



УДК 577.112.017

ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА ПЕПТИДНЫХ ФРАГМЕНТОВ ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ ЧЕЛОВЕКА

© 2010 г. Л. Н. Шингарова^{*,#}, Л. Е. Петровская^{*}, А. Н. Некрасов^{*}, Е. А. Крюкова^{*}, Е. Ф. Болдырева^{*}, С. А. Якимов^{*}, С. В. Гурьянова^{*}, Д. А. Долгих^{*}, М. П. Кирпичников^{*,**}

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

^{**} Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва

Поступила в редакцию 02.10.2009 г. Принята к печати 05.11.2009 г.

Фактор некроза опухолей (TNF) — провоспалительный цитокин, играющий важную роль в регуляции иммунной системы человека. Получены гены гибридных белков SD1–SD4, включающих пептиды D1–D4, которые соответствуют отдельным элементам информационной структуры TNF. Сконструирована высокоэффективная система экспрессии полученных генов в клетках *Escherichia coli*. Показано, что гибридные белки SD2 и SD4 склонны к образованию высокомолекулярных агрегатов, которые разрушаются при обработке мочевиной. Выделенные пептиды D1 – TNF-(3–30), D3 – TNF-(86–114) и D4 – TNF-(115–137) обладают сходной вторичной структурой с преобладанием бета-структурных элементов. Анализ их биологической активности показал отсутствие цитотоксичности на клетках мышечных фибробластов L929. Совместное добавление пептида D1 с TNF обеспечивает зависимое от концентрации снижение цитотоксичности TNF по отношению к этим клеткам.

Ключевые слова: фактор некроза опухолей, экспрессия в *E. coli*, информационная структура, пептиды, цитотоксичность.

ВВЕДЕНИЕ

Фактор некроза опухолей (TNF) — полифункциональный цитокин, участвующий в регуляции важнейших физиологических процессов (противоопухолевого иммунитета, пролиферации клеток иммунной системы, апоптоза и др.) [1, 2]. Он синтезируется преимущественно активированными макрофагами, Т-лимфоцитами и естественными киллерами. TNF является одним из основных медиаторов воспалительных процессов в организме человека. Повышение его концентрации характерно для таких патологических состояний, как ревматоидный артрит, псориаз, болезнь Крона, септический шок, рассеянный склероз и другие. В настоящее время в клинической практике для нейтрализации TNF широко применяются рекомбинантные моноклональные антитела (инфликсимаб и адалимумаб), а также гибридный белок, включающий внеклеточный домен рецептора TNF (этанерцепт) [3], однако использование этих препаратов достаточно дорого в силу вы-

соких затрат на производство и может сопровождаться рядом побочных эффектов. Таким образом, дальнейший поиск различных антагонистов TNF является перспективным направлением белковой инженерии и биотехнологии.

Биологически активной формой TNF является его тример, состоящий из одинаковых субъединиц с молекулярной массой 17 кДа [4]. Существуют два типа рецепторов TNF, TNFR1 (p55) и TNFR2 (p75), которые обладают примерно одинаковым сродством к TNF [5]. Установлено, что образование комплексов TNF с тем или другим рецептором приводит к активации разных сигнальных путей и соответственно опосредует разные виды биологической активности TNF [6]. Структурно-функциональные исследования молекулы TNF, направленные на создание рецептор-селективных мутантов и антагонистов, могут способствовать получению новых вариантов белка для клинического использования [7, 8]. В ряде работ высказывалось предположение о том, что определенные пептидные фрагменты TNF могут быть ответственны за его отдельные биологические активности. В частности, было обнаружено, что синтетические пептиды, соответствующие последовательностям TNF 43–68 и 132–150, обладают цитотоксическим действием на опухолевые клетки, а пептид с последовательностью 54–94 стимулирует активность нейтрофилов [9]. Впоследствии была продемонстрирована возможность использования

Сокращения: IPTG — изопропил-β-D-тиогаляктопиранозид; MTT — 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолий бромид; PMSF — фенолметилсульфонилфторид; SUMO — небольшой убиквитинподобный белок (small ubiquitin-related modifier); TNF — фактор некроза опухолей (tumor necrosis factor); TNFR — рецептор TNF; АНИС — анализ информационной структуры белков; ЭЛИС — элементы информационной структуры белков.

[#] Автор для связи (тел.: (495) 330-69-83; эл. почта: lshing@mx.ibch.ru).

небольшого фрагмента этой последовательности (TNF-(70–80)) для борьбы с микобактериальной инфекцией в мышинной модели туберкулеза [10]. В другой работе показана активация хемотаксиса фибробластов при использовании пептида TNF-(31–68) [11].

Мы предположили, что определенные фрагменты TNF могут проявлять свойства его антагонистов. С целью планирования аминокислотной последовательности фрагментов TNF для последующей экспрессии в бактериях был проведен анализ его информационной структуры с помощью метода АНИС (анализ информационной структуры; <http://anis.ibch.ru/trees>). Этот метод позволяет на основе данных о первичной структуре белка строить систему иерархически организованных ЭЛИС (элементов информационной структуры) [12]. Предполагается, что каждому из ЭЛИС соответствует в первичной структуре белка определенный сайт, характеризующийся устойчивой пространственной организацией. Показано, что удаление фрагментов последовательности, соответствующих ЭЛИС высшего ранга, позволяет получать функционально активные укороченные формы белков [13, 14]. В данной работе пептиды, соответствующие отдельным элементам информационной структуры TNF, были получены при помощи системы экспрессии в составе гибридных белков в клетках *Escherichia coli*, и их свойства изучены в тестах на цитотоксичность по отношению к клеткам линии мышинных фибробластов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение биологических свойств пептидов-фрагментов белков является традиционным методом исследования связи между структурой и функциями полной молекулы белка. Для выбора фрагментов чаще всего используется информация о границах элементов пространственной структуры белков [9, 11]. Однако такая информация не всегда доступна и, кроме того, указанный подход не учитывает особенностей формирования структуры белковых молекул, которое может определяться соседними участками последовательности. Применение с целью выбора фрагментов метода АНИС [12] позволяет, исходя только из данных об аминокислотной последовательности белка, вычленивать пептидные фрагменты, первичная структура которых характеризуется более высоким уровнем координации между аминокислотными остатками, сложившимся в процессе молекулярной эволюции белковой последовательности. Мы предполагаем, что такой подход повышает вероятность получения структурно устойчивых фрагментов белка, отвечающих за отдельные функциональные характеристики белковой молекулы.

Анализ информационной структуры TNF с помощью метода АНИС позволил установить наличие

в ней четырех ЭЛИС высшего ранга, границами между которыми являются остатки N30, S86, W114 (рис. 1а). В соответствии с этими данными, было запланировано получение следующих пептидов: D1 (фрагмент 3–30), D2 (31–85), D3 (86–114) и D4 (115–157) (рис. 1б). Для конструирования кодирующих их последовательностей методом ПЦР мы использовали в качестве матрицы плазмидную ДНК pTNF331 [15], которая содержит ген человеческого TNF, укороченного с N-конца на два аминокислотных остатка (TNF-(3–157)). Установлено, что удаление нескольких N-концевых остатков (вплоть до семи) способствует повышению цитотоксической активности TNF [16].

Поскольку прямая экспрессия коротких пептидов в бактериальной системе часто оказывается неэффективной из-за протеолитической дегградации в цитоплазме клеток [17], их получают в составе гибридных белков. В качестве белков-партнеров используют тиоредоксин, связывающий мальтозу белок, глутатион-S-трансферазу и др. [18]. Нами была выбрана система экспрессии с использованием в качестве партнера белка SUMO из *Saccharomyces cerevisiae*. Этот небольшой полипептид (M 11.3 кДа), относящийся к семейству убиквитина, обладает стабильной компактной структурой. Показано, что совместная экспрессия с SUMO способствует повышению растворимости и увеличению выхода гибридных белков в клетках *E. coli*, кроме того, использование высокоспецифичной SUMO-протеиназы *S. cerevisiae* облегчает последующее расщепление гибридного белка и очистку целевого полипептида [19]. Немаловажным является и тот факт, что отщепленная целевая молекула сохраняет нативную N-концевую последовательность [19].

С целью экспрессии пептидов D1–D4 в виде гибридов с SUMO мы сконструировали при помощи ПЦР четыре гибридных гена *SD1–SD4*, в которых последовательность гена *Smt3*, кодирующего белок SUMO, объединена с нуклеотидными последовательностями, кодирующими каждый из ЭЛИС TNF (рис. 2а). На 5'-конце каждого из гибридных генов расположена последовательность, кодирующая гексагистидиновый фрагмент, для последующей очистки гибридных белков при помощи металлоаффинной хроматографии. Полученные гены были клонированы в вектор на основе pET32a (Novagen) под контролем сильного регулируемого промотора *T7lac*.

Все сконструированные нами гены характеризуются высоким уровнем экспрессии в клетках бактерий (до 20% общего клеточного белка, рис. 2б), при этом большая часть продуктов экспрессии находится в растворимой форме. Для выделения очищенных гибридных белков SD1–SD4 из фракции растворимых клеточных белков был использован метод Ni-аффинной хроматографии. При изучении состава фракций, полученных в результате хрома-

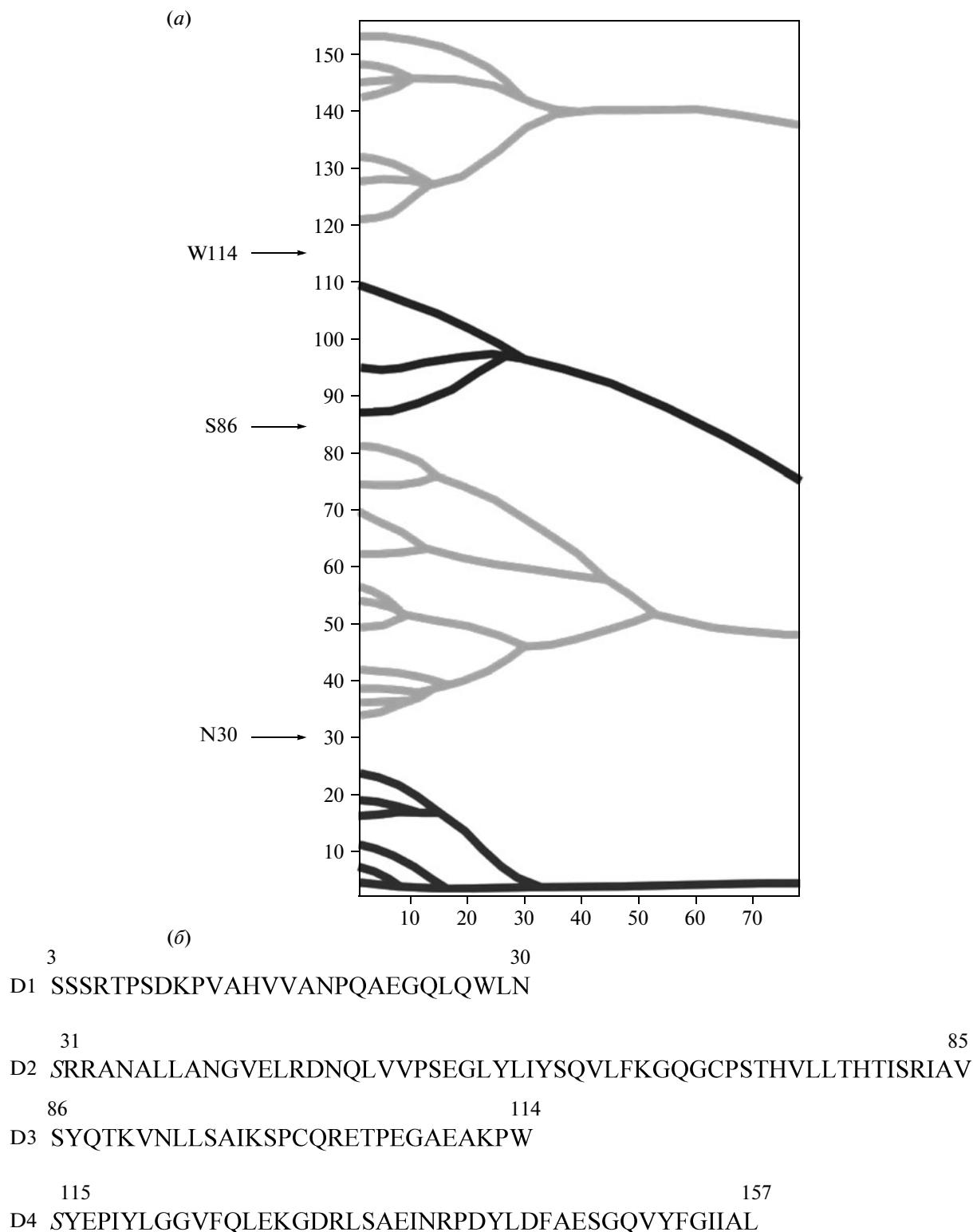


Рис. 1. Анализ информационной структуры TNF по методу АНИС [12]. *a* – Диаграмма информационной структуры TNF. ЭЛИС высшего ранга изображены различными оттенками серого, а их границы отмечены стрелками. По горизонтальной оси – $p/2$ (полуширина участка последовательности, для которого проводился расчет), по вертикальной оси – номера аминокислотных остатков в последовательности белка. *б* – Аминокислотные последовательности пептидов D1–D4, соответствующих ЭЛИС высшего ранга: наклонным шрифтом обозначены N-концевые остатки серина, не являющиеся частью последовательности TNF и возникающие в результате использования сайта BamHI для клонирования.

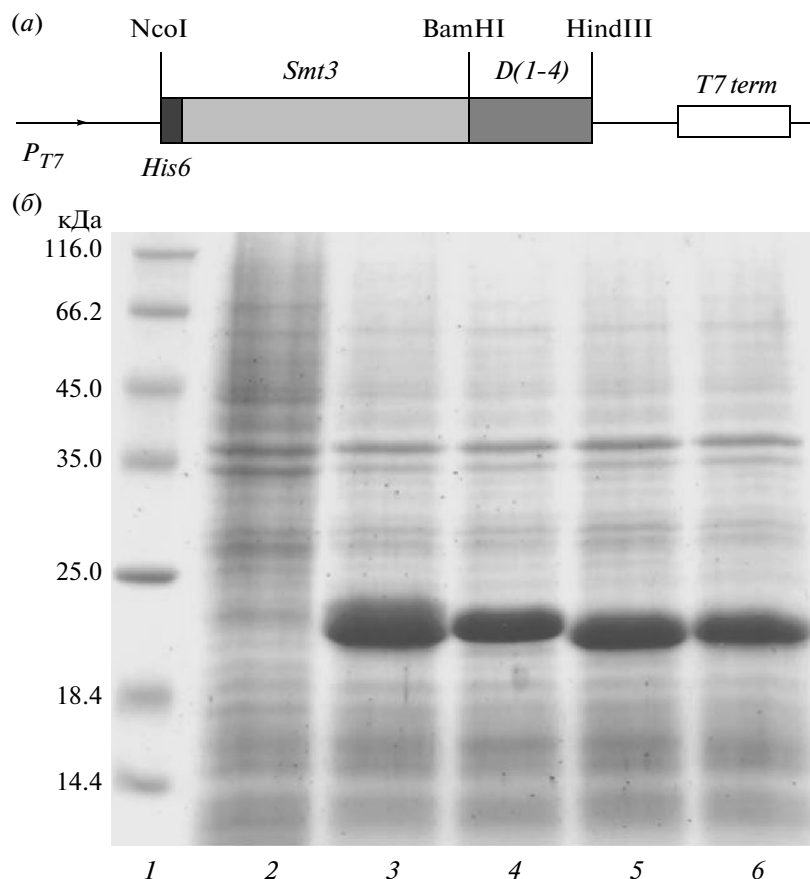


Рис. 2. Экспрессия гибридных генов *SD1–SD4*. *a* – Схематическое изображение гибридных генов *SD1–SD4* с прилегающими регуляторными элементами. *б* – Гель-электрофорез в 13% ПААГ по Лэммли суммарного клеточного белка штамма BL21(DE3) без плазмиды (2), трансформированного плазмидами pSD1 (3), pSD2 (4), pSD3 (5), pSD4 (6), после индукции IPTG. 1 – Стандарты молекулярной массы белков (Fermentas).

тографии, при помощи гель-электрофореза было установлено, что большая часть гибридов SD2 и SD4 не связывается с сорбентом, возможно, из-за образования высокомолекулярных агрегатов. Это предположение подтвердилось при последующем анализе очищенного гибридного белка SD4 методом аналитической гель-фильтрации на предварительно откалиброванной колонке Superdex 200 (рис. 3а). Наблюдаемое время выхода пиков составило 21 и 42 мин, что соответствует белкам, имеющим молекулярную массу около 700 и 30 кДа соответственно. Поскольку расчетная молекулярная масса SD4 составляет 17 кДа, в составе изученного образца, по-видимому, обнаруживается смесь димеров гибридного белка и продуктов его агрегации.

Для того чтобы установить причину этого явления, аминокислотная последовательность TNF была исследована при помощи программы TANGO (<http://tango.crg.es>, [20]) с целью определения потенциала агрегации фрагментов D1–D4. При этом оказалось, что наибольшим потенциалом агрегации (93%) обладает последовательность LYLIYSQVLF (фрагмент 55–64), входящая в состав пептида D2,

несколько меньшим – VIFGIIA (150–156), которая является частью D4 (67%) (рис. 3б).

Известно, что образование бета-агрегатов (амилоидов) – широко распространенный биологический процесс. Амилоидные фибриллы возникают в результате неправильного сворачивания белков и сопровождают развитие более чем 20 заболеваний, в том числе болезни Альцгеймера, болезни Крейтцфельда-Якоба и др. Для их структуры характерно наличие бета-складчатой упаковки, при которой бета-складки располагаются перпендикулярно оси полимера [21]. Показано, что в определенных условиях амилоиды могут образовываться самыми разнообразными белками и пептидами, не связанными с патологическими состояниями [22, 23].

Несмотря на отсутствие гомологии аминокислотных последовательностей у полипептидов, способных к образованию амилоидов, их характеризуют некоторые общие черты, в частности, склонность к формированию неправильно свернутых вариантов [24]. Последовательности (55–64) и (150–156), обладающие максимальным потенциалом агрегации, в полном размере TNF являются соответственно ча-

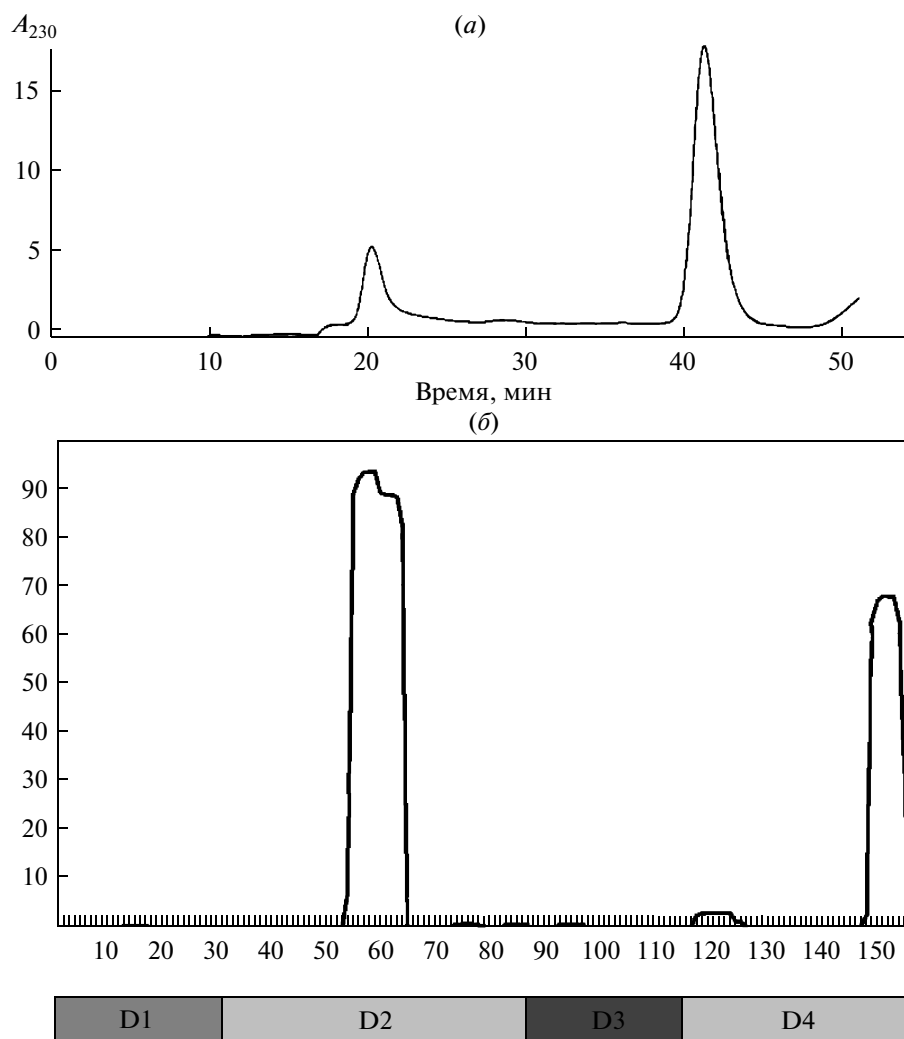


Рис. 3. Анализ агрегации гибридных белков, включающих пептидные фрагменты TNF. *a* – Гель-фильтрация выделенного гибридного белка SD4 на колонке Superdex 200. *б* – Результаты расчета потенциала агрегации TNF с помощью программы TANGO. По горизонтальной оси – номер аминокислотного остатка, по вертикальной оси – потенциал агрегации.

стью с- и h-бета-тяжей, которые входят в гидрофобное ядро белка и располагаются в центральной части тримера [4]. Мы предполагаем, что в результате экспрессии этих фрагментов белка в изолированном виде нарушается процесс фолдинга бета-структурных элементов, что приводит к формированию высокомолекулярных бета-агрегатов.

С целью разрушения агрегатов протокол выделения был модифицирован, и впоследствии очистку всех гибридных белков SD1–SD4 проводили в присутствии мочевины. Использование денатурирующего агента позволило получить очищенные гибридные белки в достаточных количествах для дальнейших исследований. Однако при попытке расщепления гибридного белка SD2 SUMO-протеиназой в реакционной смеси спустя некоторое время после добавления фермента наблюдалось обра-

зование осадка. Анализ белкового состава реакционной смеси после центрифугирования показал, что в растворимой фракции обнаруживается только SUMO, в то время как отщепленный пептид D2 находится исключительно в осадке. Применение различных добавок, способствующих повышению растворимости белков (глицерина, сахарозы, глицина, аргинина), не дало результатов. Таким образом, нам не удалось получить пептид D2 в изолированном виде, вероятно, в силу чрезвычайно высокой склонности данного фрагмента TNF к образованию высокомолекулярных агрегатов.

Пептиды D1, D3, D4 были выделены в чистом виде в результате расщепления гибридных белков SUMO-протеиназой и повторной металлоаффинной хроматографии на Ni-Sepharose для очистки от SUMO и нерасщепленного гибрида (рис. 4). Время

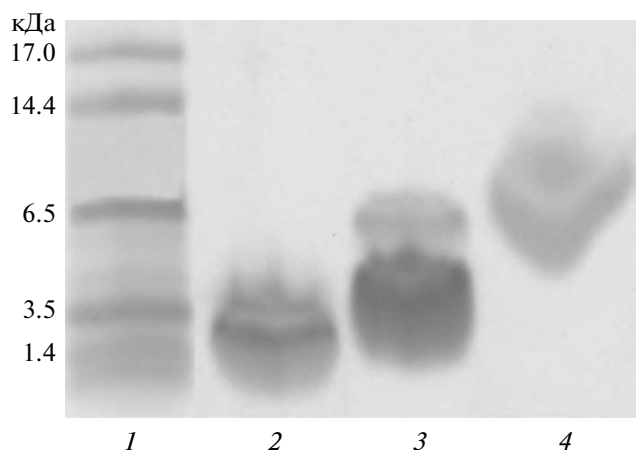


Рис. 4. Гель-электрофорез в 16% ПААГ в Трис-трициновом буфере очищенных пептидов D1 (2), D3 (3), D4 (4). 1 – Стандарты молекулярной массы белков (BioRad).

выхода пиков этих пептидов при аналитической гель-фильтрации (48 мин) соответствует мономерному состоянию, а молекулярные массы совпадают с расчетными данными, что подтверждено масс-спектрометрическим анализом (данные не приведены). Таким образом, экспрессия целевых пептидов в составе гибридов с белком SUMO позволила получить высокоочищенные пептидные фрагменты TNF в достаточных количествах для дальнейших исследований.

Вторичную структуру пептидов D1, D3, D4 исследовали при помощи спектроскопии кругового

дихроизма (рис. 5). Обработка полученных данных показала, что изученные пептиды обладают сходной вторичной структурой и содержат 36–40% неупорядоченной структуры, 29–34% бета-слоя и 22–23% бета-поворотов (таблица). Эти результаты соответствуют результатам исследования пространственной структуры TNF с помощью PCA [4], согласно которым вторичная структура TNF представлена преимущественно бета-структурными элементами (47%).

Для исследования биологической активности полученных пептидов использовали стандартный тест на цитотоксичность TNF по отношению к мышинным фибробластам линии L929. Различные разведения пептидов D1, D3, D4 (0–100 нг/мл) добавляли к клеткам, измеряя жизнеспособность последних по степени связывания красителя МТТ. В качестве контроля использовали рекомбинантный человеческий TNF, ранее выделенный в лаборатории. В этом эксперименте было установлено, что ни один из пептидов в исследованном диапазоне не обладает собственной цитотоксичностью (данные не приведены).

В следующем эксперименте изучалась способность выделенных пептидов подавлять вызванную полноразмерным TNF цитотоксичность. С этой целью клетки L929 культивировали в присутствии смеси полноразмерного TNF в различных разведениях и пептидов D1, D3, D4. Смеси предварительно инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре. В данном случае обнаружилось, что пептиды D3 и D4 не влияют на активность добавленного вместе с ними TNF, а избыток D1 снижает его цитотоксичность

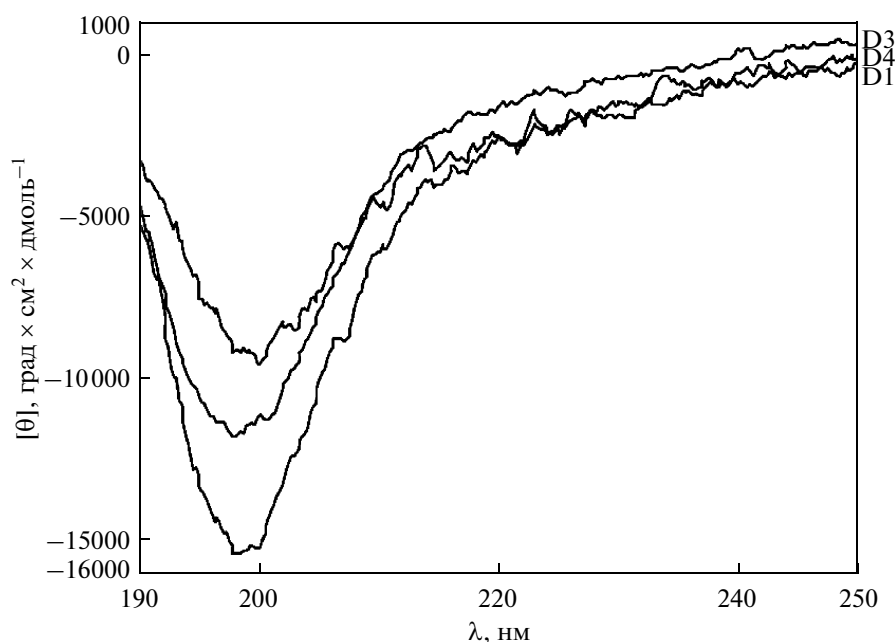


Рис. 5. Спектры КД пептидов D1, D3, D4. Концентрация пептидов – D1 – 0.30; D3 – 0.56; D4 – 0.23 мг/мл.

ское действие, причем степень снижения зависит от концентрации пептида (рис. 6). При добавлении пептида D1 в молярном соотношении 20 : 1 наблюдалось повышение концентрации TNF, при которой происходит 50%-ное снижение выживаемости клеток, с 0.07 до 0.17 нг/мл, т.е. в 2.4 раза. Если же использовали 50-кратный молярный избыток пептида, эта концентрация увеличивалась до 1 нг/мл, т.е. в 14.3 раза.

Таким образом, в используемом тесте полученный нами пептид D1 (TNF-(3–30)) проявляет свойства антагониста TNF. Такой эффект может быть обусловлен различными причинами, в частности, образованием комплекса с участием пептида и TNF, или пептида и рецептора TNFRI, что препятствует взаимодействию полноразмерного белка с рецептором и запуску сигнального каскада. Кроме того, показано, что некоторые мутанты TNF, собственная биологическая активность которых значительно снижена, могут образовывать неактивные тримеры с участием природного цитокина. При этом 20-кратный избыток таких “доминантнегативных” мутантов обеспечивает практически полное подавление активности TNF в клеточных тестах *in vitro* [26]. Наконец, снижение цитотоксичности TNF можно было бы объяснить диссоциацией тримера на неактивные субъединицы в результате связывания пептида. Однако исследование смеси TNF с пептидом D1 методом аналитической гель-фильтрации показало, что подвижности отдельных компонентов в составе смеси не изменяются и соответствуют тримерной форме TNF и мономерной форме D1 (данные не приведены). Следовательно, наиболее вероятным механизмом воздействия пептида D1 на опосредованную TNF цитотоксичность является образование комплекса с рецептором TNF.

Известно, что человеческий TNF взаимодействует с мышинным рецептором TNF только I типа (mTNFRI) [27]. Таким образом, цитотоксическое действие TNF на клетки линии мышинных фибробластов L929 опосредуется запуском сигнального каскада именно этим рецептором. При анализе пространственной структуры комплекса TNF с TNFRI установлено, что поверхность взаимодействия двух белков имеет сложное строение и включает участки молекулы TNF в местах контакта субъединиц в основании тримера [28]. Согласно этим данным и результатам сайт-направленного мутагенеза молекулы TNF [29, 30], один из таких участков расположен в N-концевой части белка и формируется остатками 29–36, образующими петлю на поверхности цитокина. Протяженные (более семи остатков) делеции N-концевой последовательности TNF [16] или ее отщепление в результате ограниченного протеолиза [31] приводят к заметному снижению цитотоксической активности белка. Можно предположить, что пептид D1, в состав которого входит часть этой последовательности, обладает способностью взаимо-

Результаты расчета вторичной структуры пептидов D1, D3, D4 при помощи программы Continll [25]

Пептид	α -спираль, %	β -слой, %	β -поворот, %	Неупорядоченная структура, %	NRMSD*
D1	7.6	29.3	23	40.1	0.034
D3	5.9	33.7	22.3	38	0.035
D4	6.8	34.2	22.6	36.5	0.061

*NRMSD – среднеквадратичное отклонение, нормализованное на количество точек.

действовать с mTNFRI, таким образом, его избыток препятствует связыванию полноразмерного белка.

Относительно невысокая антагонистическая активность данного пептида по сравнению с искусственными “доминантнегативными” мутантами TNF [26], возможно, объясняется его мономерной формой. Установлено, что искусственное повышение avidности путем мультимеризации некоторых мономерных лигандов семейства TNF и TNF-связывающих белков приводит к увеличению их биологической активности [32, 33]. В таком случае три- или мультимеризация пептида D1 за счет добавления специфических аминокислотных последовательностей [32–34] могла бы способствовать повышению avidности по отношению к TNFRI и открыть возможности его практического использования для нейтрализации избыточного количества TNF в организме.

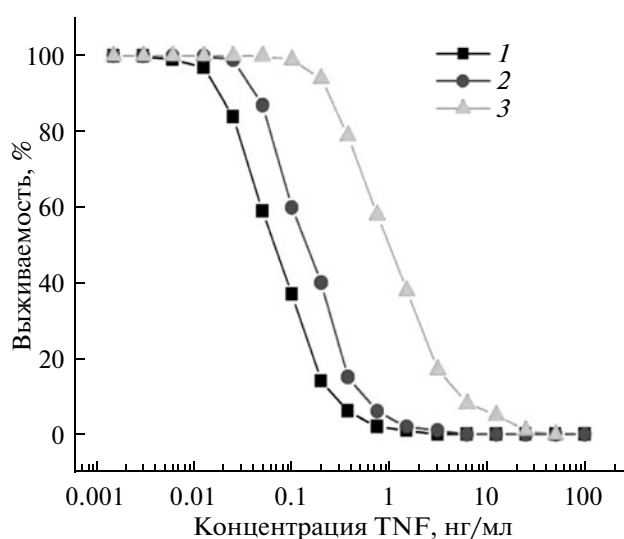


Рис. 6. Цитотоксическое действие TNF (1) и TNF в смеси с пептидом D1 в соотношении 1 : 20 (2), 1 : 50 (3) на клетки L929.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали реактивы фирм Bio-Rad, Sigma, Merck (США), Panreac (Испания), компоненты сред для культивирования бактерий Difco (США), полную среду 199, эмбриональную телячью сыворотку и DMSO (Биолот, Россия). Растворы готовили на деионизованной воде MilliQ.

Анализ информационной структуры TNF проводили при помощи метода АНИС (<http://anis.ibch.ru/trees>) как описано в работе [13].

Клонирование рекомбинантных ДНК осуществляли стандартными методами [35] в клетках *E. coli* XL-1 Blue (Stratagene). Использовали ферменты производства "Fermentas" (Литва). Олигонуклеотиды синтезированы фирмой "Евроген". Амплификацию генов с помощью ПЦР проводили с использованием *Pfu*-полимеразы в условиях, рекомендованных производителем фермента. Параметры ПЦР: 3 мин денатурации матрицы при 95°C; 25 циклов (денатурация 95°C 45 с, отжиг праймеров 52–55°C 45 с, элонгация 72°C 45 с); достройка 72°C 5 мин.

Для получения плазмиды pSD1 ген *Smt3*, кодирующий белок SUMO, амплифицировали на матрице геномной ДНК *S. cerevisiae* (из коллекции лаборатории) с использованием праймеров (5'–3'): ATATACCATGGGTCATCACCATCATCATCACGGGTCGGACTCAGAAGTCAATC (Sumd) и TATATGGATCCACCAATCTGTTCCGCG (Sumr).

Фрагмент гена TNF, кодирующий первый ЭЛИС (пептид D1), получали путем амплификации ДНК плазмиды pTNF331 [15] с помощью праймеров (5'–3'):

D1d ATATAGGATCCTCGAGCCGAACCCC и

D1r ATATTAAGCTTAGTTCAGCCACTGGAGC.

После обработки рестриктазами NcoI и BamHI в случае гена *Smt3* и BamHI и HindIII в случае гена *D1* и очистки в 1% агарозном геле они были совместно клонированы в вектор, полученный путем обработки ДНК плазмиды pET32N (ранее полученная нами модификация плазмиды pET32a (Novagen), содержащая сайт рестриктазы NcoI) рестриктазами NcoI и HindIII. В результате была сконструирована плаزمиды pSD1, содержащая гены *Smt3* и *D1* в единой рамке считывания.

Для клонирования фрагментов ДНК, соответствующих ЭЛИС 2-4, проводили ПЦР на матрице ДНК плазмиды pTNF331 в тех же условиях с праймерами (5'–3'):

D2d ATATAGGATCCCCGCCGGGCAATGC и

D2r ATATTAAGCTTAGACGGCGATGCGGCT (для получения D2),

D3d ATATAGGATCCTACCAGACCAAGGTC и

D3r ATATTAAGCTTACCAGGGCTTGGCCTCA (для получения D3),

D4d ATATAGGATCCTATGAGCCCATCTATCTG и

D4r ATATTAAGCTTACAGGGCAATGATCCCAA (для получения D4).

Фрагменты обрабатывали рестриктазами BamHI и HindIII и после очистки клонировали по отдельности в вектор, полученный в результате обработки ДНК плазмиды pSD1 рестриктазами BamHI и HindIII и выделения большого фрагмента. В результате были сконструированы плазмиды pSD2-4. Строение плазмид подтверждали рестриктым анализом и секвенированием (ЦКП «Геном»).

Выделение белков. Клетки штамма *E. coli* BL21(DE3) (Novagen), трансформированные pSD1, pSD2, pSD3 или pSD4, выращивали в 200 мл LB с ампициллином (100 мкг/мл) при 37°C до A_{560} 0.5–0.7 и индуцировали добавлением 0.2 мМ IPTG, после чего продолжали культивирование в течение 3 ч. Биомассу после центрифугирования суспендировали в буфере А (50 мМ Трис-НСl, рН 8.0, 1 мМ PMSF, 200 мМ NaCl) и разрушали клетки обработкой ультразвуком. При выделении белков SD2 и SD3 на всех стадиях в буфер добавляли 10 мМ β-меркаптоэтанол. Осадок после центрифугирования промывали буфером А, содержащим 1 мМ EDTA и 1 М мочевины, и растворяли в 10 мл буфера В (20 мМ Трис-НСl, рН 8.0, 200 мМ NaCl, 6 М мочевины) в течение 16 ч при комнатной температуре при перемешивании. Раствор центрифугировали, к супернатанту добавляли имидазол до 10 мМ и наносили на колонку Ni-Sepharose FastFlow (GE Healthcare), уравновешенную этим же буфером, промывали буфером D (20 мМ Трис-НСl, рН 8.0, 6 М мочевины, 0.5 М NaCl, 20 мМ имидазол), затем тем же буфером с понижающейся концентрацией мочевины и элюировали буфером без мочевины, содержащим 300 мМ имидазол. Фракции, содержащие гибридный белок, объединяли, после чего дважды диализовали против буфера E (20 мМ Трис-НСl, рН 8.0, 50 мМ NaCl). При необходимости препарат концентрировали в ячейке Amicon с мембраной YM10. К раствору белка после центрифугирования добавляли раствор протеиназы ULP (ранее получена в лаборатории по методу [19]) из расчета 1 мкг ULP на 0.5 мг гибридного белка и инкубировали в течение 16 ч при 4°C при перемешивании. Полноту расщепления проверяли анализом аликвоты реакционной смеси при помощи гель-электрофореза по Лэммли, после чего проводили повторную хроматографию на Ni-Sepharose FastFlow. Собирали проскок и фракции, полученные в результате промывки колонки буфером E. Очищенные пептиды анализировали гель-электрофорезом в Трис-трициновом буфере [36].

Концентрацию гибридных белков определяли при помощи реагента Protein Assay (Bio-Rad). Концентрацию пептидов рассчитывали с использованием индивидуальных молярных коэффициентов поглощения на основании результатов измерения поглощения при 280 нм. Выход очищенных пептидов обычно составлял 2–4 мг из 1 г биомассы.

Аналитическую гель-фильтрацию проводили на колонке Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare) при скорости потока 0.4 мл/мин в буфере 100 мМ Трис-НСl, рН 8.0, 150 мМ NaCl. Детекцию осуществляли путем измерения поглощения в УФ-области при длине волны 230 нм.

КД-спектры пептидов D1–D4 измеряли без концентрирования непосредственно после очистки с использованием спектрополяриметра Jasco-810 (Япония) с шагом 0.2 нм в кюветах с длиной оптического пути 0.1 мм в буфере 20 мМ Трис-НСl, рН 8.0, 50 мМ NaCl. В случае пептида D3 буфер содержал 10 мМ β-меркаптоэтанол. Расчет вторичной структуры проводили с использованием программы Continll [25].

Определение цитотоксической активности TNF и пептидов проводили в стандартном тесте на линии L929 фибробластов мыши как описано в работе [37]. Клетки L929 (2×10^4) помещали в лунки 96-луночных планшетов (Nunc) в 100 мкл полной среды 199, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки и инкубировали 18 ч. Затем удаляли среду и к монослою клеток добавляли по 100 мкл полной среды, содержащей двукратные разведения TNF (от 1 мкг/мл до 0.1 пг/мл) с актиномицином D (1 мкг/мл) и инкубировали при 37° в CO₂-инкубаторе. Через 18 ч в каждую лунку добавляли по 10 мкл раствора МТТ в PBS (5 мг/мл) и инкубировали 2.5 ч. По истечении указанного времени супернатант удаляли, к оставшимся клеткам добавляли 100 мкл DMSO, оптическое поглощение измеряли при 540 нм на приборе Titertek Multiskan MCC (Flow Laboratories). Выживаемость клеток вычисляли по формуле $C = B : A \times 100\%$, где *A* и *B* – светопоглощение в контрольной и в тестируемой лунке. Измерения проводили в четырех повторах.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность О. Самсоновой (ИБХ РАН) за снятие и обработку спектров КД. Работа проводится при финансовой поддержке грантов НШ-2231.2008.4 и НШ-5207.2010.4, программы РАН «Молекулярная и клеточная биология» и федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Vilcek J., Lee T.H.* // J. Biol. Chem. 1991. V. 266. P. 7313–7316.
2. *Efimov G.A., Kruglov A.A., Tillib S.V., Kuprash D.V., Nedospasov S.A.* // Mol. Immunol. 2009. V. 47. P. 19–27.
3. *Feldmann M.* // Nat. Rev. Immunol. 2002. V. 2. P. 364–371.
4. *Eck M.J., Sprang S.R.* // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. P. 17595–17605.
5. *Tartaglia L.A., Weber R.F., Figari I.S., Reynolds C., Palladino M.A., Jr., Goeddel D.V.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991. V. 88. P. 9292–9296.
6. *Kruglov A.A., Kuchmiy A., Grivennikov S.I., Tumanov A.V., Kuprash D.V., Nedospasov S.A.* // Cytokine Growth Factor Rev. 2008. V. 19. P. 231–244.
7. *Fujita T., Nakagawa S., Yamamoto A., Ohta T., Hayakawa T., Mayumi T., Vandenberg P., Aggarwal B.B., Nakamura T., Yamagata Y., Tsunoda S., Kamada H., Tsutsumi Y.* // J. Biol. Chem. 2008. V. 283. P. 998–1007.
8. *Shibata H., Yoshioka Y., Ohkawa A., Minowa K., Mukai Y., Abe Y., Tani M., Nomura T., Kayamuro H., Nabeshi H., Sugita T., Imai S., Nagano K., Yoshikawa T., Mukai Y., Shibata H., Nakamura T., Yoshioka Y., Abe Y., Nomura T., Tani M., Ohta T., Ikemizu S., Nakagawa S., Tsunoda S., Kamada H., Yamagata Y., Tsutsumi Y.* // J. Mol. Biol. 2009. V. 385. P. 1221–1229.
9. *Rathjen D.A., Ferrante A., Aston R.* // Immunology. 1993. V. 80. P. 293–299.
10. *Briscoe H., Roach D.R., Meadows N., Rathjen D., Britton W.J.* // J. Leukoc. Biol. 2000. V. 68. P. 538–544.
11. *Postlethwaite A.E., Seyer J.M.* // J. Exp. Med. 1990. V. 172. P. 1749–1756.
12. *Nekrasov A.N.* // J. Biomol. Struct. Dyn. 2004. V. 21. P. 615–624.
13. *Nekrasov A.N., Radchenko V.V., Shuvaeva T.M., Novoselov V.I., Fesenko E.E., Lipkin V.M.* // J. Biomol. Struct. Dyn. 2007. V. 24. P. 455–462.
14. *Некрасов А.Н., Петровская Л.Е., Топорова В.А., Крюкова Е.А., Родина А.В., Москалева Е.Ю., Кирпичников М.П.* // Биохимия. 2009. Т. 74. С. 493–500.
15. *Шингарова Л.Н., Сагайдак Л.Н., Турецкая Р.Л., Недоспасов С.А., Есипов Д.С., Коробко В.Г.* // Биоорган. химия. 1996. Т. 22. С. 243–251.
16. *Creasey A.A., Doyle L.V., Reynolds M.T., Jung T., Lin L.S., Vitt C.R.* // Cancer Res. 1987. V. 47. P. 145–149.
17. *Makrides S.C.* // Microbiol. Rev. 1996. V. 60. P. 512–538.
18. *Dyson M.R., Shadbolt S.P., Vincent K.J., Perera R.L., McCafferty J.* // BMC Biotechnol. 2004. V. 4. P. 32.
19. *Malakhov M.P., Mattern M.R., Malakhova O.A., Drinker M., Weeks S.D., Butt T.R.* // J. Struct. Funct. Genomics. 2004. V. 5. P. 75–86.
20. *Fernandez-Escamilla A.M., Rousseau F., Schymkowitz J., Serrano L.* // Nat. Biotechnol. 2004. V. 22. P. 1302–1306.
21. *Makin O.S., Serpell L.C.* // FEBS J. 2005. V. 272. P. 5950–5961.
22. *Guijarro J.I., Sunde M., Jones J.A., Campbell I.D., Dobson C.M.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 4224–4228.
23. *Fändrich M., Fletcher M.A., Dobson C.M.* // Nature. 2001. V. 410. P. 165–166.
24. *López De La Paz M., Goldie K., Zurdo J., Lacroix E., Dobson C.M., Hoenger A., Serrano L.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. V. 99. P. 16052–16057.
25. *Provencher S.W., Glockner J.* // Biochemistry. 1981. V. 20. P. 33–37.
26. *Steed P.M., Tansey M.G., Zalevsky J., Zhukovsky E.A., Desjarlais J.R., Szymkowski D.E., Abbott C., Carmichael D., Chan C., Cherry L., Cheung P., Chirino A.J., Chung H.H., Doberstein S.K., Eivazi A., Filikov A.V.,*

- Gao S.X., Hubert R.S., Hwang M., Hyun L., Kashi S., Kim A., Kim E., Kung J., Martinez S.P., Muchhal U.S., Nguyen D.H., O'Brien C., O'Keefe D., Singer K., Vafa O., Vielmetter J., Yoder S.C., Dahiyat B.I. // *Science*. 2003. V. 301. P. 1895–1898.
27. Ameloot P., Fiers W., De Bleser P., Ware C.F., Vandenaabeele P., Brouckaert P. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 37426–37430.
28. Banner D.W., D'Arcy A., Janes W., Gentz R., Schoenfeld H.J., Broger C., Loetscher H., Lesslauer W. // *Cell*. 1993. V. 73. P. 431–445.
29. van Ostade X., Tavernier J., Prange T., Fiers W. // *EMBO J.* 1991. V. 10. P. 827–836.
30. Loetscher H., Stueber D., Banner D., Mackay F., Lesslauer W. // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. P. 26350–26357.
31. Narhi L.O., Rhode M.F., Hunt P., Arakawa T. // *J. Protein Chem.* 1989. V. 8. P. 669–677.
32. Berg D., Lehne M., Müller N., Siegmund D., Münkler S., Sebald W., Pfizenmaier K., Wajant H. // *Cell Death Differ.* 2007. V. 14. P. 2021–2034.
33. Plagmann I., Chalaris A., Kruglov A.A., Nedospasov S.A., Rosenstiel P., Rose-John S., Scheller J. // *J. Biotechnol.* 2009. V. 142. P. 170–178.
34. Fan C.Y., Huang C.C., Chiu W.C., Lai C.C., Liou G.G., Li H.C., Chou M.Y. // *FASEB J.* 2008. V. 22. P. 3795–3804.
35. Sambrook J., Russell D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, N. Y.; Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001.
36. Schagger H., von Jagow G. // *Anal. Biochem.* 1987. V. 166. P. 368–379.
37. Kramer S.M., Carver M.E. // *J. of Immunol. Meth.* 1986. V. 93. P. 201–206.

The Obtainment and Properties of the Human Tumor Necrosis Factor

L. N. Shingarova^{a,#}, L. E. Petrovskaya^a, A. N. Nekrasov^a, E. A. Kryukova^a, E. F. Boldyreva^a, S. A. Jakimov^a, S. V. Guryanova^a, D. A. Dolgikh^a, and M. P. Kirpichnikov^{a,b}

[#] Phone: (495) 330-69-83; e-mail: lshing@mx.ibch.ru

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

^b Moscow State University, Moscow, Russia

The tumor necrosis factor (TNF) is a proinflammatory cytokine that plays a pivotal role in the regulation of the human immune system. Studies of the TNF functional topography are a challenging task in bioengineering. We have produced genes encoding the peptides D1 (3–30), D2 (31–85), D3 (86–114), and D4 (115–157), which correspond to isolated fragments of the informational structure of TNF. These genes were expressed in *E. coli* cells at a high level in a soluble form. We have shown that hybrid proteins SD2 and SD4 tend to form soluble aggregates, which can be destroyed by urea treatment. Purified peptides D1, D3, and D4 possess a similar secondary structure with dominating beta-structural elements. The analysis of the biological activity of these peptides has shown that they do not exhibit cytotoxic properties on L929 murine fibroblasts. The simultaneous addition of D1 with full-length TNF results in the concentration dependent suppression of TNF activity.

Key words: tumor necrosis factor, *E. coli* expression, information structure, peptides, cytotoxicity