



УДК 547.963.32+577.21

## ВЛИЯНИЕ ТОПОГРАФИИ САЙТА СИГНАЛЬНОЙ ПЕПТИДАЗЫ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ СЕКРЕЦИИ В ПЕРИПЛАЗМУ *Escherichia coli* РЕКОМБИНАНТНОГО ГРАНУЛОЦИТАРНО-МАКРОФАГАЛЬНОГО КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА ЧЕЛОВЕКА

© 1995 г. Л. Е. Петровская, Е. А. Крюкова, С. А. Якимов, А. Н. Вульфсон, Р. А. Алибаева, Л. Н. Шингарова, А. А. Гузаев\*, В. М. Абрамов\*, В. Г. Коробко<sup>#</sup>

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

\* АООТ Институт инженерной иммунологии, 142380, пос. Любучаны, Московская обл.

Поступила в редакцию 22.03.95 г.

Осуществлен синтез искусственного гена, кодирующего сигнальный пептид капсульного антигена F1 (Caf1) *Yersinia pestis*. Сконструирован ряд рекомбинантных плазмид, кодирующих гибридные белки, в которых модифицированная последовательность сигнального пептида Caf1 соединена с аминокислотной последовательностью зрелого гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека (GM-CSF). Показано, что наличие в N-концевой части зрелого GM-CSF остатка аргинина препятствует транспорту через мембрану и правильному процессингу предшественника. Сконструированы штаммы *Escherichia coli*, секретирующие в периплазматическое пространство биологически активные мутантные формы GM-CSF человека.

**Ключевые слова:** гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), гибридный ген, капсульный антиген F1 (Caf1), сигнальная последовательность, экспрессия в *E. coli*, секреция.

Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор человека (GM-CSF), являющийся одним из основных регуляторов гемопоэза, представляет собой гликопротеин с молекулярной массой 23 - 29 кДа [1]. Открывшиеся в последнее время перспективы применения GM-CSF в терапии ряда заболеваний иммунной и кроветворной системы [2] с учетом того, что полностью дегликозилированный белок сохраняет полную биологическую активность, делают чрезвычайно актуальной задачу его получения методами генотехники путем экспрессии соответствующего гена в клетках бактерий, дрожжей или высших эукариот. Так, в настоящее время проводятся интенсивные клинические испытания препаратов GM-CSF Leukine фирмы Immunex и Prokine фирмы Hoechst, полученных биосинтезом в клетках дрожжей. Кроме того, начаты исследования препаратов GM-CSF, выделенных из рекомбинантных клеток

млекопитающих. Наконец, на рынок перспективных лекарств поступил препарат Leukomax из клеток *Escherichia coli* совместного производства фармацевтических фирм Sandoz/Schering-Plough [3].

Ранее нами были предприняты попытки создания секреторных систем гетерологической экспрессии гена GM-CSF человека в *E. coli* с использованием регуляторных элементов белка A *Staphylococcus aureus* или основного мембранного белка OmpA *E. coli* [4]. При этом оказалось, что в случае лидерного пептида белка OmpA происходит правильный процессинг предшественника, однако секреция в периплазматическое пространство достигается лишь при использовании слабых индуцибельных промоторов транскрипции, что, естественно, влияет на общий уровень биосинтеза целевого белка.

В то же время экспрессия синтетического гена, кодирующего сложный гибридный лидерный пептид и двух IgG-связывающих доменов белка A *S. aureus*, соединенных через энтеропептидазный линкер с последовательностью GM-CSF, позволила получить процессированный гибридный белок в растворимом виде в периплазме *E. coli* в количестве,

Сокращения: GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор; Caf1 – капсульный антиген F1 *Yersinia pestis*; IPTG – изопропил-β-D-тиогалактопиранозид; TCA – трихлоруксусная кислота; PMSF – фенилметилсульфонилфторид. Префикс "d" (дезоксид) в формулах олигонуклеотидов для краткости опущен.

<sup>#</sup> Автор для переписки.

достаточном для его очистки с помощью аффинной хроматографии. Однако получение чистого препарата GM-CSF было затруднено, во-первых, из-за его частичной деградации в процессе элюирования с аффинной колонки кислым буфером, во-вторых, вследствие необходимости дальнейшего процессинга путем расщепления труднодоступной энтеропептидазой тонкого кишечника и проведения дополнительных стадий хроматографической очистки.

Тем не менее предыдущими экспериментами было показано, что молекула GM-CSF не содержит участков, не совместимых с экспортом в периплазматическое пространство *E. coli*. Это побудило нас к созданию новых плазмидных конструкций, обеспечивающих высокий уровень биосинтеза предшественника, его правильный процессинг и более эффективный транспорт зрелого GM-CSF в периплазму бактерий.

В настоящей работе в качестве источника лидерного пептида мы выбрали сигнальную последовательность белка Caf1 *Yersinia pestis*, который является одним из основных компонентов покрывающей бактерию капсулы и эффективно секретуруется во внеклеточное пространство [5]. Это давало надежду на то, что лидерный пептид белка Caf1, состоящий из 21 аминокислотного остатка, сможет эффективно транспортировать молекулу GM-CSF в периплазму клеток кишечной палочки.

С этой целью мы запланировали получение плазмидных конструкций, содержащих полностью синтетические гибридные гены, в которых последовательность, кодирующая лидерный пептид белка Caf1, была бы соединена с синтетическим геном *gmcsf*. Для этого на первом этапе был осуществлен химический синтез 81-звенной двухцепочечной ДНК, кодирующей сигнальный пептид белка Caf1, лишенный N-концевого остатка метионина. Путем синонимических замен в кодонах Gly<sup>14</sup>Thr<sup>15</sup> в этот дуплекс введен сайт узнавания рестриктазы *KpnI* с целью дальнейшего ис-

следования функциональной топографии сигнального пептида.

Синтетическая ДНК была фланкирована сайтами узнавания рестриктаз *HindIII* и *XbaI*, по которым осуществлялось клонирование в вектор pUC19. В результате была получена плазида pSPF1 (рис. 1а, 1б) с искусственным геном, кодирующим лидерный пептид белка Caf1, удлинённый на восемь аминокислотных остатков за счёт N-концевых аминокислот β-галактозидазы (*scaf1*). Мы предполагали, что наличие этих дополнительных остатков в составе сигнальной последовательности белка не окажет негативного влияния на процесс его секреции. В литературе описано по крайней мере несколько случаев, когда секреторируемые белки, главным образом эукариотические, обладают аномально длинными лидерными последовательностями [6, 7], не препятствующими нормальной секреции и процессингу предшественника. Кроме того, известны примеры эффективного расщепления в *E. coli* предшественников секреторируемых белков, обладающих искусственно удлинённой N-концевой частью [8].

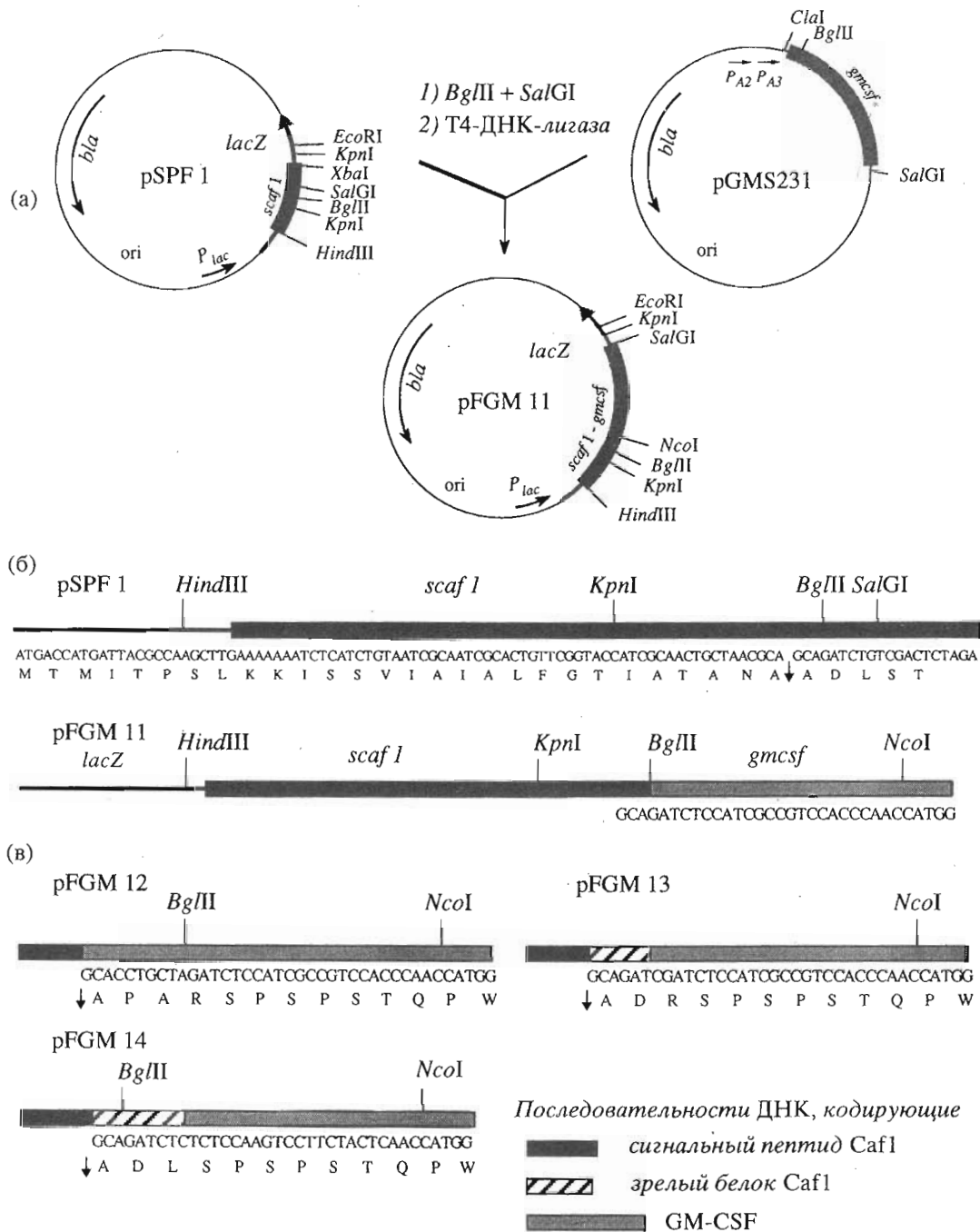
Для конструирования искусственного гена, кодирующего гибрид лидерного пептида Caf1 с GM-CSF (*scaf1-gmcsf*), *BglII/SalGI*-фрагмент плазмиды pGMS231 [3], содержащий основную часть гена *gmcsf*, встроили в вектор pSPF1 (рис. 1а) по одноименным сайтам. Полученная таким образом плазида pFGM11 (рис. 1а, 1б) содержит последовательность гена лидерного пептида *scaf1*, соединённую с геном *gmcsf*. Однако плазида pFGM11 не обеспечивала экспрессии целевого гибридного гена, поскольку трансляционные рамки считывания составляющих его частей не совпадали. Для восстановления единой рамки считывания был синтезирован олигонуклеотидный дуплекс А, который был клонирован далее в плазмиду pFGM11 между генами лидерного пептида *scaf1* и *gmcsf* по сайтам *KpnI* и *BglIII*.

5' CATCGCAACTGCTAACGCGACACCTGCTA  
3' CATGGTAGCGTTGACGATTGCGTCGTGGACGATCTAG  
дуплекс А

Поскольку векторная плазида pFGM11 содержит два сайта *KpnI*, это клонирование проводили путем трехкомпонентного лигирования. Для этого плазмиду pFGM11 расщепили рестриктазами *EcoRI* и *KpnI* и выделили векторный фрагмент. Затем *BglIII/KpnI*-фрагмент той же плазмиды pFGM11, содержащий ген *gmcsf*, лигировали с векторным фрагментом в присутствии большого избытка дуплекса А. В результате получили плазмиду pFGM12 (рис. 1в), содержащую гибридный ген, в котором последовательности, кодирующие сигнальный пептид белка Caf1 и зрелый бе-

лок GM-CSF, образуют единую рамку считывания и находятся под контролем индуцибельного *lac*-промотора.

Для исследования экспрессии гибридного гена были выбраны клетки *E. coli* штамма JM101. В результате индукции *lac*-промотора в клетках этого штамма, трансформированных плазмидой pFGM12, наблюдалось появление белкового продукта с молекулярной массой около 18 кДа, как показал анализ суммарного клеточного белка электрофорезом в SDS-ПААГ (рис. 2а, колонки 1, 2), тогда как в случае правильного процессинга

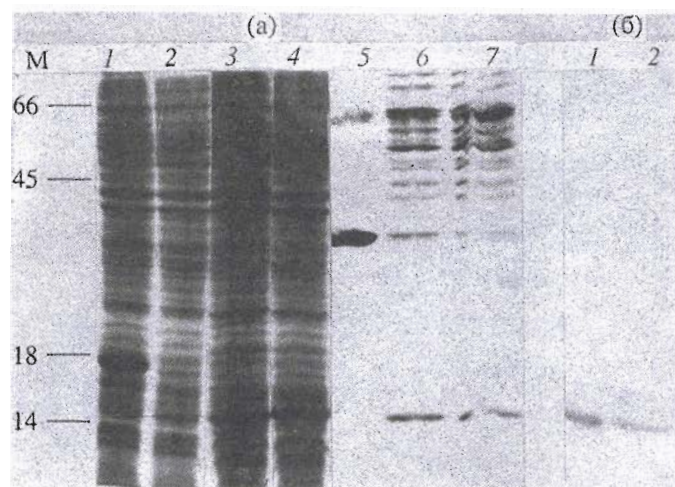


**Рис. 1.** Получение плазмид, содержащих гибридный ген *scaf1-gmcsf*: схема конструирования плазмиды pFGM11 (а); схемы фрагментов плазмид pSPF1 и pFGM11, содержащих искусственный ген, кодирующий сигнальный пептид капсульного антигена Caf1 *Y. pestis* (б); схемы фрагментов плазмид pFGM12, pFGM13 и pFGM14, содержащих гибридный ген *scaf1-gmcsf* (в). Приведены сайты рестриктаз, частичные нуклеотидные последовательности и кодируемые ими аминокислотные последовательности. Вертикальной стрелкой обозначено место отщепления сигнального пептида белка Caf1.

молекулярная масса продукта должна была бы составить 14.5 кДа.

Известно, что эффективность транслокации через внутреннюю мембрану бактерий и процессинга предшественника секретируемого белка зависит от многих факторов. В частности, кроме структуры сигнального пептида большое влияние на этот интегральный процесс оказывают

особенности строения некоторых участков зрелого белка, а именно суммарный электрический заряд его N-концевого района [9]. Так, например, ряд попыток осуществить транспорт рекомбинантных белков в периплазматическое пространство *E. coli* оказался безуспешным из-за наличия вблизи сайта расщепления сигнальной пептидазой положительно заряженных аминокислотных



**Рис. 2.** Анализ экспрессии гибридного гена *scafl-gmcsf*. а – электрофорез в 15% SDS-ПААГ суммарных клеточных белков и белков периплазматических фракций клеток *E. coli* JM101, содержащих плазмиды pFGM12, pFGM13 и pFGM14 с гибридными генами *scafl-gmcsf*: клетки с плазмидой pFGM12 после индукции (1); без индукции (2); клетки с плазмидой pFGM13 (3) и pFGM14 (4) после индукции; периплазма после индукции клеток с плазмидой pFGM12 (5); pFGM13 (6); pFGM14 (7). Слева указаны положения маркеров молекулярной массы (указана М, кДа). б – иммуноблот с поликлональными кроличьими антителами против GM-CSF человека белков периплазматической фракции индуцированных IPTG клеток *E. coli* JM101, содержащих плазмиду pFGM13 (1) и pFGM14 (2).

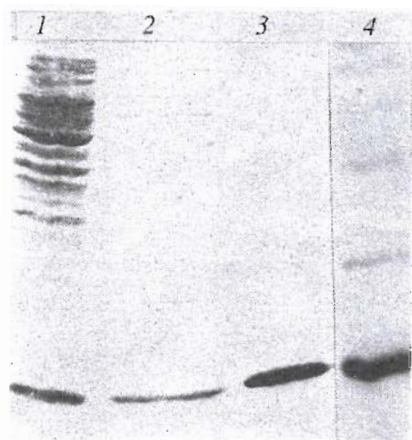
остатков. Только после их удаления или увеличения расстояния до сайта расщепления удалось достигнуть правильного процессинга предшественника [10]. Наряду с этим установлено, что введение остатков лизина или аргинина в N-концевую последовательность нормально секретируемого мембранного белка OmpA приводит к замедлению или даже полной остановке транспорта [11]. Статистический анализ последовательностей секретируемых бактериальных белков вблизи места отщепления сигнального пептида показал, что наиболее предпочтительны структуры, в которых среди первых 10 - 15 N-концевых остатков зрелого белка нет положительно заряженных аминокислот [12]. Если же такие остатки имеются, то их заряд обычно компенсируется соседним отрицательно заряженным остатком, как в случае OmpA [13, 14].

Поэтому мы предположили, что наличие остатка аргинина в четвертом положении молекулы GM-CSF также может препятствовать транспорту гибрида Caf1-GM-CSF в периплазматическое пространство. С другой стороны, структура сигнального пептида, кодируемого pFGM12, несколько отличается от природной последовательности, что также может оказывать влияние на эффективность транспорта и процессинга. Для проверки этих предположений мы решили произвести замены в N-концевой последовательности зрелого GM-CSF, чтобы компенсировать или полностью удалить положительный заряд остатка аргинина.

С этой целью плазмидную ДНК pFGM11 расщепили эндонуклеазой *Bgl*II, получившиеся одно-

цепочечные концы заполнили при помощи фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli* в присутствии четырех дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, а затем двухцепочечную ДНК подвергли лигированию по "тупым" концам. В результате после трансформации компетентных клеток *E. coli* и отбора клонов, содержащих плазмидную ДНК без сайта узнавания рестриктазы *Bgl*II, получили плазмиду pFGM13 (рис. 1в). Она кодирует гибридный белок Caf1-GM-CSF, в котором второй и третий аминокислотные остатки (Pro-Ala) зрелой части белка замещены остатком аспарагиновой кислоты, нейтрализующей положительный заряд соседнего остатка аргинина.

Наряду с этим мы сконструировали плазмиду pFGM14, кодирующую гибридный белок Caf1-GM-CSF, в котором три аминокислоты GM-CSF (Pro<sup>2</sup>Ala<sup>3</sup>Arg<sup>4</sup>) заменены дипептидом Asp-Leu (рис. 1в). Этим достигается, во-первых, удаление положительно заряженного аргинина из N-концевой части зрелого белка, а во-вторых, более полное совпадение аминокислотной последовательности гибридного пробелка вблизи места расщепления сигнальной пептидазой с соответствующей последовательностью предшественника Caf1 (рис. 1в). Можно было предположить, что такая структурная организация пробелка облегчит его транслокацию через мембрану и последующий процессинг и в то же время не повлияет на биологическую активность зрелого белка, так как известно, что незначительные изменения N-концевой аминокислотной последовательности GM-CSF не приводили к изменению биологической активности мутантных вариантов [15].



**Рис. 3.** Электрофорез в 15% SDS-ПААГ белков периплазматической фракции клеток *E. coli* JM101 с плазмидой rFGM13 после индукции IPTG (1); фракции, содержащей GM-CSF, после хроматографии на DEAE-сефацеле (2), на октил-сефарозе CL-4В (3) и на фенол-сефарозе CL-4В (4).

Для конструирования плазмиды rFGM14 (рис. 1в) синтетический дуплекс Б клонировали в плазмиду rFGM11 после ее расщепления рестриктазой *Bgl*III, “затупления” образовавшихся “липких” концов при помощи фрагмента Кленова ДНК-полимеразы *E. coli* и последующего расщепления эндонуклеазой *Nco*I.

5' TCTCTCCAAGTCCTTCTACTCAAC  
3' AGAGAGGTTTCAGGAAGATGAGTTGGTAC  
дуплекс Б

Экспрессию различных вариантов гибридного гена, кодируемых плазмидами rFGM13 и rFGM14, также изучали в клетках *E. coli* штамма JM101. Анализ продуктов экспрессии, полученных в результате индукции *lac*-промотора IPTG в течение 3 ч, проводили при помощи электрофореза в SDS-ПААГ. При этом было обнаружено, что кодируемые плазмидами rFGM13 и rFGM14 белки-предшественники претерпевают нормальную транслокацию и процессинг, о чем свидетельствует полоса белка с молекулярной массой около 14.5 кДа как в пробе суммарного клеточного белка, так и в периплазматической фракции плазмидосодержащих штаммов после индукции (рис. 2а, колонки 3, 4, 6 и 7). Следует отметить, что уровень экспрессии гибридного гена *scaf1-gmcsf* в штаммах, трансформированных плазмидами rFGM13 и rFGM14, был практически одинаковым.

Для проверки правильности процессинга предшественника проводили полупрепаративное разделение белков периплазмы клеток *E. coli*, содержащих плазмиду rFGM13 или rFGM14. Белки переносили электроблоттингом на поливинилденфторидную мембрану, затем выделяли предполагаемый целевой белок и определяли N-кон-

цевые аминокислотные остатки. При этом в случае белка, кодируемого плазмидой rFGM13, была определена последовательность Ala-Asp-Arg, тогда как для белка, кодируемого плазмидой rFGM14, – последовательность Ala-Asp-Leu. Это однозначно подтверждало сделанный ранее вывод о том, что в клетках *E. coli* с плазмидами rFGM13 и rFGM14 гибридный белок претерпевает транслокацию через внутреннюю бактериальную мембрану и точный последующий процессинг. Анализ белков периплазматической фракции этих клеток методом иммуноблоттинга с поликлональной сывороткой против рекомбинантного GM-CSF человека показал, что данные антитела специфически взаимодействуют только с целевыми белками (рис. 2б).

С целью исследования биологической активности полученных рекомбинантных белков мы разработали схему их выделения в масштабе 1 л культуры. Белки, кодируемые плазмидами rFGM13 и rFGM14, были очищены по одинаковой схеме. Препарат периплазматической фракции [16] клеток (рис. 3, колонка 1) хроматографировали на DEAE-сефацеле в градиенте концентрации NaCl; к фракциям, содержащим GM-CSF (колонка 2), добавляли сульфат аммония до концентрации 0.5 М и хроматографировали их на фенол-сефарозе CL-4В. Такая двухстадийная схема позволяла получать белок 70%-ной чистоты (рис. 3, колонка 4). Необходимо отметить, что значительная часть белка терялась в процессе сорбции на фенол-сефарозу. Поэтому в дальнейшем мы использовали более гидрофобную октил-сефарозу CL-4В, полная элюция GM-CSF с которой достигалась при использовании 15% этанола. В результате указанной процедуры было выделено по 1.5 мг каждого из вариантов GM-CSF.

Полученные после гидрофобной хроматографии образцы подвергали высокоэффективной обращенно-фазовой хроматографии на колонке ProRPC 5/10 в градиенте концентрации ацетонитрила в 0.1% трихлоруксусной кислоте (рис. 4). В результате были получены рекомбинантные белки, имеющие чистоту около 98% (по данным аналитической ВЭЖХ).

Проверку биологической активности полученных нами рекомбинантных белков проводили по их способности стимулировать рост колоний гранулоцитов и макрофагов из клеток эмбриональной печени человека на метилцеллюлозе [17]. Оказалось, что обе формы белка обладают высокой специфической активностью (рис. 5) – около  $10^8$  ед./мг.

Таким образом, сконструирован ряд рекомбинантных плазмид, кодирующих гибридные белки, в которых модифицированная последовательность сигнального пептида капсульного антигена

F1 *Y. pestis* соединена с аминокислотной последовательностью зрелого гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека. Исследована топография сайта расщепления сигнальной пептидазой *E. coli*. Показано, что наличие вблизи сайта расщепления остатка аргинина препятствует правильному процессингу предшественника. Сконструированы штаммы *E. coli*, секретирующие в периплазматическое пространство биологически активные мутантные формы GM-CSF человека.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали следующие реактивы: 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); дезоксинуклеотид-5'-фосфаты (Pharmacia-PL, Швеция); эндонуклеазы рестрикции *Bgl*II, *Kpn*I, *Eco*RI, *Nco*I, *Bsp*RI, *Sal*GI и ДНК-полимеразу I *E. coli* (фрагмент Кленова) производства НПО "Фермент" (Вильнюс). ДНК-лигаза и полинуклеотидкиназа фага T4 выделены в лаборатории химии генов. Поликлональная кроличья антисыворотка против рекомбинантного GM-CSF человека любезно предоставлена В.Е. Жемчуговым (АООТ Институт инженерной иммунологии, пос. Любучаны, Московская обл.).

Бактериальные штаммы: *E. coli* XL-1 Blue (*recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*,  $\Delta(lac-proAB)$ , *FproAB*, *lacI<sup>q</sup>ZDM15*, Tn10 (*tet'*) фирмы Stratagene; JM101 (*supE*, *thi*, *A(lac-proAB)*, *F'traD36*, *proAB*, *lacI<sup>q</sup>ZDM15*) [18].

Олигонуклеотиды синтезированы М.С. Щепиновым в лаборатории химии генов ИБХ РАН твердофазным методом на автоматическом синтезаторе Applied Biosystems 380A (США) и очищены электрофорезом в ПААГ с последующей ВЭЖХ.

Приготовление компетентных клеток, трансформацию бактерий, выделение плазмидной ДНК, ферментативную обработку и электрофорез ДНК проводили по стандартным методикам [19].

Строение полученных плазмидных конструкций подтверждали рестриктным анализом и определением нуклеотидной последовательности участков ДНК, для чего использовали набор с *Taq*-ДНК-полимеразой фирмы "Биопол" (Москва). Подготовку матрицы и проведение реакций осуществляли согласно рекомендациям фирмы с применением универсального праймера M13.

Индукцию *lac*-промотора осуществляли как описано в работе [20]. Ночную культуру транс-

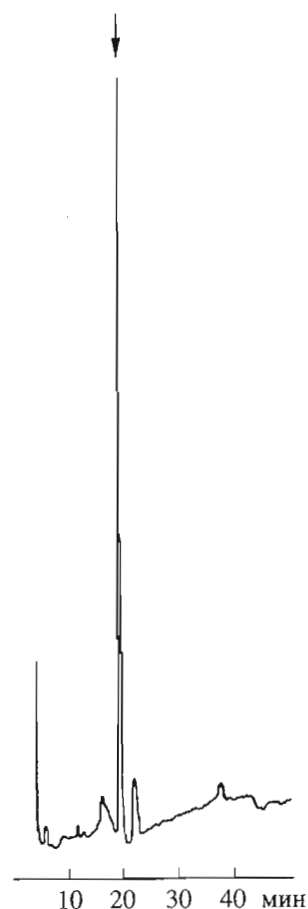


Рис. 4. Preparative chromatography GM-CSF on a column Pro-RPC 5/10 in a gradient of concentration of acetonitrile in 0.1% TCA. Flow rate 0.5 ml/min; detection by UV-absorption at 280 nm. Arrow indicates the position of the peak containing GM-CSF.

формированных соответствующей плазмидой 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 два раза средой LB и суспендировали в прежнем объеме среды с добавлением ампициллина и IPTG ("Биопол", Москва) до конечной концентрации 100 мкМ. Культуру выращивали при 37°C и умеренной аэрации (150 об/мин).

Периплазматическую фракцию выделяли методом осмотического шока, как описано в работе [16].

Для электрофоретического анализа белков использовали систему Лэммли [21]. Блот-гибридизацию проводили после переноса разделенных в 15% ПААГ белков на нитроцеллюлозную мембрану с помощью прибора для полусухого переноса (Biotech, США) по методу работы [22].

Для выделения рекомбинантных белков из периплазматической фракции клеток использовали

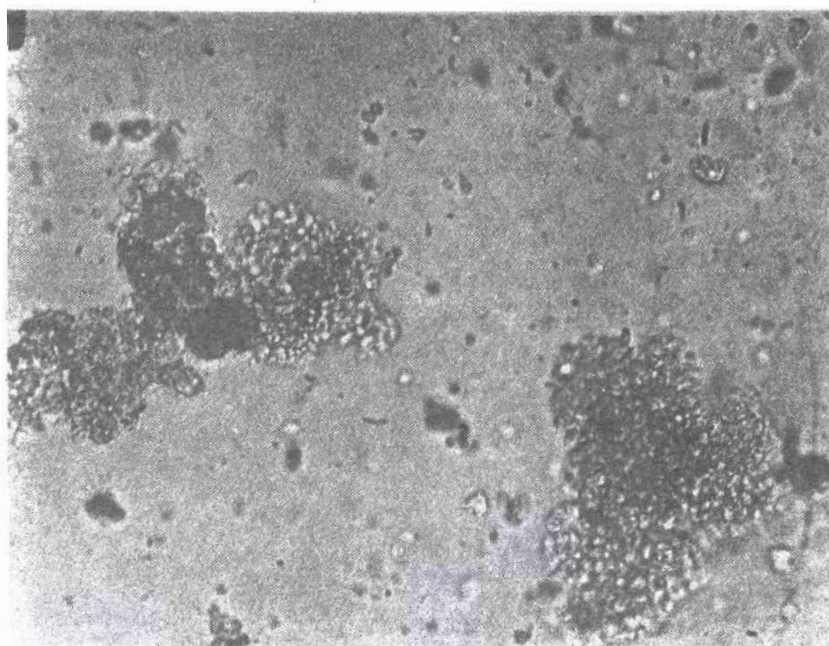


Рис. 5. Колонии предшественников гранулоцитов и макрофагов, индуцированные при обработке культуры клеток эмбриональной печени человека препаратом рекомбинантного GM-CSF. Увеличение 400х.

методику работы [23] с некоторыми модификациями. Белки периплазматической фракции, полученной из 1 л культуры клеток, наносили на колонку объемом 10 мл с DEAE-сефацелом (Pharmacia), уравновешенным буфером, содержащим 50 мМ трис-НСl (рН 8.0), 0.5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2 мМ EDTA и 10 мкг/мл PMSF, отмывали тем же буфером до отсутствия поглощения при 280 нм и хроматографировали, используя градиент концентрации NaCl 0 - 0.5 М (общий объем градиента 100 мл). Фракции анализировали при помощи электрофореза аликвот в 15% SDS-ПААГ. Белки, кодируемые плазмидами rFGM13 и rFGM14, элюировались с колонки при концентрации NaCl 0.15 - 0.2 М. Содержащие GM-CSF фракции объединяли, добавляли сульфат аммония до концентрации 0.5 М, после чего наносили на колонку объемом 2 мл с фенил-сефарозой CL-4В (Pharmacia), уравновешенной буфером для ионообменной хроматографии, содержащим 0.2 М NaCl и 0.5 М (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Элюцию проводили обратным градиентом концентрации сульфата аммония (объем градиента 20 мл). Целевые белки выходили в первых фракциях, причем значительная часть материала (около 10%) не связалась с колонкой. Поэтому в последующих экспериментах в тех же условиях проводили хроматографию на колонке с октил-сефарозой CL-4В, после чего носитель промывали 10 мМ трис-НСl (рН 8.0) и белки элюировали градиентом концентрации этанола (0 - 40%, 20 мл) в том же буфере. Рекомбинантный GM-CSF

смывался с колонки при концентрации этанола около 15%.

Высокоэффективную обращенно-фазовую хроматографию проводили с использованием хроматографа LCC-500 и насоса P-500 на колонке ProRPC 5/10 (Pharmacia). Для этого фракции, содержащие GM-CSF, после хроматографии на фенил- или октил-сефарозе объединяли, упаривали на роторном испарителе, доводили до 0.1% TCA и наносили на колонку, предварительно уравновешенную 0.1% TCA. Колонку отмывали до достижения исходного уровня поглощения при 280 нм и проводили элюцию в градиенте концентрации ацетонитрила в 0.1% TCA в течение 30 мин при скорости потока 0.5 мл/мин.

Определение биологической активности GM-CSF проводили на клетках эмбриональной печени человека по методу работы [17].

Авторы выражают благодарность Н.А. Потапенко (ИБХ РАН) за определение N-концевой аминокислотной последовательности рекомбинантных белков, М.С. Щепинову (ИБХ РАН, Москва) за синтез олигонуклеотидов и В.Е. Жемчугову (АООТ Институт инженерной иммунологии, пос. Любучаны, Московская обл.) за кроличьи поликлональные антитела против GM-CSF человека.

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. Scarffe J.H. // *Eur. J. Cancer*. 1991. V. 27. P. 1493 - 1504.
3. Arriola E., Glaspy J.A. // *Drug Inform. Bulletin (UCLA Dep. of Pharm. Serv.)*. 1991. V. 11.
4. Петровская Л.Е., Рузин А.В., Шингарова Л.Н., Коробко В.Г. // *Биоорганическая химия*. 1995. Т. 21. С. 846 - 855.
5. Galyov E.E., Smirnov O.Yu., Karlyshev A.V., Volkovoy K.I., Denesyuk A.I., Nazimov I.V., Rubtsov K.S., Abramov V.M., Dalvadyanz S.M., Zav'yalov V.P. // *FEBS Lett*. 1990. V. 277. P. 230 - 232.
6. Gray P.W., Aggarwal B.B., Benton C.V., Bringman T.S., Henzel W.J., Jarret J.A., Leung D.W., Moffat B., Ng P., Svedersky L.P., Palladino M.A., Nedwin G.E. // *Nature*. 1984. V. 312. P. 721 - 724.
7. March C.J., Mosley B., Larsen A., Cerretti D.P., Braedt G., Price V., Gillis S., Henney C.S., Kronheim S.R., Grabstein K., Conlan P.J., Hopp T.P., Cosman D. // *Nature*. 1985. V. 315. P. 641 - 643.
8. Talmadge K., Brosius J., Gilbert W. // *Nature*. 1981. V. 294. P. 176 - 178.
9. Дебабов Д.В. // *Молекулярная биология*. 1994. Т. 28. Вып. 3. С. 496 - 505.
10. Summers R.G., Harris C.R., Knowles J.R. // *J. Biol. Chem.* 1989. V. 264. P. 20082 - 20088.
11. Geller B., Zhu H.Y., Cheng S., Kuhn A., Dalvey R.E. // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. P. 9442 - 9447.
12. von Heijne G. // *J. Mol. Biol.* 1986. V. 192. P. 287 - 290.
13. Rao Movva N., Nakamura K., Inouye K. // *J. Biol. Chem.* 1980. V. 143. P. 317 - 328.
14. Rao Movva N., Nakamura K., Inouye K. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1980. V. 77. P. 3845 - 3849.
15. Kanakura Y., Cannistra S.A., Brown C.B., Nakamura M., Seelig G.F., Prosser W.W., Hawkins J.C., Kaushansky K., Griffin J.D. // *Blood*. 1991. V. 77. P. 1033 - 1043.
16. Ducancel F., Boulain J.-C., Tremeau O., Menez A. // *Prot. Engineering*. 1989. V. 3. P. 139 - 143.
17. Чертков И.Л., Гуревич О.А. *Стволовая кроветворная клетка и ее микроокружение*. М.: Медицина, 1984. С. 192 - 220.
18. Yanish-Perron C., Vieira J., Messing J. // *Gene*. 1985. V. 33. P. 103 - 119.
19. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. *Молекулярное клонирование: Пер. с англ.* М.: Мир, 1984.
20. 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.
21. Laemmli U.K. // *Nature*. 1970. V. 227. P. 680 - 685.
22. Towbin H., Strahelin T., Gordon J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1979. V. 76. P. 4350 - 4354.
23. 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.

## Effect of Topography of the Signal Protease Cleavage Site on the Efficiency of Secretion of Human Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor into Periplasm of *Escherichia coli* Cell

L. E. Petrovskaya, E. A. Kryukova, S. A. Yakimov, A. N. Wulfson,  
R. A. Alibaeva, L. N. Shingarova, A. A. Guzaev\*, V. M. Abramov\*, and V. G. Korobko<sup>1</sup>

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

*\*Institute of Immunoengineering, Lyubuchany, Moscow oblast 142380 Russia*

**Abstract** – Synthesis of an artificial gene encoding the signal peptide of the *Yersinia pestis* capsule antigen (Caf1) was accomplished. A set of plasmids coding for hybrid proteins in which a modified sequence of the Caf1 signal peptide is connected to the amino acid sequence of the mature granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) were constructed. Topography of the cleavage site of signal proteases was studied. The presence of an arginine residue within the N-terminal part of the mature human GM-CSF was shown to hinder the proper processing and translocation of the precursor through periplasmic membrane. A number of *E. coli* strains secreting biologically active mutants of human GM-CSF were obtained.

**Key words:** granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), hybrid gene, capsule antigen F1 (Caf1), signal sequence, expression in *E. coli*, secretion.

<sup>1</sup> To whom the correspondence should be addressed.