



УДК 577.112: 577.214.622

ДЕЛЕЦИОННЫЕ МУТАНТЫ ГРАНУЛОЦИТАРНО-МАКРОФАГАЛЬНОГО КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩЕГО ФАКТОРА ЧЕЛОВЕКА

© 2002 г. Л. Е. Петровская^{*,#}, Е. А. Крюкова^{*}, А. Л. Каюшин^{*},
А. В. Родина^{**}, Е. Ю. Москалева^{**}, В. Г. Коробко^{*}

^{*} Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997, Москва ГСП, В-437, ул. Миклаухо-Маклая, 16/10;

^{**} Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения, Москва

Поступила в редакцию 22.10.2001 г. Принята к печати 29.11.2001 г.

Для изучения структурно-функциональных связей в молекуле гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора человека (GM-CSF) были сконструированы гены трех его делеционных вариантов: D1 – мутанта с делецией последовательности из 6 а.о. (37–42), включающей участок бета-структуры; D2 – с делецией последовательности из 6 а.о. (45–50), представляющей собой неструктурированную часть петли; и D3 – с делецией последовательности из 14 а.о. (37–50), соответствующей петле А–В и кодируемой вторым экзоном гена *gmcsf*. Продукты экспрессии полученных генов в клетках *E. coli* накапливались во фракции нерастворимых белков. Мутантные белки обладали вторичной структурой, подобной структуре полноразмерного GM-CSF. Биологическая активность делеционных вариантов была в 130 раз ниже, чем у GM-CSF; они стимулировали пролиферацию клеточной линии TF-1 при концентрации 3 нг/мл. Полученные белки проявляли антагонистические свойства по отношению к полноразмерному GM-CSF, степень ингибирования его колониестимулирующей активности составляла 27%. Снижение активности мутантов в ряду D2 > D1 > D3 свидетельствует о важности консервативных гидрофобных остатков, участвующих в образовании бета-структуры, для формирования функциональной конформации GM-CSF.

Ключевые слова: альфа-спиральные цитокины; GM-CSF, делеционные варианты, экспрессия в *E. coli*, антагонизм.

ВВЕДЕНИЕ

Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) представляет собой гликопротеин, стимулирующий пролиферацию и созревание предшественников миелоидных клеток, а также функции зрелых нейтрофилов, эозинофилов и моноцитов [1]. Возможные области его клинического использования включают миелодиспластические синдромы, миелосупрессию в результате химиотерапии и пересадки костного мозга, апластическую анемию и т.п. [2], а также экстракорпоральную активацию дендритных клеток и стимуляцию иммунного ответа на раковые антигены [3]. В некоторых случаях повышенный синтез GM-CSF в организме человека сопровождается патологическими состояниями (например, аллергию, ревматоидный артрит) [4,

5], что делает актуальным поиск или создание антагонистов, блокирующих действие этого белка.

Согласно данным рентгеноструктурного анализа [6], молекула GM-CSF имеет пространственное строение, типичное для представителей семейства α -спиральных цитокинов с короткой цепью. Это семейство включает в себя по крайней мере девять белков (в том числе GM-CSF, M-CSF, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5), основу строения которых составляет пучок из четырех α -спиралей, имеющих длину 10–15 а.о. (рис. 1а). Уникальное взаимное расположение α -спиралей в пучке (вверх-вверх-вниз-вниз) обуславливает наличие длинных петель, соединяющих эти спирали (первую со второй и третью с четвертой). В петлях располагаются участки антипараллельной β -структуры [7]. Общей чертой устройства генов белков семейства является наличие отдельных экзонов, кодирующих следующие структурные элементы: α -спираль А, петлю А–В, α -спирали В и С и часть петли С–D, остаток петли и α -спираль D (рис. 1б).

Несмотря на общий тип пространственного устройства, гомология аминокислотных последовательностей представителей семейства относительно-

Сокращения: GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор; Saf1 – капсульный антиген F1 *Y. pestis*; IL – интерлейкин; IPTG – изопропил- β -D-тиогаляктопиранозид.

[#] Автор для переписки (эл. почта: lpetr@mail.ibch.ru; тел.: (095) 330-69-83).

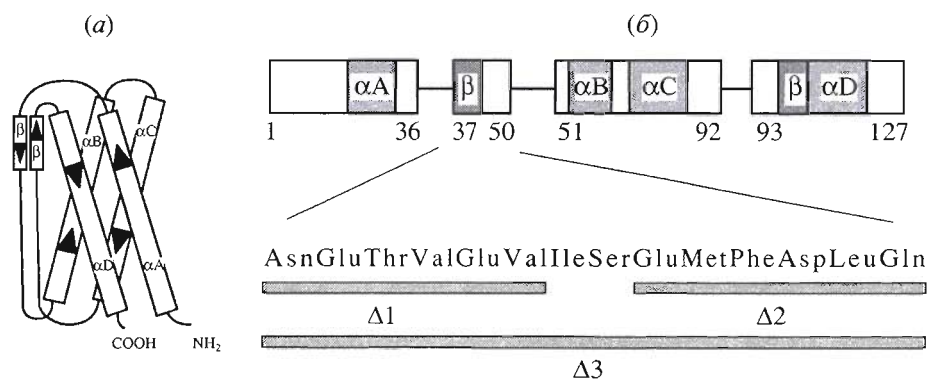


Рис. 1. Схема строения GM-CSF: *a* – пространственная структура молекулы α -спирального цитокина с короткой цепью (из [7]), αA – αD – α -спирали; β – β -структуры, стрелки указывают направление от *N*-конца к *C*-концу белка; *b* – экзонная структура гена *gmcsf* (из [8]). Выделены фрагменты, кодирующие основные структурные элементы белка, цифрами обозначены положения аминокислотных остатков на границах участков, кодируемых экзонами. Приведена аминокислотная последовательность, соответствующая второму экзону гена *gmcsf*, с обозначением полученных в работе делеций. $\Delta 1$ – делеция последовательности из 6 а.о. (37–42 а.о.), $\Delta 2$ – делеция последовательности из 6 а.о. (45–50 а.о.), $\Delta 3$ – делеция последовательности из 14 а.о. (37–50 а.о.).

но низка. Степень их родства характеризуется числом так называемых “структурно эквивалентных остатков”, положение α -углеродных атомов которых совпадает при попарном сравнении молекул цитокинов. Оно может составлять от 68 в паре GM-CSF/M-CSF до 81 в парах IL-4/IL-2, GM-CSF/IL-5 и IL-2/IL-5. Остатки, расположение α -углеродных атомов которых одинаково во всех комбинациях, образуют каркас данного типа укладки, составляющий 41–48% молекулы [8].

Существование структурной гомологии между членами семейства позволяет производить изменения в их молекулах на основе данных о мутагенезе соответствующих участков родственных цитокинов. Руководствуясь этой логикой, мы решили сконструировать мутанты GM-CSF со структурой, аналогичной структуре природных антагонистов IL-4 и IL-2. Эти белки-антагонисты возникли в результате альтернативного сплайсинга, при котором в каждом из генов интерлейкинов произошла делеция последовательности, соответствующей второму экзону [9, 10]. Мы предположили, что делеция структурно гомологичного участка GM-CSF, относящегося к тому же семейству, сходным образом может повлиять на его взаимодействие с рецептором и на биологическую активность.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Второй экзон является самым коротким в гене *gmcsf* и кодирует последовательность из 14 а.о., соответствующую фрагменту 37–50 а.о. зрелого белка [11] (рис. 1б). В трехмерной модели белка она соответствует петле, соединяющей α -спирали A и B и включающей в себя участок β -структуры [6] (рис. 1а). Для определения роли этого

фрагмента, а также отдельных его частей в формировании пространственной структуры и функционировании GM-CSF мы запланировали получение трех делеционных вариантов ($\Delta 1$ – $\Delta 3$) этого белка (рис. 1б): $\Delta 1$ – с делецией последовательности из 6 а.о. (37–42 а.о.), включающей участок β -структуры; $\Delta 2$ – с делецией последовательности из 6 а.о. (45–50 а.о.), представляющей собой неструктурированную часть петли и $\Delta 3$ – с делецией последовательности из 14 а.о. (37–50 а.о.), соответствующей петле A–B и кодируемой вторым экзоном.

Для конструирования генов делеционных мутантов мы воспользовались плазмидой pFGM13 [12], содержащей синтетический ген *scaf1-gmcsf*. Он кодирует гибридный белок-предшественник Caf1-GMCSF, в зрелую часть которого для облегчения секреции внесены аминокислотные замены (Pro2Ala3 на Asp), не оказывающие влияния на биологическую активность GM-CSF [12]. Устройство синтетического гена позволяет легко проводить замену и мутагенез отдельных участков олигонуклеотидными дуплексами благодаря удобному расположению сайтов узнавания эндонуклеаз рестрикции [13]. При помощи этого подхода нами были получены плазмиды pFGMd1, pFGMd2 и pFGMd3, включающие гены белков-предшественников соответствующих делеционных вариантов $\Delta 1$ – $\Delta 3$ под контролем *lac*-промотора. Сигнальная последовательность Caf1-антигена *Yersinia pestis* должна была обеспечить транспорт этих белков в периплазматическое пространство клеток бактерий, как это имело место в случае GM-CSF [12].

Экспрессию полученных генов изучали в клетках *Escherichia coli* штамма JM101. После индукции IPTG в течение 3 ч образцы культур клеток,

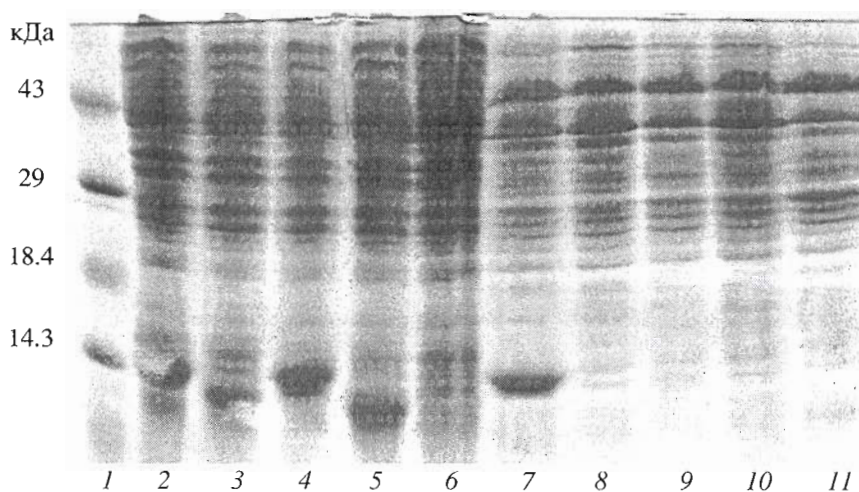


Рис. 2. Анализ электрофорезом в 15% ПААГ экспрессии генов *gmcsf* и его делеционных вариантов в клетках *E. coli* штамма JM101, трансформированных плазмидами pFGM13 (дорожки 2, 7), pFGMd1 (дорожки 3, 8), pFGMd2 (дорожки 4, 9), pFGMd3 (дорожки 5, 6, 10, 11). 1 – маркеры молекулярной массы (GibcoBRL); 2–6 – суммарный клеточный белок; 7–11 – периплазматическая фракция; 6, 11 – контроль без добавления IPTG.

трансформированных одной из плазмид pFGMd1, pFGMd2 или pFGMd3, проанализировали денатурирующим электрофорезом в SDS-ПААГ и обнаружили, что в клетках бактерий происходит эффективный синтез делеционных вариантов GM-CSF (рис. 2, дорожки 3–5). Электрофоретическая подвижность мутантов D1 и D3 соответствует рассчитанной молекулярной массе процессированных белков (13.7 и 12.8 кДа соответственно), а D2 обладает пониженной относительно расчетной (13.7 кДа) подвижностью (рис. 2, дорожка 4). Поскольку *N*-концевая аминокислотная последовательность всех полученных вариантов соответствует последовательности зрелого GM-CSF, аномальную подвижность D2 нельзя объяснить отсутствием процессинга, и причины этого явления остаются неизвестными.

Изучение образцов периплазматической фракции клеток бактерий показало, что секреция укороченных вариантов в отличие от полноразмерного GM-CSF происходит крайне неэффективно (рис. 2, ср. дорожки 7 и 8–10). По всей видимости, гибридные предшественники вступают в процесс транслокации, на что указывает отсутствие сигнальной последовательности, однако затем этот процесс прерывается, и процессированный белок оказывается в нерастворимом состоянии. Следует отметить, что при экспрессии полноразмерного гена *gmcsf* значительная часть белка также остается связанной с внутренней мембраной [12], этому, по-видимому, способствует амфипатическая природа GM-CSF, обуславливающая некоторое сродство к липидному окружению [14]. Можно предположить, что в результате произведенных делеций дополнительные гидрофобные поверхности белка оказываются экспонированными и, следовательно, проявляют большую тенденцию к связыванию с мембраной.

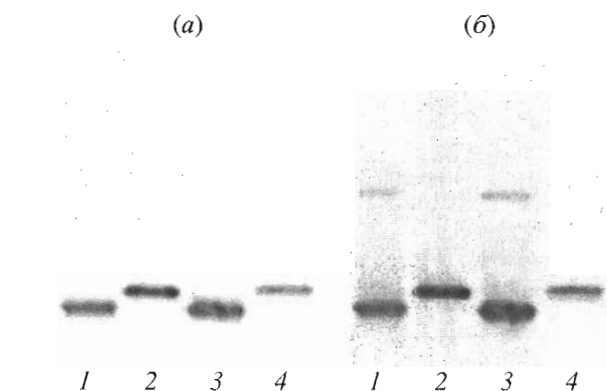


Рис. 3. Электрофорез (а) и иммуноблоттинг с поликлональной антисывороткой к GM-CSF (б) очищенных белков: D1 (1), D2 (2), D3 (3) и GM-CSF (4).

Высокий уровень синтеза делеционных вариантов GM-CSF в индуцированных клетках *E. coli*, трансформированных соответствующими плазмидами, позволил нам использовать для их выделения стандартную методику очистки белков из телец включения. Мы воспользовались тем, что молекулярная масса мутантов существенно отличается от масс большинства примесных белков в осадке после озвучивания, и проводили их разделение при помощи гель-фильтрации в денатурирующих условиях. В результате одной хроматографической стадии удалось выделить электрофоретически чистые белки (рис. 3а, дорожки 1–3), которые затем были ренатурированы путем медленного диализа.



Рис. 4. Влияние GM-CSF и его делеционных вариантов D1, D2, D3 на стимуляцию пролиферации клеток TF-1: 1 – GM-CSF фирмы Immunex; 2 – GM-CSF; 3 – D2; 4 – D1; 5 – D3. За 100% принят уровень пролиферации клеток без факторов, включение [³H]тимидина 4000 имп./мин.

Для подтверждения структуры полученных белков мы провели определение их N-концевой последовательности. Во всех трех случаях она соответствовала последовательности GM-CSF, кодируемого плазмидой pFGM13 (AlaAspArgSerProSerProSerThrGln), что доказывает правильность отщепления сигнального пептида. Методом иммуноблотинга с кроличьей сывороткой показано, что все мутантные белки специфически взаимодействуют с поликлональными антителами против рекомбинантного GM-CSF (рис. 3б, дорожки 1–4). Мы также провели исследование вторичной структуры этих белков методом спектроскопии кругового дихроизма. Результаты этого исследования показали, что все они содержат примерно 46% α -спирали и около 7% β -структуры, подобно полноразмерному белку. Однако, поскольку полученные белки являются совершенно новыми мутантами GM-CSF и данные об их свойствах отсутствуют, необходимо было убедиться, что разработанная нами методика выделения не нарушает их биологическую активность.

С этой целью мы провели выделение по этой же методике полноразмерного GM-CSF из фракции нерастворимых белков индуцированных клеток *E. coli* JM101, трансформированных плазмидой pFGM13 (рис. 3а, дорожка 4). Колониестимулирующую активность полученного препарата определяли путем добавления титрованных количеств GM-CSF к культуре клеток эритролейкемии человека линии TF-1, в качестве контроля использовали препарат фирмы Immunex, полученный путем экспрессии природного гена *gmcsf* в клетках дрожжей. Степень стимуляции пролиферации определяли по включению [³H]тимидина.

Как видно из рис. 4, максимальная стимуляция пролиферации достигается при добавлении 60–150 пг/мл GM-CSF, а необходимая для 50%-ной стимуляции доза составляет 50 пг/мл. При этом активность выделенного нами белка соответствует активности контрольного препарата, а также литературным данным [15], следовательно, использованные методы очистки не приводят к потере биологических свойств GM-CSF.

В следующем эксперименте с использованием этой же линии мы определили колониестимулирующую активность делеционных вариантов D1, D2 и D3. Оказалось, что в рабочем диапазоне разведений GM-CSF они не стимулируют пролиферацию клеток TF-1, однако проявляют колониестимулирующую активность при увеличении концентрации выше 3 нг/мл. Максимальное включение [³H]тимидина, составляющее от 50% (D3) до 78% (D2) от достигаемого при использовании полноразмерного GM-CSF, наблюдается при концентрации этих белков около 8 нг/мл, что в 130 раз выше, чем для полноразмерного белка (рис. 4).

Основываясь на полученных результатах, мы провели испытания антагонистической активности мутантных белков. С этой целью клетки TF-1 культивировали в присутствии полноразмерного GM-CSF (0.15 нг/мл) в комбинации с различными разведениями делеционных вариантов (таблица). При этом с увеличением концентрации каждого из мутантов вплоть до значения 0.8 нг/мл для D1 и D2, 3.2 нг/мл для D3 наблюдалось снижение колониестимулирующей активности GM-CSF, однако при последующем увеличении концентрации мутантов она снова возрастала. Максимальная степень ингибирования пролиферации составила

Влияние делеционных вариантов GM-CSF на стимуляцию пролиферации клеток TF-1 полноразмерным GM-CSF в концентрации 0.15 нг/мл

Концентрация, нг/мл	Стимуляция пролиферации, %		
	D1	D2	D3
0.1	не определяли	1407 ± 40	799.5 ± 21.5
0.2	829.5 ± 4.5	1055 ± 37	741 ± 10
0.4	713 ± 23	883.5 ± 129.5	744.5 ± 63.5
0.8	578 ± 45	688 ± 2	751 ± 61
1.6	732 ± 10	774 ± 11	733.5 ± 10.5
3.2	743.5 ± 3.5	765 ± 23	635.5 ± 18.5

Приведены средние результаты трех измерений. 100% – клетки без добавления факторов, включение [³H]тимидина – 1302 имп./мин. 795% – стимуляция клеток 0.15 нг/мл GM-CSF.

27% для D1, 13.5% – для D2, 20% – для D3. Таким образом, антагонистическая активность полученных нами делеционных вариантов GM-CSF существенно ниже, чем у аналогичных вариантов IL-2 и IL-4 (ср. [9, 10]).

Известно, что биологическое действие GM-CSF опосредуется связыванием с высокоаффинным рецептором, который состоит из специфической α -субъединицы [16], связывающей лиганд с низкой аффинностью, и β -субъединицы, также участвующей в образовании высокоаффинных рецепторов IL-3 и IL-5 [17]. Изучение мутантов GM-CSF и данные биохимических исследований указывают на наличие в его молекуле двух участков связывания рецептора. Первая α -спираль участвует в связывании полного высокоаффинного рецептора, но не взаимодействует с α -субъединицей [18]. Показано, в частности, что остаток глутаминовой кислоты в положении 21 играет важную роль во взаимодействии с β -субъединицей. Мутанты, полученные путем замены этого остатка остатком аргинина, проявляют свойства антагонистов GM-CSF [19]. Участок связывания α -субъединицы рецептора расположен в C-концевой части молекулы GM-CSF. Он включает дистальную часть третьей α -спирали, петлю между третьей и четвертой α -спиралями и четвертую α -спираль [20].

В соответствии с данными компьютерного моделирования [21, 22], в результате делеции аминокислотной последовательности, кодируемой вторым экзоном гена IL-4 или IL-2, происходит поворот спирали A, приводящий к изменению взаимного расположения α -спиралей (вниз-вверх-вниз-вниз вместо вверх-вверх-вниз-вниз). Отмеченная выше структурная гомология внутри семейства α -спиральных цитокинов с короткой цепью дает основание предполагать, что аналогичная переориентация происходит и в случае делеции соответствующей последовательности в молекуле GM-CSF. При этом неизбежны изменения конфигурации участка связывания с рецепто-

ром, в частности, сдвиг остатка Glu21, что, вероятно, приводит к наблюдаемому нами 130-кратному снижению активности мутантов, однако не ликвидирует ее полностью. В результате антагонизм по отношению к GM-CSF наблюдается только при низкой концентрации делеционных вариантов, а при ее повышении до определенной величины начинает проявляться их собственная колониестимулирующая активность.

Среди изученных нами мутантных белков наибольшей активностью обладает вариант D2, в котором отсутствует неструктурированная часть петли. Активность варианта D1, полученного в результате делеции последовательности такой же длины, но включающей участок β -структуры, ниже на 24%. По-видимому, это объясняется тем, что из шести делетированных в D1 остатков два (Val40 и Val42) участвуют в образовании гидрофобного каркаса молекулы GM-CSF [8]. Самой низкой активностью обладает вариант D3, в котором кроме того отсутствует Ile43, также являющийся частью каркаса [8]. Ранее было показано, что замена Ile43 остатком фенилаланина в GM-CSF сопровождается существенным снижением его активности [23]. Полученные результаты косвенно подтверждают данные других исследований [23, 24] о том, что часть молекулы GM-CSF, кодируемая вторым экзоном гена, не содержит остатков, вступающих в непосредственный контакт с рецептором. По-видимому, основная роль этой последовательности структурная, и ее удаление приводит к частичной дестабилизации белковой глобулы. На это, в частности, указывает повышенная склонность делеционных вариантов к образованию мультимеров, особенно заметных в результате иммуноблоттинга мутантов D1 и D3 (рис. 3б, дорожки 1, 3).

Взаимодействие IL-4 и IL-2 с рецепторами происходит несколько по-другому. Эти белки совместно с IL-7, IL-9 и IL-15 относятся к подгруппе цитокинов, в состав одного из рецепторов которых входит общая субъединица γ_c [25]. В соответствии с данными моделирования комплексов мутантных вариантов этих белков с рецепторами в результате делеции последовательности, кодируемой вторым экзоном, нарушается их взаимодействие с лигандспецифической α -субъединицей рецептора [21, 22]. Участок связывания с нею на поверхности IL-4 локализован в α -спиралях A, B и C [26, 27], а в молекуле IL-2 включает остатки из петли A–B и начала α -спирали B [28]. В этих случаях появление антагонистических свойств в результате делеции, вероятно, объясняется частичной потерей участка связывания с рецептором в случае IL-2 и значительными изменениями его поверхности в IL-4. При этом полученные мутанты полностью лишены способности стимулировать пролиферацию активированных T-клеток [9, 10]. Таким образом, отличия в расположении рецепторсвязывающих участков α -спиральных

цитокинов приводят к тому, что аналогичные структурные изменения, произведенные в молекулах этих белков, по-разному влияют на их биологические свойства.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали штаммы *E. coli*: XL-1 Blue (*recA1, endA1, gyrA96, thi1, hsdR17, supE44, relA, Δ(lac-proAB), F'proAB, LacI^qZΔM15, Tn10*) фирмы Stratagene; JM101 (*supE, thi, Δ(lac-proAB), F'traD86, proAB, LacI^qZΔM15*) [29].

Олигонуклеотиды (I)–(VI): (5') CTAGAGACACCGCTGCGGAAATGAT (I);

(5') ATCATTTCCGCAGCGGTGTCT (II);

(5') ATCGGAACCGACCTGCCTGCAAACACGTC (III);

(5') TCGAGACGTGTTTGCAGGCAGGTCGGTTCGAT (IV);

(5') CTAGAGACACCGCTGCGGAAATGGAACCG (V) и

(5') TCGAGACGTGTTTGCAGGCAGGTCGGTTCATTTCC (VI)

синтезировали традиционным фосфоамидитным методом на синтезаторе ASM-102U (БИОСЕТ, Новосибирск) и после деблокирования выделяли анионообменной ВЭЖХ как описано в работе [30].

Клонирование рекомбинантных ДНК проводили стандартными методами в клетках *E. coli* XL-1 Blue [31]. Использовали рестриктазы фирмы Fermentas (Литва), ДНК-лигазу и полинуклеотидкиназу, выделенные в лаборатории химии генов ИБХ РАН.

Конструирование генов делеционных вариантов. Для конструирования гена *delta1* ДНК плазмиды pFGM13 [12] обработали совместно рестриктазами *EcoRI* и *XbaI*, а также отдельно *EcoRI* и *EcoRV* и выделили в первом случае большой фрагмент, а во втором – малый. Их лигировали совместно с олигонуклеотидным дуплексом (I) + (II), в результате чего получили плазмиду pFGMd1.

Для получения гена *delta2* олигонуклеотидный дуплекс (III) + (IV) был клонирован между сайтами рестриктаз *EcoRV* и *XhoI* с получением плазмиды pFGMd2.

Для конструирования гена *delta3* ДНК плазмиды pFGM13 обработали совместно рестриктазами *EcoRI* и *XbaI*, а также отдельно рестриктазами *EcoRI* и *XhoI*. При этом в первом случае выделили большой фрагмент, а во втором – малый. Олигонуклеотиды (V) и (VI) фосфорилировали по 5'-концам при помощи полинуклеотидкиназы фага T4 и лигировали с полученными фрагментами. В результате была сконструирована плазида pFGMd3.

Строение плазмид подтверждали рестриктным анализом и определением нуклеотидной последо-

вательности участков ДНК в районе делеций. Секвенирование ДНК проводили по методике и с использованием набора Sequenase v. 2.0 фирмы USB.

Индукцию транскрипции и анализ экспрессии гибридных генов в клетках *E. coli* проводили как описано в работе [12] для плазмид, содержащих ген *gmscf*. Выделение периплазматической фракции после осмотического шока осуществляли по методу работы [32]. Электрофорез белков проводили по Лэммли [33] в 15% SDS-ПААГ. Гели окрашивали красителем кумасси R-250 (Serva).

Для иммуноблотинга [34] разделенные электрофорезом по методу Лэммли белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану BA85 (Schleicher and Schuell). Для окрашивания использовали полученную нами поликлональную антисыворотку кролика к GM-CSF человека. В качестве вторых антител применяли конъюгат иммуноглобулинов козла против иммуноглобулинов кролика (Sigma). Визуализацию комплексов проводили с использованием набора ECL (Amersham).

Рекомбинантные GM-CSF и мутантные белки выделяли в основном как описано в работе [35]. Выход очищенных ренатурированных белков обычно составлял 2–4 мг из 1 г биомассы.

Концентрацию белков определяли при помощи набора Protein Assay (Bio-Rad). Для определения N-концевой последовательности белки после электрофореза в SDS-ПААГ переносили на поливинилиденфторидную мембрану, окрашивали кумасси R-250 и вырезали нужную полосу.

Биологическую активность GM-CSF и мутантов определяли на клетках эритролейкемической линии TF-1 [36], полученных из American Type Culture Collection (CRL-2003), по методу [15]. В качестве контроля использовали рекомбинантный человеческий GM-CSF (Sargramostim Leukine фирмы Immunex), имеющий активность 5×10^7 ед. акт./мг.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ № 00-04-48111 и 00-15-97947. Авторы выражают благодарность И.А. Куделиной за измерение спектров КД и Т.В. Овчинниковой (ИБХ РАН, Москва) за определение N-концевой последовательности белков.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Scarffe J.H. // Eur. J. Cancer. 1991. V. 27. P. 1493–1504.
2. Sakamoto K.M., Golde D.W., Gasson J.C. // J. Pediatrics. 1991. V. 118. P. S17–S20.
3. Nestle F.O., Alijagic S., Gilliet M., Sun Y., Grabbe S., Dummer R., Burg G., Schadendorf D. // Nature Med. 1998. V. 4. P. 328–332.
4. Williamson D.J., Begley C.G., Vadas M.A., Metcalf D. // Clin. Exp. Immunol. 1988. V. 72. P. 67–73.
5. Kato M., Liu M.C., Stealey B.A., Friedman B., Lichtenstein L.M., Permutt S., Schleimer R.P. // Lymphokine Cytokine Res. 1992. V. 11. P. 287–292.

6. Rozwarski D.A., Diederichs K., Hecht R., Boone T., Karplus P.A. // *Proteins*. 1996. V. 26. P. 304–313.
7. Boulay J.-L., Paul W.E. // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. P. 20525–20528.
8. Rozwarski D.A., Gronenborn A.M., Clore G.M., Bazan J.F., Bohm A., Wlodawer A., Hatada M., Karplus P.A. // *Structure*. 1994. V. 2. P. 159–173.
9. Atamas S.P., Choi J., Yurovsky V.V., White B. // *J. Immunol.* 1996. V. 156. P. 435–441.
10. Tsytsikov V.N., Yurovsky V.V., Atamas S.P., Aims W.J., White B. // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. P. 23055–23060.
11. Miyatake S., Otsuka T., Yokota T., Lee F., Arai K. // *EMBO J.* 1985. V. 4. P. 2561–2568.
12. Петровская Л.Е., Крюкова Е.А., Якимов С.А., Вульфсон А.Н., Алибаева Р.А., Гузаев А.А., Абрамов В.М., Коробко В.Г. // *Биоорганическая химия*. 1995. Т. 21. С. 912–919.
13. Петровская Л.Е., Рuzин А.В., Шингарова Л.Н., Коробко В.Г. // *Биоорганическая химия*. 1995. Т. 21. С. 845–854.
14. Rourke A.M., Cha Y., Collins D. // *Biochemistry*. 1996. V. 35. P. 11913–11917.
15. *Cytokines. A Practical Approach* / Ed. F.R. Balkwill. Oxford; New York; Tokyo: IRL Press, 1991. P. 318–321.
16. Gearing D.P., King J.A., Gough N.M., Nicola N.A. // *EMBO J.* 1989. V. 8. P. 3667–3676.
17. Hayashida K., Kitamura T., Gorman D.M., Arai K.I., Yokota T., Miyajima A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1990. V. 87. P. 9655–9659.
18. Shanafelt A.B., Miyajima A., Kitamura T., Kastelein R.A. // *EMBO J.* 1991. V. 10. P. 4105–4112.
19. Hercus T.R., Bagley C.J., Cambareri B., Dottore M., Woodcock J.M., Vadas M.A., Shannon M.F., Lopez A.F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994. V. 91. P. 5838–5842.
20. Brown C.B., Pihl C.E., Kaushansky K. // *Eur. J. Biochem.* 1994. V. 225. P. 873–880.
21. Zav'yalov V.P., Denesyuk A.I., White B., Yurovsky V.V., Atamas S.P., Korpela T. // *Immunol. Lett.* 1997. V. 58. P. 149–152.
22. Denesyuk A.I., Zav'yalov V.P., Denessiouk K.A., Korpela T. // *Immunol. Lett.* 1998. V. 60. P. 61–66.
23. Shanafelt A.B., Johnson K.E., Kastelein R.A. // *J. Biol. Chem.* 1991. V. 266. P. 13804–13810.
24. Hama A., Cadieux C., Wilkes B., Hercus T., Lopez A., Clark S., Hoang T. // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. P. 34155–34163.
25. Kondo M., Takeshita T., Ishii N., Nakamura M., Watanabe S., Arai K., Sugamura K. // *Science*. 1993. V. 262. P. 1874–1877.
26. Kruse N., Shen B.-J., Arnold S., Tony H.-P., Muller T., Sebald W. // *EMBO J.* 1993. V. 12. P. 5121–5129.
27. Hage T., Sebald W., Reinemer P. // *Cell*. 1999. V. 97. P. 271–281.
28. Zurawski S.M., Vega F., Doyle E.L., Huyghe B., Flaherty K., McKay D.B., Zurawski G. // *EMBO J.* 1993. V. 12. P. 5113–5119.
29. Janisch-Perron C., Vieira J., Messing J. // *Gene*. 1985. V. 33. P. 103–119.
30. Гуревич А.И., Качалина Т.А., Каюшин А.Л., Коростелева М.Д., Мирошников А.И. // *Биоорганическая химия*. 1993. Т. 19. С. 629–632.
31. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование: Пер. с англ. М.: Мир, 1984.
32. Ducancel F., Boulain J.-C., Tremeau O., Menez A. // *Prot. Engineering*. 1989. V. 3. P. 139–143.
33. Laemmli U.K. // *Nature*. 1970. V. 227. P. 680–685.
34. Towbin H., Strahelin T., Gordon J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1979. V. 76. P. 4350–4354.
35. DeLamarter J.F., Mermod J.J., Liang C.M., Eliason J.F., Thatcher D.R. // *EMBO J.* 1985. V. 4. P. 2575–2581.
36. Kitamura T., Tange T., Terasawa T., Chiba S., Kuwaki T., Miyagawa K., Piao Y.F., Miyazono K., Urabe A., Takaku F. // *J. Cell Physiol.* 1989. V. 140. P. 323–334.

Deletion Mutants of Human Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor

L. E. Petrovskaya*[#], E. A. Kryukova*, A. L. Kayushin*,
A. V. Rodina**[#], E. Yu. Moskaleva**[#], and V. G. Korobko*[†]

[#]Phone: +7 (095) 330-6983; e-mail: lpetr@mail.ibch.ru

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

** All-Russia Scientific Center of Molecular Diagnostics and Therapy, Moscow

To study the structure-function relationship of the human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), genes were constructed that encode its three deletion mutants: D1, a mutant with the deletion of six amino acid residues (37–42) some of which are a part of a β -structural region; D2, a mutant with the deletion of the unstructured six-aa sequence of a loop (45–50); and D3, a mutant with the deletion of 14 aa residues (37–50) corresponding to the A-B loop and encoded by the second exon of the *gmcsf* gene. The expression products of these genes in *E. coli* were accumulated in a fraction of insoluble proteins. The secondary structures of the mutant proteins were similar to that of the full-size GM-CSF, but the biological activity of the deletion mutants was 130 times lower than that of the GM-CSF: they stimulated the proliferation of the TF-1 cell line at 3 ng/ml concentration. The resulting proteins displayed antagonistic properties toward the full-size GM-CSF, with the inhibition degree of its colony-stimulating activity being 27%. A decrease in the mutant activity in the row D2 > D1 > D3 implies the importance of the conserved hydrophobic residues involved in the formation of the β -structure for the formation of the GM-CSF functional conformation. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2002, vol. 28, no. 5; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: alpha-helical cytokines, antagonism, deletion variants, expression in *E. coli*, GM-CSF