 , структура которого приведена на рис. 2б, мы синтезировали из олигонуклеотидов TY-1 – TY-9 по приведенной на рис. 2в схеме, используя для ПЦР-амплификации праймеры P_rTY1 и TY-9. Полученный таким образом дуплекс после расщепления соответствующими рестриктазами *Bam*HI и *Hind*III лигировали с векторной плазмидой pBR322. Образовавшуюся плазмиду после клонирования в клетках *E. coli* выделяли, расщепляли рестриктазами *Sap*I и *Eco*RI, полученный при этом *Sap*I/*Eco*RI-фрагмент с геном тимозина α_1 лигировали с векторной плазмидой pTYB-11 и образовавшуюся экспрессионную плазмиду pIntTim3 клонировали в клетках *E. coli* ER2566. Полученный при этом продуцент *E. coli* ER2566/pIntTim3 культивировали при 37°C до оптического поглощения культуры 0.6–0.7, затем индуцировали IPTG и выращивали 14–16 ч при 14°C. При этом из лизата клеток удавалось получить гибридный белок (ГБ) в растворимой форме, в отличие от культивирования после индукции при 37°C. Однако в лизате клеток при этом обнаруживался также один из продуктов сплайсинга, собственно интеин, в количестве до 20% (см. рис. 3 и 4).

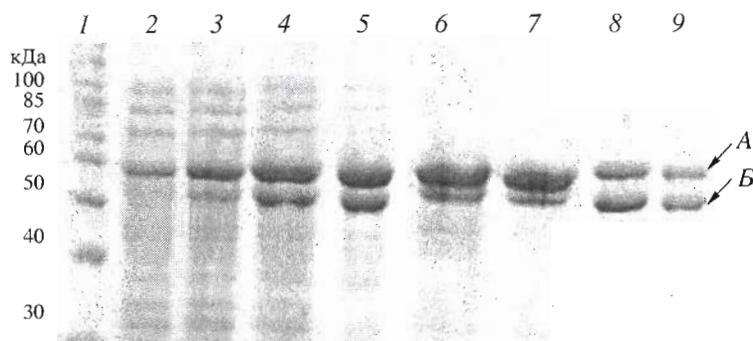


Рис. 3. SDS-электрофорез в 10% ПААГ тотальных лизатов клеток продуцента *E. coli* ER2566/pIntTim3, индуцированных IPTG в присутствии $ZnCl_2$ в концентрации 10 (2) и 1–3 мМ (3), а также в отсутствие $ZnCl_2$ (4); супернатанта после двукратной ультразвуковой дезинтеграции клеток продуцента *E. coli* ER2566/pIntTim3, индуцированных IPTG в присутствии 1–3 мМ $ZnCl_2$, в буфере А (5), в буфере А-1 (6); продуктов расщепления на колонке с хитиновым сорбентом в буфере Б, содержащем 0.1–0.5 мМ $ZnCl_2$ в нулевой момент времени (7) и после инкубации в течение 18 ч при 25°C без (8) и в присутствии 50 мМ дитиотреита (9). Стандарты молекулярных масс, 10–200 кДа (Fermentas #SM0661) (1).

Стрелками показаны: А – гибридный белок, включающий *N*-экстеиновый фрагмент, интеин *Sc* VMA и тимозин α_1 ; Б – продукт автокаталитического расщепления (сплайсинга) – интеин *Sc* VMA.

Чтобы избежать преждевременного расщепления гибридного белка в процессе роста клеток продуцента нами были подобраны такие условия культивирования, при которых процесс сплайсинга не происходил. Такой эффект достигался за счет введения в культуральную среду после индукции хлорида цинка до концентрации 4–7 мМ.

Дальнейшее увеличение концентрации хлорида цинка приводило к резкому снижению плотности культуры и количества ГБ, уменьшение же концентрации – к появлению продуктов сплайсинга.

Процесс сплайсинга гибридного белка происходил не только *in vivo*, но и в ходе дальнейшего выделения цитоплазматической фракции, при последовательной ультразвуковой обработке. При этом доля продуктов сплайсинга (расщепления) возрастала до 50–70%, а после аффинной хроматографии наличия исходного ГБ совсем не наблюдалось (все операции проводились при 4°C) (см. рис. 3). Избежать преждевременного расщепления ГБ удалось, заменив в буферах при разрушении клеток, а также в растворах для хроматографии и инициации расщепления EDTA на 1–2 мМ хлорид цинка, причем pH всех буферов не превышал 7.5 во избежание выпадения гидроксида цинка (рис. 3).

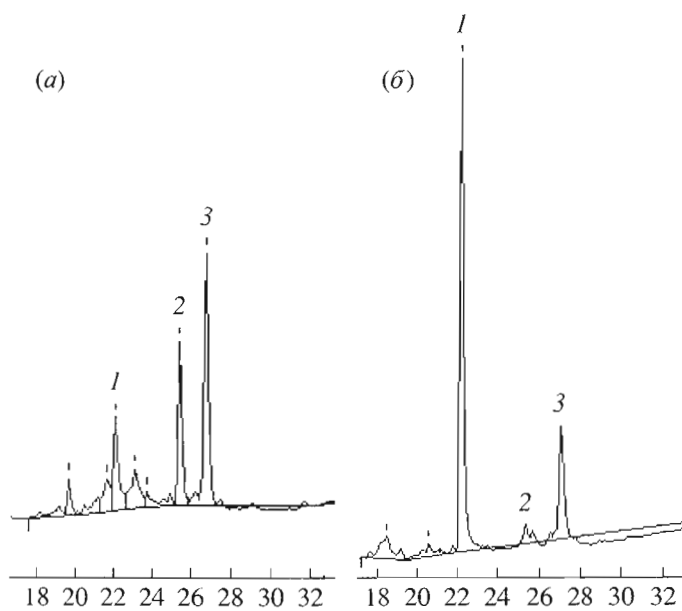


Рис. 4. Хроматографический анализ полипептидных продуктов автокаталитического расщепления (сплайсинга) гибридного белка IntTim. Хроматографию проводили в градиенте концентрации ацетонитрила (10–80%) в 0.1% TFA со скоростью 0.5 мл/мин. (а) – анализ продуктов расщепления в буфере А, содержащем 0.5 мМ $ZnCl_2$ и 50 мМ дитиотреит; (б) – анализ продуктов расщепления в буфере А, содержащем 0.5 мМ $ZnCl_2$. 1 – тимозин α_1 ; 2 – *N*-экстеиновый фрагмент; 3 – продукт сплайсинга.

В нашем случае ГБ интеина с тимозином α_1 (Ser1) мы нашли, что максимальный выход целевого пептида и минимальный – продуктов сплайсинга – наблюдается при отсутствии в буфере для расщепления дитиотреита и наличии 0.5–1 мМ хлорида цинка (см. рис. 4). В то же время, если в среде присутствовали одновременно дитиотреит и хлорид цинка, то это приводило к постепенному накоплению продуктов сплайсинга (см. рис. 4).

Идентификацию образующихся полипептидных продуктов на всех стадиях получения и выделения тимозина α_1 проводили с помощью MALDI-масс-спектрометрии. Структура тимозина α_1 была подтверждена определением *N*- и *C*-концевых аминокислотных последовательностей.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали Трис, акриламид, *N,N*-метиленбисакриламид, персульфат аммония (Merck); агарозу, АТФ, dNTP, бромистый этидий, IPTG, DTT, SDS, EDTA (Sigma); мочевины, "ос. ч." (Реахим); [γ - 32 P]АТФ, [α - 32 P]dАТФ (2000 Ки/ммоль, Обнинск); Т4-ДНК-лигазу (КФ 6.5.1.1), Т4-поли-нуклеотидкиназу (КФ 2.7.1.78), *Taq*-ДНК-полимеразу (КФ 2.7.7.7), эндонуклеазы рестрикции (КФ 32.1.23х): *Bam*HI, *Eco*RI и *Hind*III (Fermentas, Вильнюс) и *Sap*I (New England BioLabs); хитиновый сорбент (New England BioLabs).

Штамм *E. coli* ER2566 [F λ -*fhuA2(lon)ompT-lacZ::T7genel gal sulA11Δ(mcrC-mrr)114::IS10R(mcr-73::miniTn10)2R(zgb-210::Tn10)1(Tet^s)endA1(dcm)*]; плазмидный вектор рТУВ-11 (New England BioLabs). Агар, триптон, дрожжевой экстракт (Difco).

Защищенные олигонуклеотиды синтезировали традиционным фосфоамидитным методом на синтезаторе ASM-102Т (БИОССЕТ, Новосибирск) и после деблокирования выделяли как описано в работе [15]. Работу с рекомбинантными ДНК, трансформацию компетентных клеток и клонирование проводили в соответствии с руководством [16].

ПЦР осуществляли на амплификаторе Gene-Cycler (Bio-Rad) в 50 мкл инкубационной смеси, содержащей около 20 пмоль ДНК-матрицы по 80 пмоль соответствующих праймеров в стандартных условиях в соответствии с руководством [16]. Продукты амплификации идентифицировали после разделения в 2% агарозном геле.

Для анализа белков бактериальную культуру (1 мл) центрифугировали, ресуспендировали в лизирующем буфере [17], нагревали 5 мин при 100°C и белки разделяли в 10% ПААГ в присутствии 0.1% SDS [17]. Гели прокрашивали Кумасси R-250 и сканировали на сканере Microtek; интегрирование пиков проводили по программе Sigma-Gel (Jandel).

Содержание белка в препаратах определяли по методу [17].

ВЭЖХ осуществляли на колонке (4.6 × 125 мм) с сорбентом Nucleosil 100 C₁₈ (5 мкм) при элюировании в градиенте 10–80% ацетонитрила с 0.1% TFA со скоростью 0.5 мл/мин.

Выделение гибридного белка. Штамм продуцента *E. coli* ER2566/pIntTim3 культивировали в среде YT, содержащей 50 мг/мл ампициллина при 37°C до оптического поглощения культуры A₅₉₅ 0.6, затем индуцировали IPTG (до концентрации 0.2 мМ) и выращивали 14–16 ч при 14°C. Клетки отделяли центрифугированием (5000 g, 20 мин, 4°C). Из 1 л культуры получали 1.0 г влажных клеток. Клетки ресуспендировали в буфере А (50 мМ Трис-НСl, 10 мМ EDTA, 200 мМ NaCl, рН 7.5) или А-1 (50 мМ Трис-НСl, 1–2 мМ ZnCl₂,

200 мМ NaCl, рН 7.5) и затем лизировали с помощью ультразвукового дезинтегратора. Осадок после центрифугирования (15000 g, 45 мин) отделяли, ресуспендировали в буфере А или А-1, снова центрифугировали и промывали тем же буфером (А или А-1), содержащим 1% Тритона X-100.

Супернатант в буфере А-1 наносили на колонку (100 × 5 мм) с хитиновым сорбентом при скорости потока 0.5 мл/мин, промывали сорбент буфером А, содержащим 1% Тритона X-100 (30 объемов колонки). Гибридный белок оставался адсорбированным на хитиновом сорбенте. Выход гибридного белка из 1.0 г клеток составил 25.5 мг или 27% суммарного белка клеток продуцента.

Расщепление гибридного белка и выделение тимозина α_1 . Промытую колонку с адсорбированным гибридным белком уравнивали буфером Б (50 мМ Трис-НСl, 0.1–0.5 мМ ZnCl₂, 200 мМ NaCl, рН 7.5) и инкубировали 48 ч при 25°C. Колонку промывали 2 объемами буфера Б и фракции элюата анализировали с помощью ВЭЖХ (см. рис. 4). Полученные фракции после ВЭЖХ анализировали с помощью MALDI-масс-спектрометрии. Найденные значения масс: тимозин α_1 (М 3064.7), *N*-экстеиновый фрагмент (М 1646.7), продукт сплайсинга (М 4714.6) соответствовали расчетным величинам.

Суммарный выход очищенного тимозина α_1 составил около 1 мг, что составило 69% от теоретически возможного.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 02-04-48097).

Авторы выражают благодарность А.Л. Каюшину за синтез олигодезоксинуклеотидов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hooper J.A., McDaniel M.C., Thurman G.B., Cohen C.H., Schullof R.S., Goldstein A.L. // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1975. V. 24. P. 125–127.
2. Wetzel R., Heyneker H.L., Goeddel D.V., Jhurani P., Crea R., Low T.L.K., McClure J.E., Thurman G.B., Goldstein A.L. // Biochemistry. 1980. V. 19. P. 6096–6104.
3. Ancell C.D., Phipps J., Young L. // Am. J. Health-Syst. Pharm. 2001. V. 58. P. 879–885.
4. Коробко В.Г., Болдырева Е.Ф., Филиппов С.А., Беркова Н.П., Добрынин В.Н., Шмелев В.А., Попов С.Г., Евсегнеев С.И., Носова Л.Ю. // Биоорган. химия. 1992. Т. 18. С. 646–659.
5. Шмелев В.А., Бунина З.Ф., Кудрявцева Т.Ю., Зинченко Е.В., Болдырева Е.Ф., Коробко В.Г. // Мол. генет. микробиол. вирусол. 1995. № 1. С. 9–14.
6. Xu M.Q., Paulus H., Chong S. // Methods Enzymol. 2000. V. 326. P. 376–418.
7. Perler F.B., Olsen G.J., Adam E. // Nucl. Acids Res. 1997. V. 25. P. 1087–1093.
8. Xu M.-Q., Perler F.B. // EMBO J. 1996. V. 15. P. 5146–5153.

9. Mathys S., Evans T.C., Jr., Chute I.C., Wu H., Chong S., Benner J., Liu X.-Q., Xu M.-Q. // *Gene*. 1999. V. 231. P. 1–13.
10. Shao Y., Xu M.-Q., Paulus H. // *Biochemistry*. 1995. V. 34. P. 10844–10850.
11. Chong S., Mersha F.B., Comb D.G., Scott M.E., Landrus D., Vence L.M., Perler F.B., Benner J., Kucera R.B., Hirvonen C.A., Pelletier J.J., Paulus H., Xu M.-Q. // *Gene*. 1997. V. 192. P. 277–281.
12. Ding Y., Xu M.-Q., Ghosh I., Chen X.H., Ferradon S., Lesage G., Rao Z.H. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 39133–39142.
13. Southworth M.W., Amaya K., Evans T.C., Xu M.-Q., Perler F.B. // *Biotechniques*. 1999. V. 27. P. 110–120.
14. Nichols N.M., Benner J.S., Martin D.D., Evans T.C., Jr. // *Biochemistry*. 2003. V. 42. P. 5301–5311.
15. Гуревич А.И., Качалина Т.А., Каюшин А.Л., Коростелева М.Д., Мирошников А.И. // *Биоорганическая химия*. 1993. Т. 19. С. 629–632.
16. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Second Ed. Cold Spring Harbor; N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
17. Laemmli U.K. // *Nature*. 1970. V. 227. P. 680–685.

Recombinant Thymosin α_1

**R. S. Esipov[#], A. I. Gurevich, V. N. Stepanenko, L. A. Chupova,
D. V. Chuvikovskiy, and A. I. Miroshnikov**

[#] Phone: +7 (095) 330-6833; fax +7 (095) 330-7410; e-mail: esipov@ibch.ru

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

An artificial gene encoding thymosin α_1 was obtained by the chemoenzymatic synthesis and cloned into *Escherichia coli*. An expressing recombinant plasmid containing the hybrid protein gene, which encodes amino acid sequences of thymosin α_1 and the *Saccharomyces cerevisiae* intein Sce VMA, was constructed. The expression of the hybrid protein from the resulting hybrid gene in *E. coli*, the properties of the resulting hybrid protein, and the conditions for its nonenzymatic cleavage to thymosin α_1 were studied. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004, vol. 30, no. 5; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: intein–thymosin α_1 hybrid, nonenzymatic cleavage of hybrid protein, thymosin α_1