



УДК 577.113.6

© 1990 г.

С. В. Серегин, В. А. Рябинин, А. Н. Сияков,
Н. К. Данилюк, С. Г. Поздняков

РЕКОНСТРУКЦИЯ ИСКУССТВЕННОГО ГЕНА ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО ИНТЕРЛЕЙКИНА-2

ВНИИ молекулярной биологии, НПО «Вектор», пос. Кольцово Новосибирской обл.

Осуществлен химико-ферментативный синтез и клонирование фрагмента ДНК, кодирующего сигнальную последовательность гена человеческого интерлейкина-2 (IL-2). Получена гибридная плазмида pSIL-2, которая содержит ген IL-2 человека, снабженный этой сигнальной последовательностью для обеспечения эффективной экспрессии гена IL-2 в эукариотических системах. Для конструирования химерных генов, содержащих на 5'-конце последовательность гена IL-2, проведена реконструкция плазмиды pIL-2, обеспечивающая возможность удаления терминирующих кодонов гена IL-2.

Повышенный интерес, проявляемый в настоящее время во всем мире к человеческому интерлейкину-2 (IL-2), обусловлен его важной ролью в развитии иммунного ответа организма. Этот белок широко испытывается при создании средств лечения вирусных и раковых заболеваний [1, 2]. Основным источником IL-2 на сегодня являются различные штаммы-продуценты, полученные генно-инженерным способом [3, 4]. Помимо изучения биологических свойств нативного IL-2 осуществляются попытки создания на его основе белков с новым спектром свойств. В частности, в работе [5] получен искусственный лимфокин, обладающий активностью как иммунного интерферона, так и IL-2 человека. Сконструирован химерный ген, кодирующий дифтерийный токсин и IL-2 [6]; белок, являющийся продуктом его экспрессии, обладает иммунодепрессантными свойствами.

Ранее нами химико-ферментативным способом был получен ген человеческого IL-2 [7]. Этот ген удобен для выражения в прокариотических системах экспрессии, но не в эукариотических, поскольку не содержит сигнальной последовательности, обеспечивающей секрецию зрелого IL-2. Кроме того, в его конструкции имеются терминирующие кодоны, что затрудняет получение гибридных генов, содержащих на 5'-конце последовательность гена IL-2.

Задачей настоящей работы явилась реконструкция искусственного гена IL-2 в генетические структуры, способные обеспечивать секрецию IL-2 и его аналогов в эукариотических системах экспрессии, а также пригодные для создания химерных белков.

С этой целью нами был осуществлен химико-ферментативный синтез сигнальной последовательности гена IL-2. В данном случае мы попытались получить универсальную структуру сигнальной последовательности, способную стыковываться с различными генами и интегрироваться с помощью адаптеров в любой вектор. Олигонуклеотиды (I)–(IV) длиной 40, 24, 24, 40 нуклеотидных звеньев, составляющие целевую последовательность, обрамленную *Bam*HI-сайтами (рис. 1), синтезировали фосфитным методом [8] и сшивали в дуплекс с помощью T4-ДНК-лигазы. Полученный дуплекс клонировали по *Bam*HI-сайту в векторе pFN126, позволяющем выделять клонированные фрагменты ДНК с заранее запланированными несимметричными липкими концами (рис. 1). Всего было получено более 500 клонов, из которых около 200 имели ожидаемый

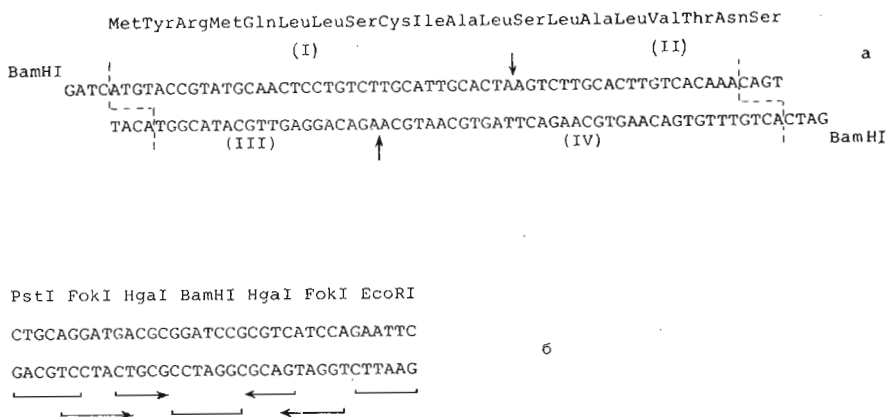


Рис. 1. Полученный химико-ферментативным способом фрагмент ДНК, содержащий сигнальную последовательность гена IL-2 человека. Вертикальными стрелками отмечены границы синтезированных олигонуклеотидов (I)–(IV), штриховыми линиями — фрагмент, выделяемый из плазмиды рFH126S при помощи *FokI*-гидролиза (a). б — структура полилинкерного участка векторной плазмиды рFH126 (отмечены рестриктивные сайты). Для рFH125: вместо *Bam*HI-сайта содержится *Sal*GI-сайт (GTCGAC)I

Лас-фенотип. Из числа последних выбрали 55 и провели гибридизацию их ДНК с 32 P-меченным олигонуклеотидом (I) в качестве зонда. Положительный сигнал наблюдали в 50 случаях. Из пяти таких колоний выделили ДНК, которую анализировали с помощью совместного *Eco*RI- и *Pst*II-гидролиза. На электрофореграммах во всех образцах наблюдали появление дополнительной по сравнению с векторной ДНК полосы в районе 90 п.о. Правильность структуры клонированного фрагмента в рекомбинантной плазмиде рFH126S подтверждена с помощью метода Максама — Гилберта [9].

При обработке эндонуклеазой рестрикции *Fok*I рекомбинантная ДНК плазмиды рFH126S дает фрагмент ДНК, содержащий только сигнальную последовательность гена IL-2 (рис. 1). Структура получающегося дуплекса позволяет состыковать его с геном IL-2. Для этого в векторе рFH125 (рис. 1) клонировали *Hae*II/*Sal*GI-фрагмент плазмиды рIL-2 и *Pst*II/*Fok*I-фрагмент плазмиды рFH126S в присутствии коннектора CAGTGCCG, который закрывает брешь, образуемую 5'-выступающим концом сигнальной последовательности и 3'-выступающим концом гена IL-2 (рис. 2). Из 300 клонов отбирали 70 и их ДНК гибридизовали с вышеуказанным зондом. Из восьми ДНК, отобранных на основании гибридизационного анализа, две имели ожидаемую рестриктивную карту при *Eco*RI + *Pst*II-, *Eco*RI + *Sal*GI- и *Pvu*II-гидролизе. Окончательно структура целевой последовательности доказана с помощью метода Максама — Гилберта [9].

При удалении терминирующих кодонов из последовательности гена IL-2 мы также попытались получить универсальную конструкцию гена, способную достаточно легко с минимальными искажениями состыковываться с произвольной нуклеотидной последовательностью в целевую химерную структуру. Наиболее простым способом решения этой задачи представляется сдвиг *Fok*I-сайта относительно гена IL-2 в плазмиде рIL-2 (рис. 2 и 3). Как следует из структуры гена и вектора, при расщеплении ДНК плазмиды рIL-2 рестриктазой *Fok*I из последовательности гена терминирующие кодоны не удаляются (рис. 2). Для их элиминирования *Fok*I-сайт необходимо перенести влево на расстояние не менее семи нуклеотидных звеньев. Наиболее рациональная структура IL-2 для последующего конструирования химерных генов получится при удалении терминирующего кодона ТАА и двух нуклеотидов из последнего кодона. В этом случае конструкция позволяет состыковать ген IL-2 с любым фрагментом ДНК, имеющим 3'-выступающий конец, путем использования коннектора и застройки брешки в нижней цепи с помощью ДНК-полимеразы. При слиянии с фрагментом ДНК, имеющим 5'-выступающий конец можно использовать два коротких адаптера. В любом случае варьирова-

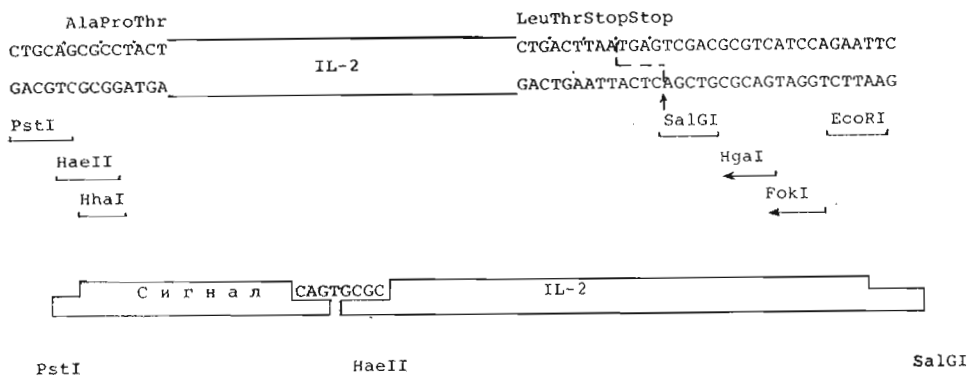


Рис. 2. а — строение прилегающих к 5'- и 3'-концам гена IL-2 районов плазмиды pIL-2. Пунктиром указано место расщепления рестриктазой *FokI*. б — схема сборки гена IL-2 с сигнальной последовательностью

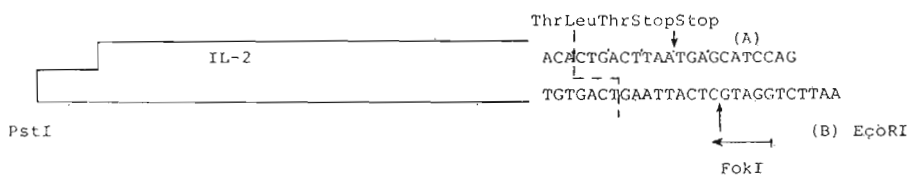


Рис. 3. Строение района, прилегающего к 3'-концу гена IL-2 плазмиды pIL-2d. Вертикальные стрелки разделяют олигонуклеотиды А и В, которые использовались при реконструкции; пунктиром обозначено место расщепления рестриктазой *FokI*

нием длины коннектора и адаптеров можно согласовать рамку считывания составных частей химерного гена.

Для получения целевой плазмиды выделяли *PstI*-*FokI*-фрагмент плазмиды pIL-2 (рис. 2), лигировали его с олигонуклеотидами А и В и вектором pFH126/*EcoRI*-*PstI* (рис. 3). Всего получали более 8000 клонов, из которых 62 гибридизовали с ³²P-мечеными олигонуклеотидами, входящими в состав фрагмента II гена IL-2 [7], и из 54 положительно гибридизующихся клонов отобрали четыре для рестрикционного анализа. Рестриктивные карты ДНК этих плазмид при *EcoRI* + *PstI*- и *FokI* + *PstI*-гидролизе соответствовали ожидаемым. Структура реконструированной области в плазмиде pIL-2d подтверждена с помощью метода Максама — Гилберта [9].

Необходимо отметить, что гибридные плазмиды pIL-2d, pSIL-2, равно как и pIL-2, обеспечивают бактериальным клоном *Lac*⁺, а не *Lac*⁻-фенотип, как следовало бы ожидать вследствие инактивации гена β-галактозидазы в результате встраивания чужеродных фрагментов ДНК. Этот факт мы объясняем возможной реинициацией трансляции с АТГ-кодона, образующегося на 3'-конце гена IL-2 в районе тандема терминирующих кодонов (рис. 3) и находящегося в рамке считывания гена β-галактозидазы.

Таким образом, в настоящей работе получена плазмида pSIL-2, содержащая ген человеческого IL-2 вместе с его сигнальной последовательностью. Достоинством этой конструкции является наличие большого числа сайтов эндонуклеаз рестрикции (*PstI*, *FokI*, *HgaI*, *BamHI*, *SalGI*, *HgaI*, *FokI*, *EcoRI*), окружающих полученный ген и обеспечивающих простоту его переноса в различные векторы и сочленение с практически любыми регуляторными элементами. Полученная рекомбинантная плазмида pIL-2d позволяет выделять кодирующую часть гена человеческого IL-2 без терминирующих кодонов. Такой фрагмент в дальнейшем будет использован при конструировании различных химерных генов.

Экспериментальная часть

В работе использовали эндонуклеазы рестрикции *Bam*HI, *Pvu*II, *Eco*RI, *Pst*I, *Sal*GI (все КФ 3.1.21.2) производства НПО «Фермент» (Вильнюс), *Hae*II и *Fok*I (КФ 3.1.21.2), а также Т4-полинуклеотидкиназу (КФ 2.7.1.78), Т4-ДНК-лигазу (КФ 6.5.1.1) и фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli* (КФ 2.7.7.7) производства НИКТИ БАВ (Бердск), dNTP и АТР (Sigma, США), $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТР}$ и $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dTTP}$ (1000 Ки/ммоль) отечественного производства.

Синтез олигодезоксирибонуклеотидов. При синтезе использовали реагенты и растворители промышленного производства, при необходимости дополнительно очищенные по общепринятым методикам, а также полученные по известным методикам защищенные нуклеозиды [10], салицилхлорфосфит и триэтиламмониевые соли защищенных нуклеозидфосфитов [11]. В синтезе использовали носители на основе макропористых стекол с прищипами при помощи сукциламинопористых групп соответствующими нуклеозидами (диаметр пор 700 Å, размер частиц 90–100 мкм, нагрузка 20–40 мкмоль нуклеозида на 1 г стекла) [12]. Синтез осуществляли на автоматическом синтезаторе «Виктория-4М», исходя из 0,5 мкмоль 3'-концевого нуклеозида по методу, близкому к описанному в работе [8]: детритилирование 3% CCl_3COOH в дихлорэтаноле (2 мл, 40 с); последовательные промывки CHCl_3 (2 мл, 30 с), CH_3CN (2 мл, 30 с) и абс. CH_3CN (4 мл, 60 с); обработку 30 мМ триэтиламмониевой солью нуклеозидфосфита и 80 мМ пивалоилхлоридом в смеси $\text{Ru}-\text{CH}_3\text{CN}$ — лутидин, 47 : 50 : 3 (0,3 мл, 120 с); промывки CH_3CN (2,5 мл, 40 с) и CHCl_3 (1,5 мл, 20 с). Последующие окисление, деблокирование и выделение неочищенных олигонуклеотидов проводили аналогично работе [8]. Целевые олигонуклеотиды длиной менее 20 нуклеотидных звеньев очищали с помощью ВЭЖХ по методу [13] на хроматографе Altex (модель 322, США) на колонках размером 3,2 × 250 мм: анионообменную ВЭЖХ — на Partisil 10 SAX (Whatman, Великобритания), обращенно-фазовую — на Lichrosorb RP-18 (Merck, ФРГ). Более протяженные олигонуклеотиды очищали препаративным электрофорезом в 10–20% ПААГ, содержащем 7 М мочевины [14], с последующей обращенно-фазовой ВЭЖХ. Полученные вещества анализировали электрофорезом в ПААГ [14], их структуру подтверждали модифицированным методом Максама — Гилберта [15].

Гидролиз ДНК рестриктазами и 5'-фосфорилирование олигонуклеотидов осуществляли по методикам [16], плазмидную ДНК выделяли методом [17], получение компетентных клеток *E. coli* JM103 и трансформацию проводили по методике [18].

Лигазная сшивка фрагмента ДНК. По 300 пмоль 5'-фосфорилированных олигонуклеотидов (I) и (IV) смешивали в стехиометрическом соотношении с нефосфорилированными олигонуклеотидами (II) и (III), добавляли 15 мкл лигазного буфера (660 мМ трис-HCl, pH 7,8; 66 мМ MgCl_2), доводили объем до 105 мкл водой и нагревали до 90°С. Затем смесь медленно охлаждали в течение 2–3 ч до 25°С, добавляли 15 мкл 0,1 М β-меркаптоэтанола, 30 мкл 1 мМ АТР, 45 ед. акт. ДНК-лигазы и инкубировали 4 ч при 25°С. По окончании реакции фермент инактивировали нагреванием (10 мин при 70°С), нуклеотидный материал осаждали 10 объемами 2% раствора перхлората лития в ацетоне и проводили электрофорез в 15% ПААГ с 7 М мочевиной. Фрагмент нужной длины извлекали из геля электроолюцией на бумагу DE-81, десорбцию с бумаги проводили 1,5 М водным раствором перхлората лития при 60°С (3 × 20 мкл) и осаждали, добавив 600 мкл ацетона. Осадок промывали ацетоном, этанолом и растворяли в 200 мкл ТЕ-буфера (10 мМ трис-HCl, pH 8,0; 1 мМ EDTA). Выход фрагмента составил 80–90%.

Клонирование фрагментов ДНК. 5'-Фосфорилированный фрагмент, кодирующий сигнальный пептид IL-2, в количестве 5–6 пмоль смешивали с 0,3 пмоль *Bam*HI-гидролизованной ДНК плазмиды pFN126. Лигирование проводили в 50 мкл 18 ч при 5–6°С как описано выше. Полученной лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli*

JM103 [18] и отбирали клоны с Lac⁻-фенотипом на агаризованной среде LB, содержащей 50 мкг/мл Y-gal и 240 мкг/мл изопропилтиогалактозида. Гибридизацию проводили по методике [16] с 5'-³²P-фосфорилированным олигонуклеотидом (I) (20 мкКи/мл). ДНК гибридизующихся клонов подвергали совместному гидролизу *Eco*RI и *Pst*I и проводили электрофорез в 4% ПААГ [14]. Для подтверждения структуры клонированного фрагмента 10 мкг ДНК pFH126S гидролизovali рестриктазой *Eco*RI и вводили метку ³²P с помощью [α -³²P]dTTP и фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I [16], затем проводили *Pst*I-гидролиз и выделяли фрагмент ДНК в районе 90 п.о. как описано выше. Нуклеотидную последовательность этого фрагмента определяли методом Максама — Гилберта [9].

Для получения плазмиды pSiL-2 выделяли как описано выше *Pst*I/*Fok*I-фрагмент плазмиды pFH126S (~70 п.о.) и *Hae*II/*Sal*GI-фрагмент плазмиды pIL-2 (~400 п.о.). Аналогично готовили вектор pFH125/*Pst*I-*Sal*GI. В лигазную смесь брали по 8 пмоль фрагментов, 40—50 пмоль 5'-фосфорилированного коннектора (5')CAGTCCGCG и 0,2 пмоль вектора. Лигазную смесь, трансформацию и гибридизацию проводили аналогично вышеописанным. ДНК восьми клонов подвергли рестрикционному анализу: *Eco*RI + *Pst*I, *Eco*RI + *Sal*GI и *Pvu*II. В плазмидной ДНК одного из клонов подтверждали последовательность клонированного фрагмента как описано выше.

Для получения плазмиды pIL-2d аналогично получали *Pst*I/*Fok*I-фрагмент плазмиды pIL-2 (~390 п.о.) и вектор pFH126/*Eco*RI-*Pst*I. В лигазную смесь вводили 6—7 пмоль фрагмента, 15 пмоль нефосфорилированного дуплекса из олигонуклеотидов А и В, 0,3 пмоль вектора. Скрининг вели как описано выше.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Reddehase M. J., Muttter W., Koszinovski U. H. // J. Exp. Med. 1987. V. 165. № 3. P. 650—656.
2. Mule J. J., Yang J., Shu S., Rosenberg S. A. // J. Immunol. 1986. V. 136. № 10. P. 3899—3909.
3. Weir M. P., Sparks J. // Biochem. J. 1987. V. 245. № 1. P. 85—91.
4. Miyaji H., Nishi T., Saito A., Maeda S., Shimada K., Hirano T., Onoue K., Itoh S. // Agr. and Biol. Chem. 1987. V. 51. № 4. P. 1135—1142.
5. Masaharu S., Shuji H., Haruo O., Koichi I. // FEBS Lett. 1986. V. 199. № 2. P. 187—191.
6. Kelley Y. E., Bacha P., Pankewycz O., Nichols J. C., Murphy J. R., Strom T. B. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. № 11. P. 3980—3984.
7. Синяков А. Н., Данилюк Н. К., Серпинский О. И., Урманова М. А. Способ получения рекомбинантной ДНК, кодирующей интерлейкин-2 человека. Заявка на изобр. № 4382438/30-13. Заявл. 19.12.88. Положительное решение от 30.01.89.
8. Froehler B. C., Matteucci M. D. // Tetrahedron Lett. 1986. V. 27. № 4. P. 469—472.
9. Mazam A. M., Gilbert M. // Meth. Enzymol. 1980. V. 65. P. 499—560.
10. Shaller H., Weimann G., Lerch B., Khorana H. G. // J. Amer. Chem. Soc. 1963. V. 85. № 23. P. 3821—3827.
11. Marugg J. E., Tromp M., Kuyt-Yeheskiely E., van der Marel G. A., van Boom J. H. // Tetrahedron Lett. 1986. V. 27. № 23. P. 2661—2664.
12. Matteucci M. D., Caruthers M. H. // J. Amer. Chem. Soc. 1981. V. 103. № 11. P. 3185—3194.
13. Карпышев Н. Н., Ястребов С. И., Попов С. Г. // Биоорган. химия. 1985. Т. 11. № 10. С. 1361—1366.
14. Остерман Л. А. Методы исследований белков и нуклеиновых кислот: электрофорез и ультрацентрифугирование. М.: Наука, 1981. С. 120—135.
15. Данилюк Н. К., Ястребов С. И., Артамонова Т. П., Попов С. Г. // Биоорган. химия. 1986. Т. 12. № 9. С. 1185—1188.
16. Маннатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. С. 107—124, 132—134, 292—306.
17. Birnboim H. C., Doly J. A. // Nucl. Acids Res. 1979. V. 7. № 6. P. 1513—1523.
18. Cohen S. N., Shang A. C. Y., Hsu L. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1972. V. 69. № 8. P. 2110—2114.

Поступила в редакцию
26.VI.1989

S. V. SERYOGIN, V. A. RYABININ, A. N. SINYAKOV, N. K. DANILYUK,
S. G. POZDNYAKOV

RECONSTRUCTION OF A SYNTHETIC HUMAN INTERLEUKIN-2 GENE

*All-Union Research Institute of Molecular Biology, Kol'tsovo,
Novosibirsk Region*

Chemical-enzymatic synthesis and cloning of the DNA fragment coding for the human interleukin-2 signal sequence was accomplished. A hybrid plasmid pSIL-2 containing the gene of the human interleukin-2 with this signal sequence was constructed for effective expression of the gene in eukaryotic systems. A variant permitting the removal of the interleukin-2 stop-codons was obtained, which is suitable for the construction of chimeric genes containing the interleukin-2 gene sequence at the 5'-end.