БИООРГАНИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, 1995, том 21, № 11, с. 845 - 854

УДК 547.963.32+577.21

КОНСТРУИРОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ШТАММОВ *Escherichia coli*, ДЕТЕРМИНИРУЮЩИХ СЕКРЕТОРНУЮ ЭКСПРЕССИЮ ИСКУССТВЕННЫХ ГЕНОВ ГРАНУЛОЦИТАРНО-МАКРОФАГАЛЬНОГО КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА ЧЕЛОВЕКА

© 1995 г. Л. Е. Петровская, А. В. Рузин, Л. Н. Шингарова, В. Г. Коробко*

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

Поступила в редакцию 27.02.95 г.

Сконструирован ряд рекомбинантных плазмид для экспрессии искусственных генов гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека (GM-CSF). Получен гибридный ген, в котором последовательность, кодирующая лидерный пептид и тандем IgG-связывающих доменов белка А *Staphylococcus aureus*, соединена посредством энтерокиназного линкера с синтетическим геном *gmcsf*. Такая конструкция обеспечивает в клетках *Escherichia coli* биосинтез и последующий транспорт гибридного белка в периплазму бактерий. С помощью полимеразной цепной реакции получен другой гибридный ген, объединяющий кодирующую последовательность сигнального пептида OmpA *E. coli* и ген *gmcsf*. Установлено, что в этом случае белок-предшественник подвергается правильному процессингу, причем локализация продукта зависит от силы используемого промотора.

Ключевые слова: гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF); ген, экспрессия в E. coli; секреция; полимеразная цепная реакция.

В семействе факторов регуляции гемопоэза человека одно из ключевых положений занимает гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), представляющий собой кислый гликопротеин с молекулярной массой 23 - 29 кДа [1]. Он обладает плейотропным действием в отношении стволовых клеток миелоидного ряда [2]. В частности, он стимулирует рост и пролиферацию предшественников гранулоцитов и моноцитов, а также оказывает влияние на функции зрелых эффекторных клеток этого ряда [3]. Благодаря свойству GM-CSF стимулировать гемопоэз in vivo и активировать нейтрофилы и моноциты открываются широкие перспективы его использования в терапии ряда заболеваний иммунной и кроветворной системы (анемических и миелодиспластических синдромов, нейтропении, СПИДа и др.), а также последствий лучевой и химиотерапии опухолевых заболеваний [4], что делает чрезвычайно актуальной задачу получения этого белка в значительных количествах для медицинских целей.

Источником GM-CSF в организме человека являются Т-лимфоциты, синтезирующие белок-предшественник (144 а. о.), зрелая форма которого получается путем отщепления сигнального пептида (17 а. о.). Выделение белка из природных источников затруднено из-за чрезвычайно низкого его содержания. Эта проблема может быть решена путем создания бактериальных штаммов-продуцентов. Отсутствие системы гликозилирования белков в бактериальных клетках не является препятствием, поскольку известно, что удаление углеводного компонента не приводит к уменьшению активности GM-CSF [5].

В литературе описано получение GM-CSF человека с помощью технологии рекомбинантных ДНК путем экспрессии соответствующего гена в трансформированных клетках млекопитающих [6, 7] или в дрожжевых клетках [8, 9]. Следует отметить, что белок, синтезируемый клетками млекопитающих, имеет правильную пространственную структуру, однако уровень его биосинтеза недостаточно высок для биотехнологического использования. Дрожжевые клетки обеспечивают достаточно высокий уровень экспрессии гена, однако в этом случае препятствием для использования препарата является специфическое посттрансляционное гликозилирование.

В настоящей работе мы исследовали разные подходы к достижению экспрессии гена *gmcsf*

Сокращения: GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор; IPTG – изопропилтио-β,*D*-галактопиранозид; IgG – иммуноглобулин класса G; PCR – полимеразная цепная реакция; PMSF – фенилметилсульфонилфторид. Префикс "d" (дезокси) в формулах олигонуклеотидов для краткости опущен.

* Автор для переписки.

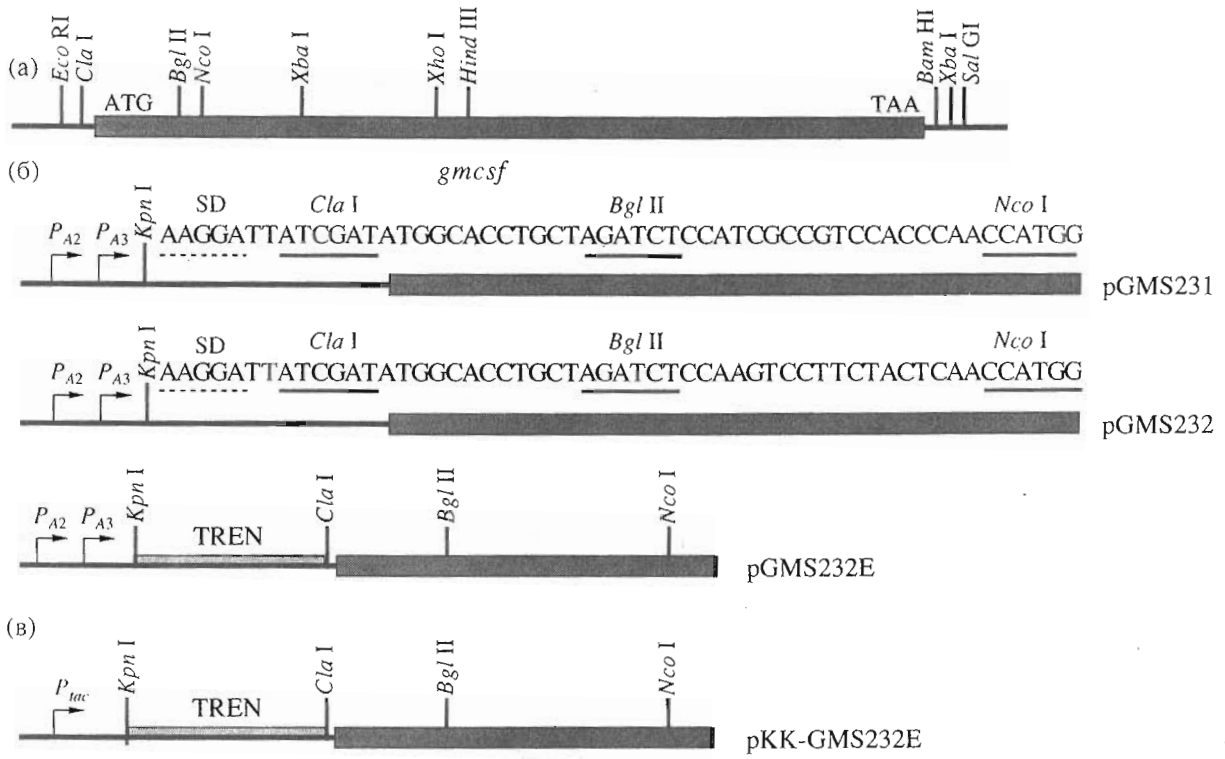

Рис. 1. Схемы синтетического гена, кодирующего GM-CSF (*gmcsf*, а), и фрагментов экспрессионных плазмид pGMS231, pGMS232, pGMS232E и pKK-GMS232E, в которых экспрессия гена *gmcsf* находится под контролем тандема промоторов P_{A2} и P_{A3} фага T7 (б) или индуцибельного промотора P_{tac} (в). Указаны нуклеотидная последовательность начала гена и регуляторные элементы: TREN – "трансляционный энхансер", SD – последовательность Шайна–Далгарно (подчеркнута штриховой линией). Сайты узнавания рестрикционных эндонуклеаз подчеркнуты.

человека в клетках *Escherichia coli*. На первом этапе для конструирования плазмид, обеспечивающих прямую экспрессию гена в клетках *E. coli*, мы использовали его синтетический вариант (рис. 1а), полученный ранее в Институте микробиологии и экспериментальной терапии (Йена, ГДР) и клонированный в векторе pUC118 по сайтам рестриктаз *Eco*RI и *Bam*HI. В качестве вектора для экспрессии синтетического гена *gmcsf* была использована плазмида pTNF331, содержащая тандем сильных промоторов P_{A2} и P_{A3} ранней области бактериофага T7 и синтетический участок инициации трансляции и обеспечивавшая ранее высокий уровень биосинтеза фактора некроза опухолей человека в клетках кишечной палочки [10]. Соединение синтетического гена с регуляторной областью плазмиды pTNF331 было осуществлено при помощи синтетического дуплекса, содержащего участок Шайна–Далгарно; в результате получили плазмиду pGMS231 (рис. 1б). Однако после трансформации полученной плазмидой различных штаммов *E. coli* не удалось выявить электрофорезом в SDS-ПААГ белкового продукта близкой к GM-CSF молекулярной массы (около 14.5 кДа). Следует отметить, что начальная часть синтетического гена белка GM-CSF содержала большое число остатков G и C, что могло привести к образованию петлевых структур в мРНК, затрудняющих ее трансляцию [11]. Поэтому мы провели замену участка синтетического гена между сайтами *Bgl*II и *Nco*I на более A/T-богатую последовательность. Однако полученная в результате этого плазмида pGMS232 (рис. 1б) после трансформации различных штаммов *E. coli* не обеспечивала заметного уровня биосинтеза целевого белка.

Поскольку транскрипция гена GM-CSF контролировалась тандемом сильных промоторов P_{A2} и P_{A3} ранней области фага T7, резонно было предположить, что причиной отсутствия экспрессии является неоптимальная структура участка инициации трансляции. В последнее время для повышения эффективности трансляции используют так называемый "трансляционный энхансер", включающий эффективный участок инициации трансляции гена *10* бактериофага T7. Так, например, в работе [12] было описано 100-кратное увеличение уровня биосинтеза интерлейкина-3 человека клетками *E. coli* под контролем "трансляционного энхансера".

Мы осуществили клонирование этого регуляторного элемента в плазмиду pGMS232 по сайтам *Kpn*I и *Cla*I, в результате чего была получена плазмида pGMS232E (рис. 1б). Параллельно мы

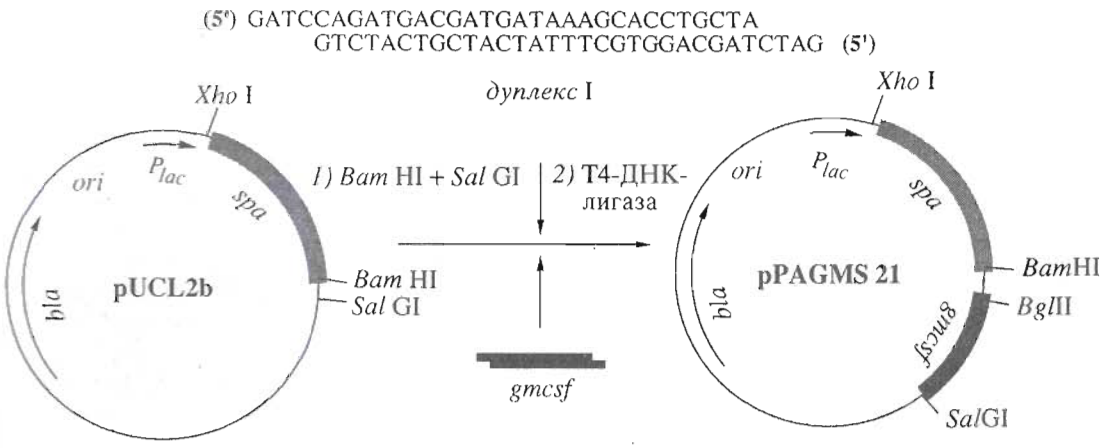

Рис. 2. Схема конструирования плазмиды pPAGMS21, содержащей гибридный ген *spa-gmcsf*.

проклонировали *Kpn*I/*Sal*GI-кассету, содержащую ген *gmcsf* и "трансляционный энхансер", в плазмиду pKK223-3* под контроль регулируемого *tac*-промотора [13], в результате чего была получена плазмида pKK-GMS232E (рис. 1в). Однако ни одна из полученных конструкций не обеспечивала заметного повышения уровня экспрессии гена *gmcsf*, что дало основание предположить, что при невысоком уровне биосинтеза происходит быстрая посттрансляционная деградация рекомбинантного белка внутриклеточными протеиназами [14].

Недавно появились публикации по прямой экспрессии генов *gmcsf* человека в бактериях. В одной из работ ген *gmcsf* экспрессировали в клетках *Pseudomonas putida* [15], причем полученный авторами рекомбинантный белок был охарактеризован лишь по электрофоретической подвижности в денатурирующем геле, которая соответствует молекулярной массе менее 13 кДа. Это противоречит литературным данным [7] и свидетельствует либо о неустойчивости белка в клетках бактерий, либо об ошибках при генетическом конструировании. В другой работе [16] синтетический ген *gmcsf* был экспрессирован с использованием искусственной полицистронной системы трансляции. При этом был достигнут высокий уровень биосинтеза GM-CSF клетками бактерий, однако белок образовывал в клетке нерастворимые частицы, что в значительной степени затрудняло его ренатурацию в активную форму.

Одной из возможностей преодоления перечисленных трудностей является создание такой системы экспрессии, в которой используются механизмы транспорта белков в периплазматическое пространство *E. coli*, где уровень протеолитической активности существенно ниже, чем в цитоплазме клеток. Такой подход обладает рядом преимуществ [17], поскольку позволяет избежать накопления внутри клеток токсичного для бактерий продукта и образования нерастворимых телец включения. Кроме того, в периплазматическом пространстве правильное формирование дисульфидных связей в рекомбинантном белке, приводящее к образованию биологически активного продукта, проходит с бóльшим выходом. Наконец, получаемые в результате транспорта в периплазму рекомбинантные белки лишены N-концевого остатка метионина.

Другим эффективным способом повышения стабильности рекомбинантных продуктов является их биосинтез в составе гибридных белков [18]. Объединить оба этих подхода позволяет широко используемая система экспрессии на основе структурных элементов гена белка А (*spa*) из *Staphylococcus aureus* [19], обеспечивающая как выход гибридного белка в периплазму, так и относительно простой способ его выделения за счет способности белка А (SPA) связываться с константными участками IgG [20].

С этой целью мы использовали в качестве вектора сконструированную ранее в лаборатории биоинженерии генов ИБХ РАН плазмиду pUCL2b [21], содержащую синтетическую последовательность ДНК, которая кодирует лидерный пептид и два IgG-связывающих домена белка А, причем экспрессия этого гена регулируется *lac*-промотором и участком инициации трансляции гена *lacZ* (рис. 2). Чтобы получить гибридную конструкцию *spa-gmcsf*, плазмидную ДНК pUCL2b расщепляли рестриктазами *Sal*GI и *Bam*HI и затем лигировали с *Bgl*II/*Sal*GI-фрагментом ДНК плазмиды pGMS232, содержащим бóльшую часть синтетического гена GM-CSF, в присутствии 10-кратного избытка синтетического дуплекса I

D P D D D D K A P A
5' GATCCAGATGACGATGATAAAGCACCTGCTA
GTCTACTGCTACTATTTCGTGGACGATCTAG 5'

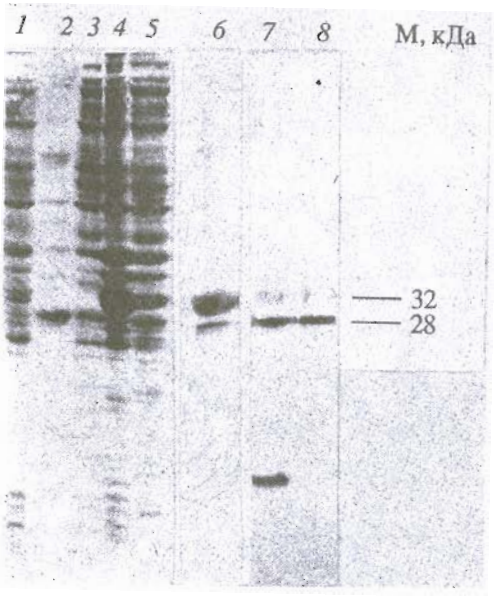

Рис. 3. Анализ белков, синтезируемых клетками *E. coli* HB101, содержащими плазмиду с гибридным геном *spa-gmcsf* при помощи электрофореза в 13% SDS-ПААГ (*1* - *5*) и иммуноблотинга с пероксидазным конъюгатом IgG кролика (*6* - *8*). *1* – лизат клеток *E. coli* HB101 без плазмиды; *2* – периплазматическая фракция клеток *E. coli* HB101 с плазмидой pPAGMS21 после выращивания в присутствии IPTG при 30°C; *3* – фракция растворимых белков клеток *E. coli* HB101/pPAGMS21 (условия как в *2*); *4* – фракция нерастворимых белков клеток *E. coli* HB101/pPAGMS21 (выращивание и индукция IPTG при 37°C); *5* – суммарный белок клеток *E. coli* HB101/pPAGMS21 (условия как в *4*); *6* – иммуноблотинг суммарных клеточных белков *E. coli* HB101 с плазмидой pPAGMS21 (выращивание и индукция как в *4*); *7* и *8* – то же, что *6*, но выращивание и индукция при 30°C. Указано положение белков-маркеров молекулярной массы.

Этот дуплекс обеспечивал соединение фрагмента гена белка А с геном зрелого GM-CSF посредством линкера, кодирующего участок расщепления энтеропептидазой (Asp_4Lys) для последующего процессирования гибридного белка, а также кислотолабильную дипептидную "связку" Asp-Pro.

Скрининг рекомбинантных клонов после трансформации лигазной смесью клеток *E. coli* XL-1 проводили с помощью гибридизации с одним из синтетических олигонуклеотидов дуплекса I. В результате была получена плазмида pPAGMS21, содержащая гибридный ген *spa-gmcsf* (рис. 2).

На начальном этапе мы исследовали экспрессию полученного гибридного гена *spa-gmcsf* в штамме *E. coli* XL-1, который обеспечивал достаточно высокий уровень синтеза гибридного белка (до 10 мкг/мл) за 3 ч роста культуры после индукции с помощью IPTG. Однако оказалось, что при этом не наблюдается полной репрессии *lac*-промотора плазмиды pPAGMS21 (так называемое "протекание" транскрипции), следствием чего, по всей видимости, является довольно часто наблюдаемый нами лизис клеток бактерий в процессе роста. Поэтому мы испробовали в качестве хозяина ряд других штаммов *E. coli*. Выяснилось, что наилучшие результаты дает экспрессия гибридного гена *spa-gmcsf* в клетках штамма HB101. Следует отметить, что в клетках этого штамма, не являющегося суперпродуцентом *lac*-репрессора, имеет место конститутивный синтез гибридного белка, однако клетки сохраняют жизнеспособность, что объясняется, по-видимому, большей устойчивостью их мембраны.

Электрофоретическое исследование различных клеточных фракций по методу [22] показало, что при культивировании клеток при 37°C бóльшая часть гибридного белка с молекулярной массой около 32 кДа, что соответствует непроцессированному варианту, локализована внутри клеток в форме нерастворимых тел включения (рис. 3, дорожки *4*, *5*), тогда как в периплазматическом пространстве обнаруживается белок с молекулярной массой около 28 кДа, образующийся после отщепления лидерной последовательности в процессе транслокации через цитоплазматическую мембрану. Продукты экспрессии гибридного гена *spa-gmcsf* характеризовали при помощи иммуноблотинга с использованием конъюгата полного IgG кролика с пероксидазой хрена. Как и ожидалось, оба белка обладают способностью взаимодействовать с IgG, что подтверждает присутствие в них IgG-связывающих участков белка А (рис. 3, дорожка *6*). При выращивании этой же культуры клеток *E. coli* HB101, трансформированных плазмидой pPAGMS21, в течение 20 ч при 30°C бóльшая часть гибридного белка обнаруживается в периплазме (рис. 3, дорожки *2*, *8*), при этом иногда с помощью блот-гибридизации выявляется дополнительная полоса с молекулярной массой около 18 кДа (рис. 3, дорожка *7*). Весьма вероятно, что эта полоса представляет собой продукт частичного гидролиза гибридного белка бактериальными протеиназами.

Мы предприняли попытку очистить гибридный белок с целью его дальнейшей модификации in vitro. Для этого использовали стандартную процедуру аффинной хроматографии на сефарозе CL-4B с иммобилизованными IgG кролика [23]. В качестве исходного материала брали только периплазматическую фракцию клеток *E. coli* HB101, трансформированных плазмидной ДНК pPAGMS 21. Очистку проводили так, как описано в "Экспериментальной части". В результате из 200 мл клеточной культуры было получено 180 мкг белка. Анализ полученного таким образом препарата иммуноблотом с пероксидазным конъюгатом IgG кролика показал наличие дополнительной полосы (рис. 4), причем, судя по размеру образующегося фрагмента и его способности связываться с IgG, можно предположить, что в процессе кислотной

элюции рекомбинантный белок частично расщепляется по кислотолабильной группировке Asp-Pro, разделяющей иммуноглобулинсвязывающие домены и энтеропептидазный линкер в гибридном белке.

Учитывая сложности выделения и очистки гибридного белка SPA-GM-CSF, мы приступили к конструированию гибридных генов, кодирующих сигнальные последовательности секретируемых бактериальных белков и GM-CSF. Такой подход в случае успеха дает возможность получать зрелый белок, не нуждающийся в процессинге, причем его выделение значительно упрощается за счет локализации в бактериальной периплазме. С этой целью мы решили использовать сигнальный пептид основного мембранного белка *E. coli* – OmpA. Во-первых, OmpA – один из наиболее эффективно секретируемых клетками бактерий (до 10^6 молекул белка на клетку) [24, 25]. Во-вторых, совпадение в OmpA и GM-CSF первых двух аминокислотных остатков после места расщепления предшественников сигнальной пептидазой [7, 24] позволяло надеяться на правильный процессинг GM-CSF.

Для соединения гена *gmcsf* с регуляторной областью и последовательностью, кодирующей лидерный пептид OmpA, мы использовали подход, основанный на применении полимеразной цепной реакции (PCR) и временных сайтов узнавания рестриктаз [26].

Для этого сначала амплифицировали фрагмент генома *E. coli*, содержащий часть гена *ompA* между нуклеотидами –20 и +66 (за точку отсчета принят старт трансляции мРНК гена *ompA*), с использованием в качестве праймеров олигонуклеотидов TCTCGTTGGA**GAATTC**ATGGC (II) и TATATT**CTGCA**<u>GGC</u>CTGCGCTACGGTAGCG (III)*. В результате получили фланкированный сайтами рестриктаз *Eco*RI и *Pst*I фрагмент ДНК величиной около 90 п.о., содержащий участок инициации трансляции и первые 22 кодона предшественника белка OmpA.

Наряду с этим при помощи полимеразной цепной реакции с олигонуклеотидными праймерами A**CCTGCA**<u>GCT</u>CCGGCCCGCTCGCCCAGCCCC-AGC (IV) и AATTGGAG**CTCGAG**TACCCACCAA (V)** был получен фланкированный сайтами эндонуклеаз *Pst*I и *Xho*I фрагмент ДНК величиной около 400 п.о., кодирующий последовательность зрелого белка GM-CSF. В качестве матрицы для PCR использовали клонированный в плазмиде pGM5α (рис. 5) безынтронный ген *gmcsf*, полученный in vitro методом точного сочленения фрагментов ДНК с помощью элонгации перекрывающихся участков (SOE – gene splicing by overlap extention) [27] в группе экспрессии белковых факторов роста и дифференцировки ИБХ РАН.

Рис. 4. Иммуноблот с пероксидазным конъюгатом IgG кролика продуктов очистки фракции периплазматических белков клеток *E. coli* HB101 с плазмидой pPAGMS21 при помощи хроматографии на IgG-сефарозе. *1* – исходная периплазматическая фракция штамма HB101/pPAGMS21; *2* – препарат после элюции глициновым буфером, pH 3.0.

Полученные в результате PCR фрагменты ДНК обработали соответствующими рестриктазами и после очистки электрофорезом в легкоплавкой агарозе клонировали в фагмиду pGEM-7Zf(+), расщепленную рестриктазами *Eco*RI и *Xho*I (рис. 5). В результате получили плазмиду pGAGMN1, содержащую последовательность, кодирующую сигнальный пептид белка OmpA, и ген *gmcsf*, разделенные тетрануклеотидной последовательностью TGCA сайта рестриктазы *Pst*I. Для соединения обеих рамок считывания плазмиду pGAGMN1 расщепили эндонуклеазой *Pst*I и образовавшиеся выступающие 3'-концы удалили обработкой фрагментом Кленова ДНК полимеразы I *E. coli* в присутствии дезоксинуклеозидтрифосфатов. Полученную линейную форму ДНК лигировали по "тупым" концам и после трансформации клеток *E. coli* XL-1 получили плазмиду pGAGMN3, скрининг которой проводили по отсутствию сайта эндонуклеазы *Pst*I.

В плазмиде pGAGMN3 транскрипция гибридного гена контролируется промоторно-операторной системой *lac*-оперона *E. coli*. Чтобы исследовать влияние силы промотора на экспрессию гибридного гена, мы поместили его под контроль более сильных промоторов в плазмиды pKK223-3* и pTrc99A, содержащие промоторы транскрипции P_{lac} и P_{trc} соответственно. Таким образом, были получены плазмиды pGAGMN3, pKAGMN7 и pTAGMN1 (рис. 5), в которых транскрипция

* В праймере (III) подчеркнут триплет, комплементарный кодону Ala^{22} пребелка OmpA; жирным шрифтом выделены сайты рестриктаз *Eco*RI и *Pst*I.

** Жирным шрифтом выделены сайты рестриктаз *Eco*RI и *Xho*I, в праймере (IV) подчеркнут триплет, кодирующий Ala^{1} зрелого белка GM-CSF.

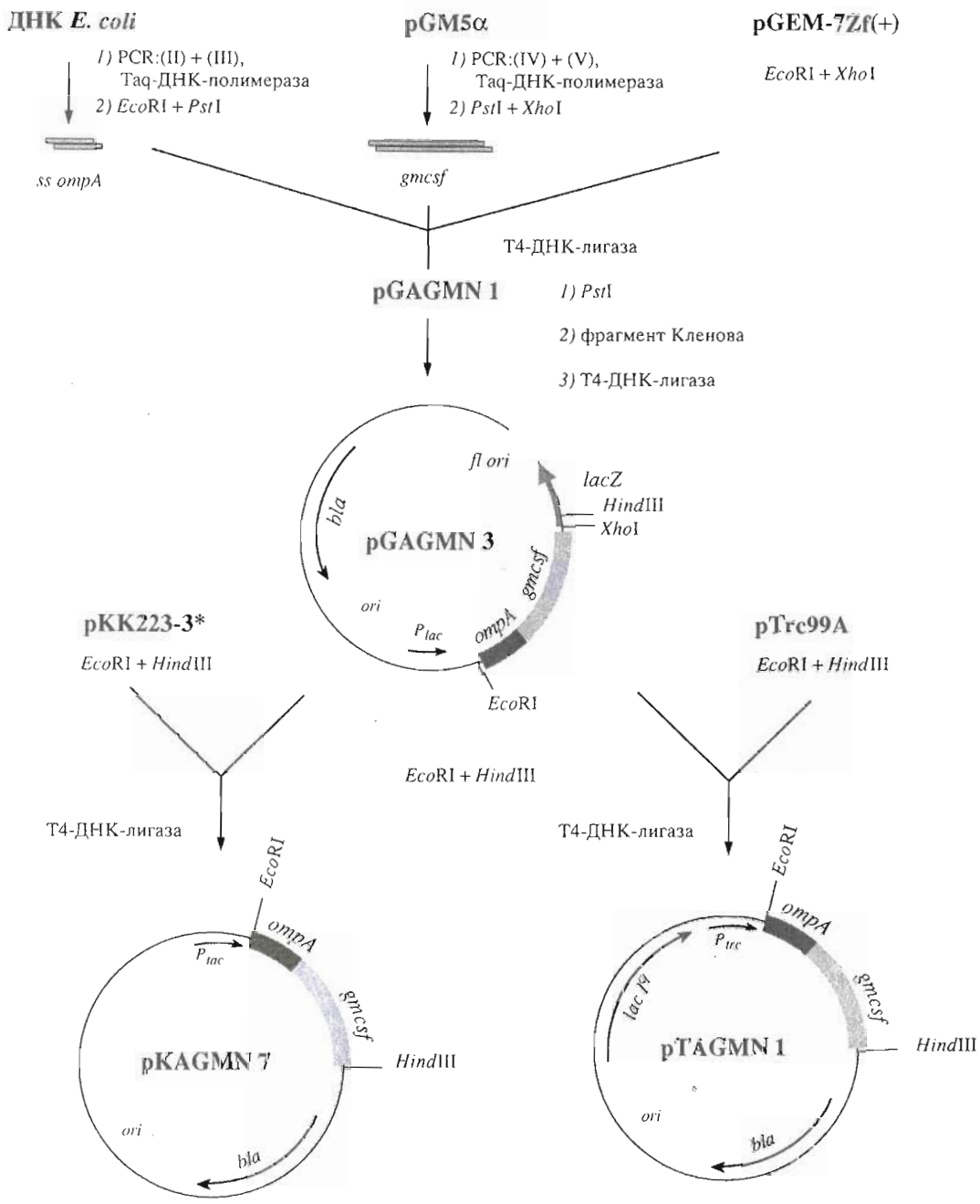

Рис. 5. Схема конструирования плазмид pGAGMN3, pKAGMN7 и pTAGMN1, содержащих гибридный ген *ompA-gmcsf*, под контролем индуцибельных промоторов P_{lac}, P_{tac} и P_{trc} соответственно.

гибридного гена *ompA-gmcsf* регулируется соответственно промоторами P_{lac}, P_{tac} и P_{trc} при наличии одинакового сайта связывания рибосомы.

Экспрессию гибридного гена изучали в различных штаммах *E. coli*, причем для репрессии *lac*- и *tac*-промоторов плазмид pGAGMN3 и pKAGMN7 использовали штаммы – суперпродуценты *lac*-репрессора, в то время как плазмида pTAGMN1 содержит клонированный ген $lacI^q$, что позволяет проводить индукцию в любом штамме. Необходимо отметить, что полная репрессия *lac*- и *tac*-промоторов достигалась только при выращивании культуры в присутствии 0.2% глюкозы.

Установлено, что максимальный уровень экспрессии гибридного гена под контролем каждого из указанных промоторов достигается в различных штаммах *E. coli*. Так, для плазмиды pGAGMN3 оптимальным было использование штамма XL-1,

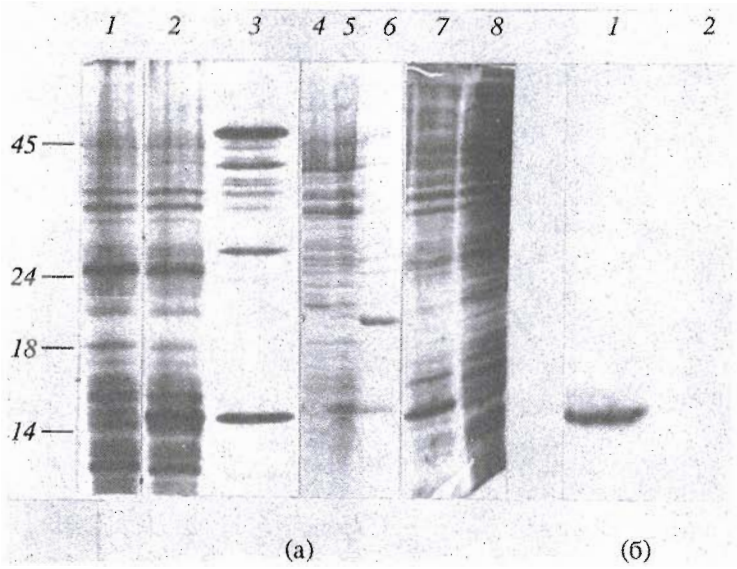

Рис. 6. Анализ локализации продуктов экспрессии гибридного гена *ompA-gmcsf* в клетках различных штаммов *E. coli* при помощи электрофореза в 13% SDS-ПААГ (а) и иммуноблотинга (б). (а) – *1, 4, 8* – электрофорез суммарного клеточного белка неиндуцированных культур штаммов XL-1 (pGAGMN3), TG-1 (pKAGMN7) и HB101(pTAGMN1) соответственно; *2, 5, 7* – электрофорез суммарного клеточного белка культур штаммов XL-1 (pGAGMN3), TG-1 (pKAGMN7) и HB101(pTAGMN1) после индукции IPTG; *3, 6* – электрофорез белков периплазматической фракции индуцированных культур клеток штаммов XL-1 (pGAGMN3) и TG-1(pKAGMN7). (б) – иммуноблот с поликлональными антителами против GM-CSF человека белков периплазматической фракции штамма XL-1 (pGAGMN3), выделенных из клеток, выращенных в присутствии (*1*) или в отсутствие (*2*) IPTG. Указано положение белков-маркеров молекулярной массы.

для pKAGMN7 – TG-1, тогда как для pTAGMN1 – HB101 (рис. 6а). Было установлено, что в периплазматической фракции клеток, содержащих плазмиды pGAGMN3 и PKAGMN7, а также во всех образцах тотального клеточного белка индуцированных культур обнаруживается полоса с молекулярной массой около 14.5 кДа, соответствующая зрелому белку GM-CSF (рис. 6а, *2, 3, 5, 6, 7*). Определение семи N-концевых аминокислотных остатков этого белка показало полное совпадение с последовательностью GM-CSF человека, что свидетельствует о правильном отщеплении сигнального пептида OmpA при транслокации через внутреннюю мембрану клеток бактерий. Исследование образца периплазматической фракции клеток штамма *E. coli* XL-1, трансформированных плазмидой pGAGMN3, методом иммуноблотинга с поликлональными кроличьими антителами против GM-CSF обнаружило наличие специфически окрашиваемой полосы (рис. 6б).

Как ожидалось, уровень экспрессии гена GM-CSF последовательно повышался с увеличением силы промотора. Неожиданно обнаружилось, что при использовании наиболее сильного *trc*-промотора образующийся в результате процессинга зрелый белок не транспортируется в периплазму, а накапливается в нерастворимой фракции клеток, откуда может быть выделен только при помощи обработки детергентами и мочевиной.

Таким образом, повышение уровня экспрессии, достигаемое при увеличении силы промоторов в ряду P_{lac}–P_{tac}–P_{trc}, приводит к нарушению нормального процесса транспорта зрелого белка в периплазматическое пространство, хотя и не влияет на эффективность процессинга предшественника. Полученный результат может быть объяснен на основе последних данных о механизме транслокации через плазматическую мембрану бактерий и участии в этом процессе группы мембранных белков (Sec-белков). Известно, что отщепление сигнальной последовательности происходит на начальных этапах транслокации предшественника, вскоре после его проникновения в мембрану [28]. Блокирование функции компонентов Sec-системы приводит к тому, что процессированный белок остается связанным с мембраной или диффундирует в цитоплазму. Это явление было обнаружено в системе транспорта OmpA in vitro при добавлении негидролизуемого аналога ATP, который блокирует действие SecA-белка [29]. Такой же эффект наблюдали при блокировании азидом натрия SecA-зависимой транслокации мутантной сигнальной пептидазы [30], а также при попытках создания систем секреции некоторых рекомбинантных белков [31]. В процессе переноса GM-CSF через внутреннюю мембрану *E. coli* лимитирующей стадией, по-видимому, является освобождение процессированного белка в периплазматическое пространство. Наличие положительного заряда остатка Arg в N-концевой

части молекулы может привести к тому, что эта последняя стадия, предположительно осуществляемая белками SecD и SecF, потребует гораздо большего времени и энергетических затрат [32]. При повышении уровня синтеза GM-CSF в описанной системе может происходить "насыщение" указанных компонентов системы транслокации и накопление связанного с мембраной продукта, которое не наблюдается в случае использования менее сильных промоторов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали: акриламид, трис, бисакриламид, TEMED (Merck, Германия); агарозу, EDTA, дитиотреит, бромистый этидий, глицерин, краситель бриллиантовый синий (Sigma, США); триптон, дрожжевой экстракт (Difco, Англия); додецилсульфат натрия, глицин, персульфат аммония (Serva, Германия); легкоплавкую агарозу (FMC, США); дезоксинуклеозид-5'-фосфаты (Pharmacia-PL, Швеция); эндонуклеазы рестрикции *Bgl*II, *Sal*GI, *Bam*HI, *Xho*I, *Msp*I, *Eco*RI, *Pst*I, *Bsp*RI, *Hin*dIII и ДНК-полимеразу I *E. coli* (фрагмент Кленова) производства НПО "Фермент" (Вильнюс, Литва). ДНК-лигаза и полинуклеотидкиназа фага T4 выделены в лаборатории химии генов. Конъюгат пероксидазы хрена с иммуноглобулинами кролика был предоставлен В.М. Абрамовым (РосНИИ иммунологии, пос. Любучаны Московской обл.), кроличья сыворотка против GM-CSF человека была получена от В.Е. Жемчугова (РосНИИ иммунологии, пос. Любучаны Московской обл.).

Бактериальные штаммы: *E. coli* XL-1 Blue (*rec*A1, *end*A1, *gyr*A96, *thi*1, *hsd*R17, *sup*E44, *rel*A1, Δ(*lac-pro*AB), F' *pro*AB, *lac*I^{q}ZΔM15, Tn10 (*tet*^{r}) фирмы Stratagene; HB101 (F$^-$, *hsdS*20 (r_{B^-}, m_{B^-}), *rec*A13, *ara*14, *pro*A2, *lac*Y1, *gal*K2, *rps*L20 (Sm^r), *xyl*-5, *mtl*-1, *sup*E44, λ$^-$) [33], TG-1 (*sup*E, *thi*, *hsd*D5, F'Δ(*lac-pro*AB)*tra*D36, *pro*AB, lacI^{q}ZΔM15) фирмы Amersham.

ДНК плазмид pKK223-3 и pTrc99A фирмы Pharmacia, pGEM-7Zf(+) фирмы Promega. Плазмида pKK223-3* получена в лаборатории химии генов ИБХ РАН в результате модификации плазмиды pKK223-3. Подготовку сред, выращивание бактерий, приготовление компетентных клеток, трансформацию бактерий, выделение плазмидной ДНК, ферментативную обработку и электрофорез ДНК, гибридизацию колоний на нитроцеллюлозных фильтрах проводили согласно стандартным методикам [33]. Хромосомную ДНК *E. coli* выделяли как описано в руководстве [34].

Амплификацию кодирующей последовательности сигнального пептида OmpA и гена *gmcsf* вели с использованием набора для PCR по методике фирмы Perkin–Elmer Cetus (США).

Строение полученных плазмидных конструкций подтверждали рестриктным анализом и определением нуклеотидной последовательности участков ДНК, для чего использовали набор с ДНК-полимеразой фага T7 фирмы USB (США). Подготовку плазмидной матрицы и проведение реакции осуществляли согласно рекомендациям фирмы. В случае использования *Taq*-ДНК-полимеразы секвенирование проводили так, как описано в работе [35]. Для секвенирования плазмиды pPAGMS21 использовали олигонуклеотидные праймеры (5')GTCTCTGAAAGATGCCC (соответствующий последовательности ДНК гена *spa* на расстоянии 75 п. о. от сайта рестриктазы *Bam*HI) и (5')GAAGGTCGAACATTTCCG (комплементарный последовательности синтетического гена *gmcsf* на расстоянии 120 п. о. от сайта рестриктазы *Bgl*II). Последний олигонуклеотид использовали также для определения нуклеотидной последовательности 5'-концевой части гена *gmcsf* в плазмидах pGMS231 и pGMS232. В остальных случаях использовали универсальный и обратный праймеры M13.

Индукцию транскрипции осуществляли как описано в работе [36]. Ночную культуру трансформированных бактерий выращивали на среде LB, содержащей 50 мкг/мл ампициллина и 0.2% глюкозы, разбавляли в 10 раз той же средой и растили до мутности A_{600} 0.8. Затем клетки осаждали при 4000 об/мин, промывали 2 раза средой LB и суспендировали в прежнем объеме среды с добавлением ампициллина и IPTG до конечной концентрации 1 мМ. Культуру выращивали при 37°C в течение 3 - 5 ч.

Периплазматическую фракцию выделяли методом осмотического шока как описано в работе [37]. Для анализа растворимости внутриклеточных белков бактерии осаждали центрифугированием при 4000 об/мин и далее обрабатывали ультразвуком в присутствии PMSF. Супернатант после центрифугирования содержал растворимые белки.

Для электрофоретического анализа белков использовали систему Лэммли [22]. Блот-гибридизацию проводили после переноса белков, разделенных в 13% SDS-ПААГ, на нитроцеллюлозную мембрану с помощью прибора для полусухого переноса (Biotech, Дания) по методу [38].

Аффинную хроматографию на колонке с IgG-сефарозой CL-4B проводили согласно описанию [23]. После нанесения образца носитель промывали Na-фосфатным буфером, пока величина поглощения элюента A_{280} не снижалась до 0.02. Элюцию связавшихся белков осуществляли глициновым буфером (pH 3.0), фракции нейтрализовали трис-HCl, pH 8.0. Концентрацию белка определяли по Bradford [39] с использованием красителя и методики Protein Assay Kit фирмы Bio-Rad.

Авторы выражают благодарность Д. Бенке (Институт микробиологии и экспериментальной медицины, Йена, Германия) за плазмиду с синтетическим геном GM-CSF, Е.И. Фроловой (ИБХ РАН, Москва) за плазмиду pGM5α с безынтронным геном GM-CSF, В.А. Ефимову (ИБХ РАН, Москва) за плазмиду pUCL2b и колонку с IgG-сефарозой, М.С. Щепинову (ИБХ РАН, Москва) за синтез олигонуклеотидов, О.Ю. Чертову (ИБХ РАН, Москва) за определение N-концевой аминокислотной последовательности, В.М. Абрамову (ГосНИИ иммунологии, пос. Любучаны Московской обл.) за конъюгат пероксидазы хрена с IgG кролика, В.Е. Жемчугову (ГосНИИ иммунологии, пос. Любучаны Московской обл.) за поликлональную кроличью сыворотку против GM-CSF человека, В. Сакулину (ГосНИИ иммунологии, пос. Любучаны Московской обл.) за помощь в проведении эксперимента.

Работа финансирована в рамках ГНТП "Новейшие методы биоинженерии", раздел 3в "Генная и клеточная инженерия", заявка № 16.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Gasson J.C.* // Blood. 1991. V. 77. P. 1131 - 1145.
2. *Whetton A.D.* // TIPS. 1990. V. 11. P. 285 - 289.
3. *Scarffe J.H.* // Eur. J. Cancer. 1991. V. 27. P. 1493 - 1504.
4. *Sakamoto K.M., Golde D.W., Gasson J.C.* // J. Pediatrics. 1991. V. 118. P. S17 - S20.
5. *Kaushansky K., O'Hara P.J., Hart C.E., Forstrom J.W., Hagen F.S.* // Biochemistry. 1987. V. 26. P. 4861 - 4867.
6. *Lee F., Yokota T., Otsuka T., Gemmall L., Larson N., Luh J., Arai K., Rennick D.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. P. 4360 - 4364.
7. *Wong G.G., Witek J.S., Temple P.A., Wilkens K.M., Leary A.C., Luxenberg D.P., Jones S.S., Brown E.L., Kay R.M., Orr E.C., Shoemaker C., Golde D.W., Kaufman R.J., Hewick R.M., Wang E.A., Clark S.C.* // Science. 1985. V. 228. P. 810 - 815.
8. *Cantrell M.A., Anderson D., Cerretti D.P., Price V., McKereghan K., Tushinski R.J., Mochizuki D.Y., Larse A., Grabstein K., Gillis S., Cosman D.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. P. 6250 - 6254.
9. *Miyajima A., Otsu K., Schreurs J., Bond M.W., Abrams J.S., Arai K.* // EMBO J. 1986. V. 5. P. 1193 - 1197.
10. *Gase K., Korobko V.G., Wisniewsky H.G., Le J., Dobrynin V.N., Filippov S.A., Gutsche W., Maksimova Y.N., Schlott B., Shingarova L.N., Vilcek J., Behnke D.* // Immunology. 1990. V. 71. P. 368 - 371.
11. *Devlin P.E., Drummond R.J., Toy P., Mark D.F., Watt K.W.K., Devlin J.J.* // Gene. 1988. V. 65. P. 13 - 22.
12. *Гуревич А.И., Скапцова Н.В., Луценко С.В., Смирнов В.А., Куркин А.Н., Ажаев А.В.* // Биоорган. химия. 1991. Т. 17. С. 647 - 652.
13. *Amann E., Brosius J., Ptashne M.* // Gene. 1983. V. 25. P. 167 - 178.
14. *Libby R.T., Braedt G., Kronheim S.R., March C.J., Urdal D.L., Chiaverotti S.R., Tushinski R.J., Mochizuki D.Y., Hopp T.P., Cosman D.* // DNA. 1987. V. 6. P. 221 - 229.
15. *Слободкина Г.В., Котова Е.Ю., Брага Э.А., Чистяков Д.А., Марченко Г.Н., Цыганков Ю.Д., Носиков В.В.* // Молекуляр. биология. 1994. Т. 28. Вып. 4. С. 846 - 854.
16. *Гилева И.П., Бондарь Т.С., Блинова Н.Н., Халдояниди С.К., Кравченко В.В., Ястребов С.И., Офицеров В.И., Коробко В.Г.* // Докл. РАН. 1994. Т. 336. С. 254 - 256.
17. *Дебабов Д.В.* // Молекуляр. биология. 1994. Т. 28. Вып. 3. С. 496 - 505.
18. *Nygren P.-A., Stahl S., Uhlen M.* // Trends Biotech. 1994. V. 12. P. 184 - 188.
19. *Valerie K., Fronko G., Long W., Henderson E.E., Nilsson B., Uhlen M., de Riel J.K.* // Gene. 1987. V. 58. P. 99 - 107.
20. *Nilsson B., Abrahamsen L., Uhlen M.* // EMBO J. 1985. V. 4. P. 1075 - 1080.
21. *Ефимов В.А., Бурякова А.А., Полушин Н.Н., Пашкова И.Н., Дмитракова Е.В., Чахмахчева О.Г.* // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. С. 499 - 506.
22. *Laemmli U.K.* // Nature. 1970. V. 227. P. 680 - 685.
23. *Hjelm H., Hjelm K., Sjoquist J.* // FEBS Lett. 1972. V. 28. P. 7373 - 7376.
24. *Rao Movva N., Nakamura K., Inouye M.* // J. Mol. Biol. 1980. V. 143. P. 317 - 328.
25. *Rao Movva N., Nakamura K., Inouye M.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1980. V. 77. P. 3845 - 3849.
26. *Колосов М.Н., Коробко В.Г., Добрынин В.Н., Северцова И.В., Чувпило С.А., Быстров Н.С., Берлин Ю.А., Каюшин А.Л., Буткус В.В., Полякова И.А., Болдырева Е.Ф., Сандахчиев Л.С., Попов С.Г., Шубина Т.Н., Кравченко В.В., Серпинский О.И., Ямщиков В.Ф., Беликов С.И., Синяков А.Н., Сиволобова Г.Ф.* Способ получения искусственного гена интерферона α2 человека и способ получения полипептида с активностью интерферона микробиологическим синтезом: Патент России № 1092176 // Б. И. 1984. № 18.
27. *Horton R.M., Hunt H.D., Ho S.N., Pullen J.K., Pease L.R.* // Gene. 1989. V. 77. P. 61 - 68.
28. *Pugsley A.P.* // Microbiol. Rev. 1993. V. 57. P. 50 - 108.
29. *Schiebel E., Driessen A.J.M., Hartl F.-U., Wickner W.* // Cell. 1991. V. 64. P. 927 - 939.
30. *Nilsson I.M., Gafvelin G., von Heijne G.* // FEBS Lett. 1993. V. 318. P. 7 - 10.
31. *Curry K.A., Yem A.W., Deibel M.R., Hatzenbuhler N.T., Hoogerheide J.G., Tomich C.-S.C.* // DNA and Cell Biol. 1990. V. 9. P. 167 - 175.
32. *Nilsson I.M., von Heijne G.* // Cell. 1990. V. 62. P. 1135 - 1141.
33. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984.
34. *Мазин А.В., Кузнеделов К.Д., Краев А.С.* Методы молекулярной генетики и генной инженерии. Новосибирск: Наука, 1990.

35. *Innis M.A., Myambo K.B., Gelfand D.H., Brow M.A.D.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. P. 9436 - 9440.

36. *Karlyshev A.V., Galyov E.E., Smirnov O.Yu., Guzaev A.P., Abramov V.M., Zav'yalov V.P.* // FEBS Lett. 1992. V. 297. P. 77 - 80.

37. *Ducancel F., Boulain J.-C., Tremeau O., Menez A.* // Prot. Engineering. 1989. V. 3. P. 139 - 143.

38. *Towbin H., Strahelin T., Gordon J.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. P. 4350 - 4354.

39. *Bradford M.M.* // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 248 - 254.

Construction of Recombinant *E. coli* Strains for Secretory Expression of Artificial Genes for Human Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor

L. E. Petrovskaya, A. V. Ruzin, L. N. Shingarova, and V. G. Korobko*

Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya, 16/10, Moscow, 117871 Russia

Abstract – A number of recombinant plasmids for expression of artificial genes encoding human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) were constructed. A hybrid gene was obtained that contains a sequence encoding the leader peptide and a tandem of two IgG-binding domains of protein A from *Staphylococcus aureus* coupled, through an enteropepdidase linker, to a synthetic *gmcsf* gene. The construction enables *Escherichia coli* to carry out biosynthesis of the hybrid protein and its subsequent transport into the periplasmic space of bacteria. Another hybrid gene, combining sequences for the signal peptide of the *E. coli* outer membrane protein OmpA and GM-CSF, was obtained using polymerase chain reaction. The localization of the mature protein produced by the hybrid gene was found to depend on the strength of the promoter used.

Key words: granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), gene, expression in E. coli, secretion, polymerase chain reaction.

* To whom correspondence should be addressed.