



УДК 577.214.622

ЭКСПРЕССИЯ СИНТЕТИЧЕСКОГО ГЕНА АНГИОГЕНИНА
ЧЕЛОВЕКА В *E. COLI* В СОСТАВЕ СЛИТОГО БЕЛКА
β-ГАЛАКТОЗИДАЗА-АНГИОГЕНИН

Коваленко С. П.*, Лисняк И. А.***, Мертвецов Н. П.

Новосибирский институт биоорганической химии
Сибирского отделения Академии наук СССР;

* Институт терапии Сибирского отделения

Академии медицинских наук СССР, Новосибирск;

** Институт проблем онкологии Академии наук УССР, Киев

Синтетический ген ангиогенина человека клонировали в плазмиде pUR290 в единой трансляционной рамке с β-галактозидазой так, что две части слитого белка были соединены связью Asp-Pro. При индукции действием изопропил-β-D-тиогалактозида в клетках *E. coli*, несущих гибридную плазмиду, синтезировался слитый белок. Показано, что этот белок обладает ангиогенной активностью на хориоаллантоисной мембране куриных эмбрионов. Слитый белок можно расщепить кислотным гидролизом до ангиогенина и фрагментов β-галактозидазы.

Ангиогенин, основной белок, индуцирующий рост сосудов *in vivo*, был впервые выделен из клеток карциномы человека [1]. Позднее он был обнаружен в плазме крови здоровых людей [2]. Экспрессию гена ангиогенина наблюдали как в нормальных, так и в опухолевых тканях человека и животных [3, 4]. Вопрос о роли ангиогенина в физиологических процессах в норме и патологии пока остается открытым, однако уже сегодня ангиогенин рассматривают как белок, потенциально значимый для лечения ран, ожогов, язв, обсуждается возможность его применения при некоторых сердечно-сосудистых патологиях [5]. Представляет интерес и специфическая рибонуклеазная способность ангиогенина [6].

С целью получения достаточных количеств ангиогенина для медико-биологических испытаний нами проводятся работы по получению генно-инженерного продуцента ангиогенина человека. Ранее был описан химико-ферментативный синтез гена ангиогенина [7], в настоящей работе сообщается об экспрессии в *E. coli* синтетического гена ангиогенина с образованием слитого белка β-галактозидаза-ангиогенин и с последующим химическим отщеплением ангиогенина.

Несмотря на значительное количество работ, посвященных экспрессии синтетических и природных генов в *E. coli* [8], универсальных систем экспрессии пока не создано. Для экспрессии каждого конкретного гена, как правило, подбирают свою оптимальную комбинацию регуляторных элементов. Наиболее универсальными на сегодняшний день можно считать системы, обеспечивающие получение слитых белков. Если принять во внимание доступность экспрессирующих систем и возможность отщепления целевого продукта от синтезируемого слитого белка, то достаточно привлекательной для работы будет выглядеть широко используемая плаزمиды pUR290 [9]. Мы применили эту плазмиду при получении слитого белка β-галактозидаза-ангиогенин. ДНК плазмиды pUR290 гидролизовали рестриктазами *SalGI/HindIII*, смешивали в отношении 1 : 3 с RF-ДНК фага M13-Анг [7], предварительно гидролизованной рестриктазами *XhoI/HindIII*, смесь фрагментов ДНК лигировали, продуктами реакции лигирования трансформировали клетки *E. coli* JM103. Устойчивые к ампициллину трансформанты анализировали с помощью гибридизации

Использованные сокращения: IPTG — изопропил-β-D-тиогалактопиранозид.

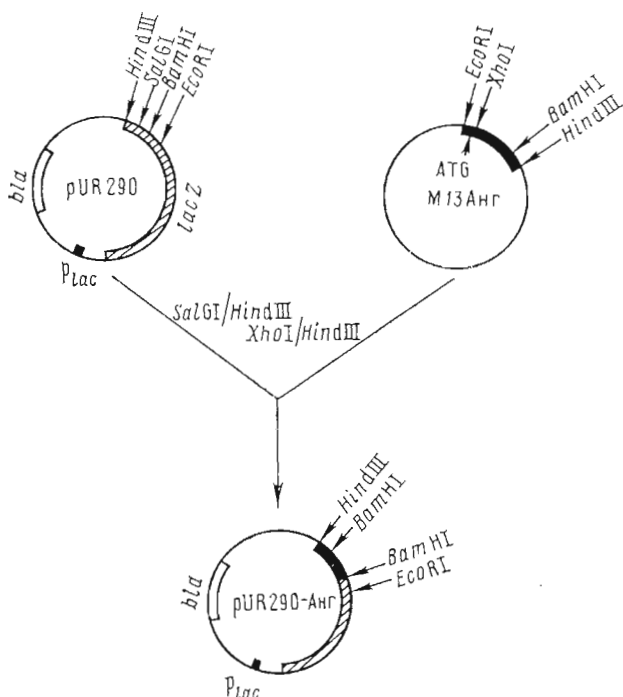


Схема конструирования плазмиды рUR290-Анг. Зачернены и заштрихованы участки структурных генов ангиогенина и β -галактозидазы соответственно

и рестрикционного анализа на наличие вставки, соответствующей по молекулярной массе фрагменту, кодирующему ангиогенин (схема). Из отобранных клонов в дальнейшем использовали один, названный К8. Анализ гель-электрофорезом суммарных клеточных белков клона К8 при индукции *lac*-промотора плазмиды рUR290-Анг с помощью IPTG показал, что молекулярная масса индуцируемого белка увеличена по сравнению с β -галактозидазой (рис. 1) и, по всей вероятности, этот белок является слитым белком β -галактозидаза-ангиогенин.

Полилинкерный участок плазмиды рUR290 содержит последовательность нуклеотидов ...GATCCG..., которая, так же как и в соответствующем участке рекомбинантной плазмиды рUR290-Анг, кодирует последовательность аминокислот Asp-Pro (рис. 2), расщепляемую мягким кислотным гидролизом [10]. В полученном слитом белке последовательность Asp-Pro должна располагаться на границе полипептидов, соответствующих β -галактозидазе и ангиогенину, а следовательно, полипептид, соответствующий ангиогенину, может быть отщеплен мягким кислотным гидролизом [10].

Как и в ряде описанных в литературе примеров [8], слитый белок β -галактозидаза-ангиогенин в клетках *E. coli* существует в виде телец включения, выделение их приводит к значительной очистке слитого белка (до 70–80% чистоты) (рис. 3). Для кислотного расщепления использовали непосредственно тельца включения без их дополнительной очистки. Гидролиз химерного белка 70 или 90% муравьиной кислотой в течение 24–96 ч как при 37° С, так и при 42° С в присутствии гуанидингидрохлорида и без него приводил либо к неполному, либо к недостаточно специфичному расщеплению. Значительно более специфично расщепление протекает в 10% уксусной кислоте (рН до 2,5 доводили пиридинон) в 6М гуанидингидрохлориде за 72–96 ч с образованием полипептида, по молекулярной массе соответствующего природному ангиогенину. В гидролизате β -галактозидазы, выделенной в качестве телец включения из клеток *E. coli*, несущих плазмиду рUR290, этот полипептид отсутствовал (рис. 3).

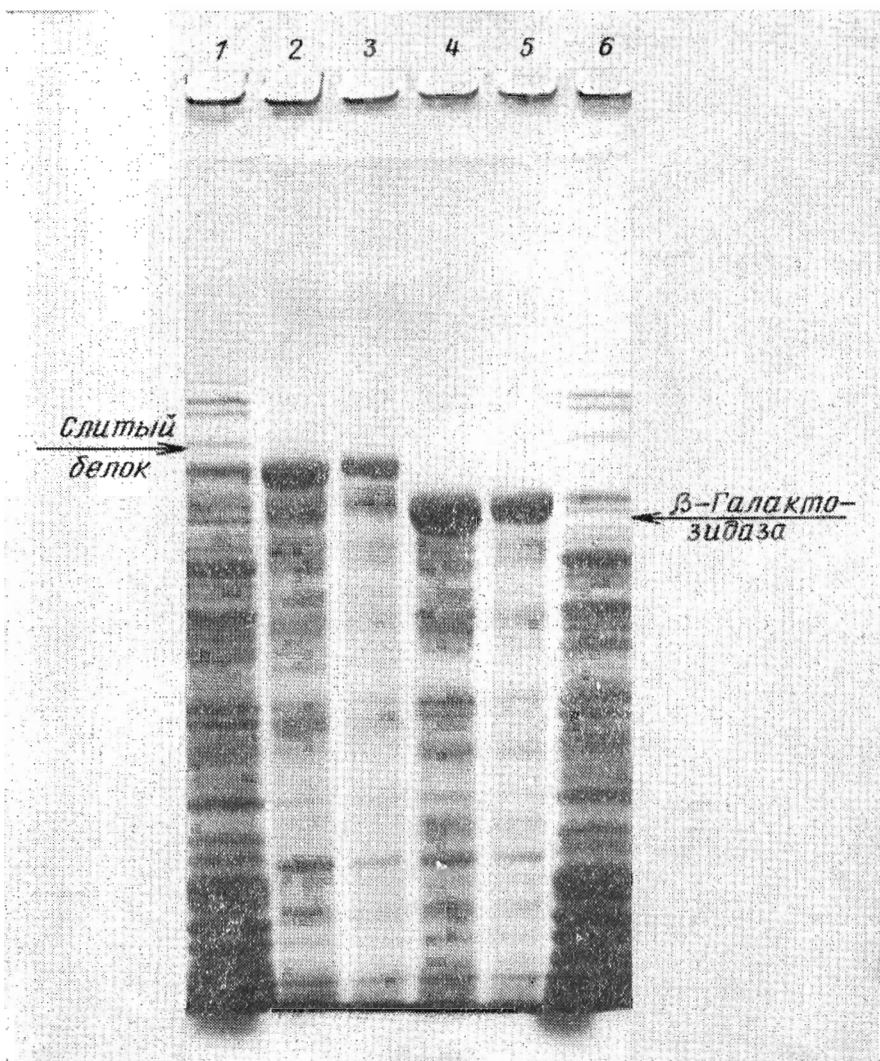


Рис. 1. Электрофорез в 7% ПААГ по Лэмбли суммарных клеточных белков штаммов *E. coli*, несущих плазмиды pUR290-Анг (1-3) или pUR290 (4-6). 1, 6 - выращивание без индукции IPTG, 2-5 - 5 ч выращивания после индукции 1мМ IPTG

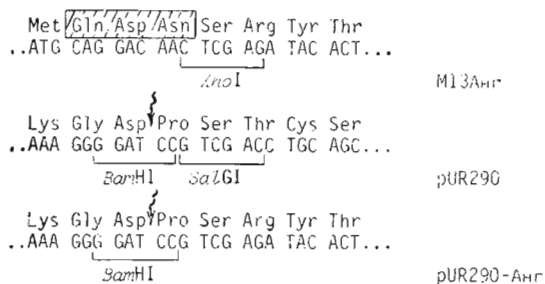


Рис. 2. Фрагменты аминокислотных и соответствующих им нуклеотидных последовательностей плазмид, использованных в работе. Запятрихованы аминокислоты ангиогенина, делетированные в слитом белке, место кислотолабильной пептидной связи обозначено стрелкой

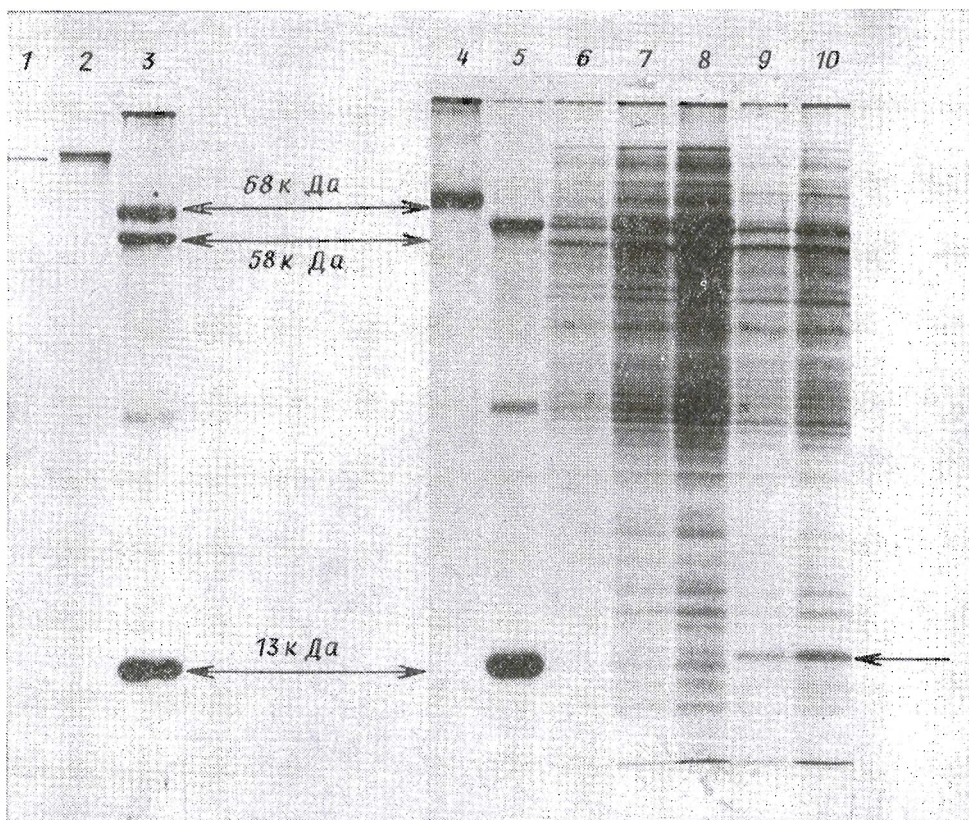


Рис. 3. Электрофорез в 15% ПААГ полипептидов, образующихся при гидролизе тельца включения, выделенных из штаммов *E. coli*, несущих плазмиды рUR290 и рUR290-Анг. 1 – тельца включения *E. coli* с плазмидой рUR290 (β -галактозидаза) до гидролиза; 6–8 – то же после гидролиза 10% уксусной кислотой при 42°С в течение 72 ч (нанесены различные количества одного и того же препарата); 2 – тельца включения *E. coli* с плазмидой рUR290-Анг до гидролиза; 9, 10 – то же после гидролиза; 3–5 – маркеры молекулярных масс белков

Таким образом, используемая система достаточно просто позволила получить слитый белок β -галактозидаза-ангиогенин. Расположение кодонов, кодирующих аминокислотную последовательность Asp-Pro в полилинкерной части плазмиды рUR290, позволяет отщепить целевой полипептид практически при любой схеме клонирования в рUR290. Используемые нами условия расщепления связи Asp-Pro, по всей видимости, могут быть использованы и для других слитых с β -галактозидазой белков: последовательность Asp-Pro, кодируемая полилинкером, по нашим данным, наиболее лабильна при кислотном гидролизе слитого белка. Пептидная связь Asp-Pro расщепляется в аналогичных условиях достаточно избирательно и для других полипептидов [10], в то же время она довольно редко встречается в природных белках [10], следовательно, мягкий кислотный гидролиз в целом ряде случаев не затронет целевой полипептид при расщеплении слитых с β -галактозидазой белков.

Недавно группой французских авторов была описана экспрессия синтетического гена ангиогенина в *E. coli* [11]. Для получения продукции ангиогенина был использован специально сконструированный авторами вектор рXL694. Рекомбинантный белок составлял 2–5% суммарного клеточного белка. В описанном нами случае гибридный белок составляет 15–20% (в пересчете на ангиогенин 1,5–2%) суммарных белков клетки, т. е. количества синтезируемого в *E. coli* ангиогенина в рассматриваемых случаях сопоставимы.

Необходимо отметить, что получаемый в результате кислотного расщепления слитого белка полипептид по аминокислотной последователь-

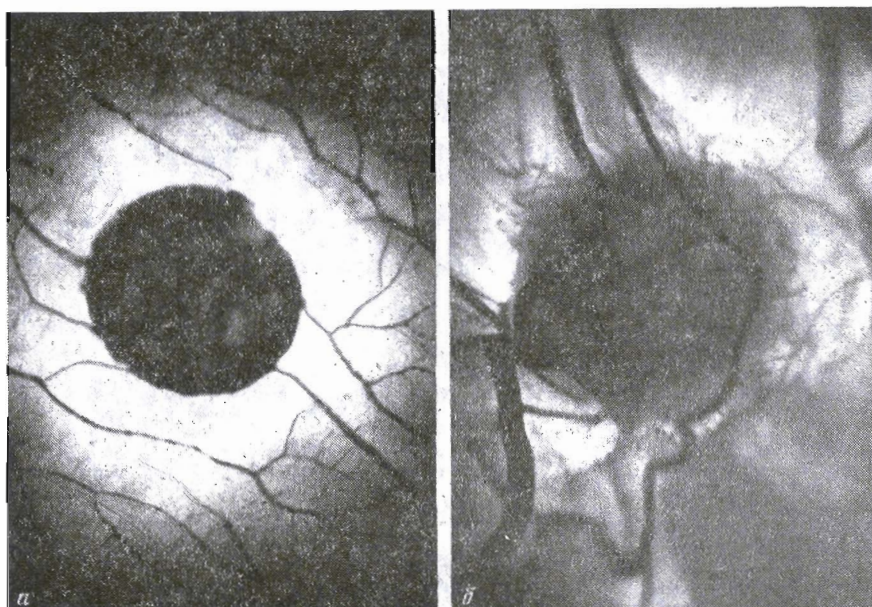


Рис. 4. Эксперимент по тестированию ангиогенной активности белков на хориоаллантоисной мембране куриных эмбрионов: *a* — отсутствие реакции (контроль); *b* — положительная ангиогенная реакция (слитый белок β -галактозидаза-ангиогенин, 1 мг) — видны мелкие сосуды, окружающие бумажный диск с нанесенным образцом слитого белка

ности отличается от природного ангиогенина N-концевой последовательностью аминокислот — пролин вместо Gln-Asp-Asn (рис. 2). Однако подобная модификация представляется несущественной по крайней мере для рибонуклеазной активности белка — в ряду гомологичных ангиогенину рибонуклеаз N-концевой фрагмент варьирует по структуре, что практически не сказывается на их функциональных характеристиках [12].

С помощью биотестов на хориоаллантоисной мембране куриных эмбрионов нами продемонстрировано, что гибридный белок β -галактозидаза-ангиогенин обладает ангиогенной активностью (рис. 4). Минимальное количество слитого белка β -галактозидаза-ангиогенин, индуцирующее ангиогенез на хориоаллантоисной мембране, — 0,1 мг (таблица). Это значительно больше, чем минимальное количество природного ангиогенина, вызывающее неоваскуляризацию в аналогичной системе [1]. Такую разницу можно объяснить наличием «балластной» β -галактозидазы (90% слитого белка), труднодоступностью для клеток водонерастворимых гранул слитого белка из телец включения *E. coli*, а также измененной конформацией белка в тельцах включения *E. coli*. Так или иначе, ангиогенная активность слитого белка выражена достаточно четко.

Таким образом, клонированием синтетического гена ангиогенина в плазмиде pUR290 получена рекомбинантная плаزمид, направляющая

**Ангиогенная активность слитого белка β -галактозидаза-ангиогенин
на хориоаллантоисной мембране куриных эмбрионов**

Препарат телец включения из <i>E. coli</i>	Активность * слитого белка в зависимости от его количества, нанесенного на мембрану, мг				
	10	1	0,1	0,01	0,001
JM103/pUR290 (β -галактозидаза)	Нет данных	—	—	—	—
JM103/pUR290-Анг (слитый белок)	+	+	+	—	—

* «+» — реакция неоваскуляризации, «—» — отсутствие видимой неоваскулярной реакции.

в *E. coli* синтез слитого белка β -галактозидаза-ангиогенин, продемонстрирована ангиогенная активность этого белка, показано, что слитый белок может быть расщеплен мягким кислотным гидролизом до полипептидов, соответствующих фрагментам β -галактозидазы и ангиогенину, отличающемуся от природного заменой N-концевой последовательности аминокислот Glu-Asp-Asn на пролин.

Авторы выражают благодарность В. А. Козозе (Институт цитологии и генетики, Новосибирск) за любезно предоставленный препарат плазмиды рUR290 и П. А. Юдиной за квалифицированную техническую помощь.

Экспериментальная часть

В работе использовали штамм *E. coli* JM103 (*supE*, $\Delta(lac, pro)/F'$, *lac I*^q, Δ M15/), плазмиду рUR290 [9] и фаг M13-Анг [7].

Клетки *E. coli* выращивали на среде YТ×2 [13]. При выращивании штаммов, содержащих плазмиды, в среду добавляли ампициллин до концентрации 50 мкг/мл. Рестрикционные эндонуклеазы *EcoRI*, *SalGI*, *XhoI*, *HindIII* и ДНК-лигаза фага Т4 — препараты производства НПО «Фермент» (Вильнюс), IPTG — производства НИКТИ БАВ (Бердск).

Трансформацию клеток *E. coli*, выделение и рестрикционный анализ плазмидной ДНК проводили как описано в работе [13].

Выращивание плазмидосодержащих клеток E. coli для анализа продуктов экспрессии клонированных генов. В пробирки или колбы со средой YТ×2, содержащей 50 мкг/мл ампициллина, засеивали ночную культуру клеток *E. coli* с плаزمидами рUR290 или рUR290-Анг. Клетки растили 1,5–2 ч при 37° С при интенсивном встряхивании до плотности 0,25–0,3 ОЕ/мл (600 нм).

Электрофоретический анализ суммарных клеточных белков плазмидосодержащих штаммов E. coli. Клетки *E. coli* суспендировали в буфере, содержащем 3% додецилсульфат натрия, 1% 2-меркаптоэтанол, 50 мМ трис-НСl (рН 6,8), 5% глицерин и 0,01% бромфеноловый синий, выдерживали 5 мин при 100° С, 3–10 мкл образца наносили на 7,5 или 15% ПААГ с додецилсульфатом натрия. Электрофорез проводили как описано Леммли [14]. Аналогично анализировали полипептиды, полученные в экспериментах по химическому расщеплению слитого белка и β -галактозидазы.

Выделение телец включения. Клетки *E. coli*, выращенные в 250 мл среды, осаждали, ресуспендировали при 0° С в 20 мл буфера А, содержащего 0,2 М трис-НСl (рН 7,5), 0,2 М NaCl, 0,01 М ацетат натрия, 0,01 М β -меркаптоэтанол и 5% глицерин, после чего разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе (8–10 импульсов по 10–15 с, 22 кГц). Лизат центрифугировали 30 мин при 5–10 тыс. об/мин на центрифуге К23 (ГДР) при 4° С. Супернатант сливали, осадок ресуспендировали в буфере А, содержащем 1% тритон X-100, центрифугирование повторяли. Осадок растворяли в 10 мл 6 М хлористого гуанидиния, содержащего 1% 2-меркаптоэтанола. Вновь центрифугировали 1 ч при 20 тыс. об/мин (10° С) на центрифуге J2-21 (Beckman, США), ротор J20А. Супернатант диализовали 4–6 раз в течение 12–18 ч против деионизованной воды. После диализа белки, выпавшие в осадок, собирали центрифугированием, промывали водой и лиофильно сушили.

Ограниченный кислотный гидролиз белков проводили согласно [10]. Хлористый гуанидиний, муравьиную или уксусную кислоту после гидролиза удаляли диализом.

Оценка ангиогенной активности препаратов. Биологическую активность препаратов оценивали на хориоаллантоисной мембране куриных эмбрионов, как описано в работе [15]. На обнаженную мембрану эмбрионов 9-го дня развития апплицировали диск хроматографической бумаги с предварительно нанесенной суспензией исследуемого белка в 70% этаноле (перед нанесением диска на мембрану этанол тщательно высушивали). Через 72–96 ч инкубации по образованию новых сосудов, ориентированных в сторону индуктора, визуально оценивали реакцию неовас-

куляризации. При этом нужный участок хориоаллантоисной мембраны изолировали и просматривали под бинокулярной лупой.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Fett J. W., Strydom D. J., Lobb R. R., Alderman E. M., Bethune J. L., Riordan J. F., Vallee B. L.* // *Biochemistry*. 1985. V. 24. № 20. P. 5480-5486.
2. *Shapiro R., Strydom D. J., Olson K. A., Vallee B. L.* // *Biochemistry*. 1987. V. 26. № 16. P. 5141-5146.
3. *Weiner H. L., Weiner L. H., Swain J. L.* // *Science*. 1987. V. 237. № 4812. P. 280-282.
4. *Rybak S. M., Fett J. W., Yao Q.-Z., Vallee B. L.* // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1987. V. 146. № 3. P. 1240-1248.
5. *Folkman J., Klagsbrun M.* // *Science*. 1987. V. 235. № 4787. P. 442-447.
6. *Shapiro R., Riordan J. F., Vallee B. L.* // *Biochemistry*. 1986. V. 25. № 12. P. 3527-3532.
7. *Коваленко С. П., Горн В. В., Каргинов В. А., Морозов И. В., Зарытова В. Ф., Мертвецов Н. П.* // *Биоорг. химия*. 1988. Т. 14. № 7. С. 910-915.
8. *Marston F. A. O.* // *Biochem. J.* 1986. V. 240. № 1. P. 1-12.
9. *Rüther U., Müller-Hill B.* // *EMBO J.* 1983. V. 2. № 10. P. 1791-1794.
10. *Landon M.* // *Meth. Enzymol.* 1977. V. 47. P. 145-149.
11. *Deneffe P., Kovarik S., Guillon J.-D., Cartwright T., Mayaux J.-F.* // *Gene*. 1987. V. 56. № 1. P. 61-70.
12. *Beintema J. J., Van der Laan J. M.* // *FEBS Lett.* 1986. V. 194. № 2. P. 338-342.
13. *Маниагис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. С. 10-386.
14. *Laemmly U. K.* // *Nature*. 1970. V. 227. № 5259. P. 680-685.
15. *Klagsbrun M., Knighton D., Folkman J.* // *Cancer Res.* 1976. V. 36. № 1. P. 110-114.

Поступила в редакцию
17.VI.1988

EXPRESSION OF A SYNTHETIC GENE CODING FOR HUMAN ANGIOGENIN IN *E. COLI*. CHEMICAL CLEAVAGE OF THE FUSION PROTEIN β -GALACTOSIDASE-ANGIOGENIN

KOVALENKO S. P.*, LISNIAK I. A.***, MERTVETSOV N. P.

*Novosibirsk Institute of Bioorganic Chemistry,
Siberian Division of the Academy of Sciences of the USSR;*

** Institute of Therapy, Siberian Division of the Academy
of Medical Sciences of the USSR, Novosibirsk;*

*** Institute of Oncology Problems, Academy of Sciences
of the Ukrainian SSR, Kiev*

A synthetic gene coding for human angiogenin was cloned in pUR290 plasmid in frame with β -galactosidase, both parts of the resultant fused protein being joined through an Asp-Pro sequence. The fused protein, synthesised in *E. coli* cells upon IPTG induction and isolated as inclusion bodies, possessed angiogenic activity on the chick chorioallantois membrane and was cleaved upon acid treatment to yield free angiogenin.