



УДК 577(214.625 + 217.52) : 577.113.6

© 1991 г.

В. Г. Коробко, И. И. Селезнева, Л. Н. Шингарова,

С. А. Филиппов, В. Н. ДобрынинКОНСТРУИРОВАНИЕ ГЕНА, КОДИРУЮЩЕГО ПРЕДШЕСТВЕННИК
ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ ЧЕЛОВЕКА

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва

Осуществлен генно-инженерный «сплайсинг» интронов гена фактора некроза опухолей человека. Для этого сначала с помощью сайт-направленного мутагенеза в 3'-конец 1-го экзона природного гена вводили сайт рестрикции *Clal*, а затем химико-ферментативным синтезом получили фрагмент ДНК с выступающими концами для клонирования по сайтам рестриктаз *Clal* и *XhoI*, содержащий полную последовательность 2-го и начала 3-го экзона. Окончательную сборку гена предшественника провели с использованием в качестве вектора плазмиды рTNF33, содержащей полусинтетический ген фактора некроза опухолей человека.

Фактор некроза опухоли (ФНО), или кахектин, — белок, обладающий сильным цитотоксическим действием на ряд линий опухолевых клеток *in vitro*, вызывает геморрагический некроз некоторых видов опухолей у мышей [1—3]. В организме ФНО продуцируется главным образом макрофагами в ответ на инфекцию вирусами или грамотрицательными бактериями [4]. При острых генерализованных инфекциях уровень ФНО в крови резко повышается, что приводит к шоку, а иногда и к летальному исходу. Потенциальная возможность использования ФНО в качестве эффективного противоопухолевого препарата, с одной стороны, и необходимость поиска нейтрализации токсического действия ФНО на организм — с другой, стали причиной многочисленных исследований свойств этого белка во многих лабораториях.

Фактор некроза опухолей, являясь небольшим (157 а.о.) белком, синтезируется в клетках в виде предшественника с необычно длинной (76 а.о.) лидерной последовательностью. В настоящее время получены данные о том, что лидерная последовательность играет важную роль в функционировании ФНО *in vivo*. Так, недавно было показано [5, 6], что существует связанная с мембраной макрофагов форма ФНО с молекулярной массой около 26 кДа, полностью сохраняющая цитотоксическую активность. Было сделано предположение, что основной активной формой ФНО в организме, по-видимому, является не процессированный белок, а такой ассоциированный с макрофагом комплекс. В этом комплексе ФНО сохраняет гидрофобную лидерную последовательность, которая играет роль якоря, удерживающего белок на клеточной мембране, а его глобулярная часть экспонирована на поверхности макрофага. В этой связи получение и изучение свойств предшественника ФНО представляет значительный интерес.

Ранее Недвином [7] и нами [8] было проведено молекулярное клонирование гена ФНО человека. При этом было установлено, что ген ФНО состоит из четырех экзонов, наименьшими из которых (47 и 46 п.о.) являются второй и третий, а четвертый кодирует большую часть зрелого белка (рис. 1). Это обстоятельство ранее было нами использовано для получе-

Префикс «d» (дезокс-) в названиях синтетических дезоксирибоолигонуклеотидов опущен. а. о. — аминокислотный остаток.

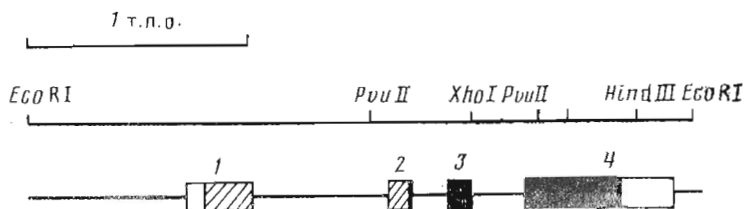


Рис. 1. Интрон-экзонная структура *EcoRI*-фрагмента гена фактора некроза опухолей человека. Зачернены участки, кодирующие зрелый белок ФНО; заштрихованы участки, кодирующие аминокислотную последовательность лидерного пептида ФНО; не окрашены участки, кодирующие нетранслируемую последовательность мРНК. Указаны сайты узнавания рестриктаз. Цифрами даны номера экзонов

для полусинтетического гена, пригодного для экспрессии в бактериях [9]. В этом гене в результате синонимических замен в N-концевую часть был введен уникальный сайт эндонуклеазы рестрикции *XhoI*, что соответствует началу 3-го экзона. Поэтому стратегия конструирования гена, кодирующего предшественник ФНО, заключалась, во-первых, во введении с помощью олигонуклеотид-направленного мутагенеза сайта рестриктазы *ClaI* в конец 1-го экзона; во-вторых, в химико-ферментативном синтезе фрагмента ДНК, кодирующего конец 1-го, 2-й и начало 3-го экзона, содержащего выступающие концы для клонирования по сайтам эндонуклеаз рестрикции *ClaI* и *XhoI*, и, наконец, в сборке полного гена.

Для этого сначала в плазмиду pSK (+) по сайтам эндонуклеаз рестрикции *EcoRI/XhoI* клонировали соответствующий фрагмент генома человека, содержащий первые три экзона гена ФНО. Затем фрагмент полученной таким образом плазмиды pSKN, содержащий 5'-нетранслируемую область и 1-й экзон гена ФНО, амплифицировали с помощью полимеразной цепной реакции [10]. При этом в качестве праймеров для амплификации использовали «обратный» праймер AAGAGCTATGACCATG, комплементарный последовательности плазмиды pSK (+) перед полилинкером, и мутагенизирующий олигонуклеотид CCCTCTGGGGATCGAT·CACTCC (подчеркнуты вводимые нуклеотидные замены). В результате был получен фрагмент ДНК длиной около 1100 п.о., содержащий 5'-нетранслируемую область и 1-й экзон гена ФНО без двух последних аминокислот. Этот фрагмент был клонирован по «тупым» концам в *SmaI*-сайт плазмиды pSN (+). Однако выщипать его из плазмиды по сайтам рестриктаз *BamHI* и *ClaI* не удалось. По всей видимости, это связано с тем, что сайт рестриктазы *ClaI* образован сочетанием двух последовательностей GATC, дезоксиаденозиновый остаток в которых в большинстве штаммов *E. coli* подвергается метилированию. Это, в свою очередь, приводит к тому, что оба остатка A в сайте узнавания рестриктазы *ClaI* оказываются метилированы, что и препятствует действию фермента. Поэтому для дальнейшего использования амплифицированный с помощью ДНК-полимеразы *Thermus aquaticus* фрагмент гидролизовали рестриктазами *BamHI* и *ClaI* и образовавшийся фрагмент выделяли при помощи электрофореза в легкоплавкой агарозе.

На следующем этапе работы был осуществлен химико-ферментативный синтез фрагмента ДНК, кодирующего недостающую аминокислотную последовательность предшественника ФНО между *ClaI*-сайтом в конце 1-го экзона и *XhoI*-сайтом полусинтетического гена. Для этого И-фосфонатным твердофазным методом были синтезированы четыре олигонуклеотида длиной от 30 до 42 нуклеотидов, которые затем лигировали при помощи ДНК-лигазы фага T4 (рис. 2). Полученный фрагмент (около 70 п.о.) выделяли при помощи электрофореза в 20% ПААГ.

На заключительном этапе в качестве вектора для сборки полного гена, кодирующего предшественник ФНО, использовали плазмиду pTNF33, которая содержит полусинтетический ген ФНО и необходимые для клонирования сайты рестриктаз. С этой целью полученные ранее амплифицированный и синтетический фрагменты лигировали с вектором, приго-

.GlyProGlnArgGluGluLeuProArgAspLeuSerSerIleSerProLeuAlaGlnAlaValArgSerSer..
 CGGCCCCCAGAGGGGAAGAGTTCCCCAGGGACCTCTCTAATCAGCCCTTGGCCCAAGGCAGTCAAGAAGC
 CGGGGGTCTCCCTTCTCAAGGGGTCCCTGGAGAGAGAGTAGTCGGGAGACCGGGTCCGTCACTCTCCGAGCT
*ClaI** III V IV *XhoI*

Рис. 2. Синтетическая ДНК и кодируемая ею аминокислотная последовательность. Обозначены места сшивки олигонуклеотидов. Стрелками указаны границы 2-го экзона

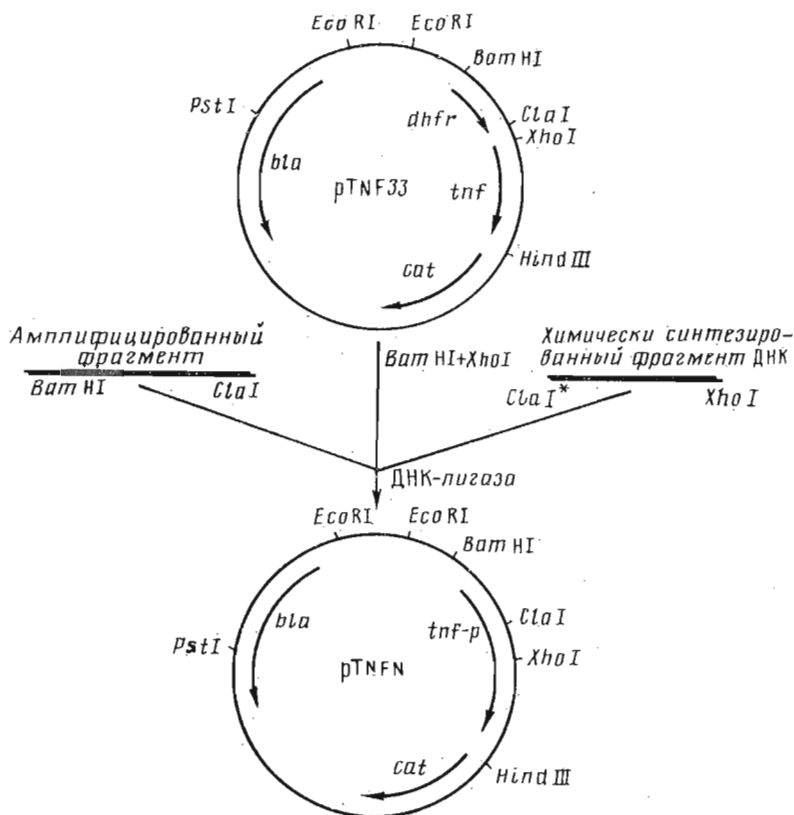


Рис. 3. Схема конструирования плазмиды pTNFN, кодирующей предшественник ФНО: *bla* — ген β-лактамазы; *dhfr* — ген дегидрофолатредуктазы; *cat* — ген хлорамфениколацетилтрансферазы; *tnfr-p* — ген предшественника ФНО; *tnf* — ген, кодирующий зрелый белок ФНО

товленным расщеплением плазмиды pTNF33 рестриктазами *XhoI* и *BamHI* (рис. 3). Поиск нужных клонов осуществляли гибридизацией с олигонуклеотидом (IV). В результате получили плазмиду pTNFN, структуру которой подтверждали рестриктным анализом и определением нуклеотидной последовательности амплифицированного фрагмента и синтетической части. Секвенирование проводили по модифицированному методу Сэнгера с использованием полимеразной цепной реакции [11] и олигонуклеотидов (I) и (IV) в качестве праймеров.

Таким образом, осуществлен генно-инженерный «сплайсинг» интронов гена ФНО и получена плазида pTNFN, кодирующая предшественник фактора некроза опухолей человека.

Экспериментальная часть

В работе использовали дезоксирибонуклеозид-5'-трифосфаты (Pharmacia P-L, Швеция), дидезоксинуклеозид-5'-трифосфаты и $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (5000 Ки/ммоль) фирмы Amersham (Англия); эндонуклеазы рестрикции *BamHI*, *ClaI*, *EcoRI*, *HaeIII*, *HindIII*, *XhoI* и ДНК-полимеразу *T. aquaticus* производства НПО «Фермент» (Вильнюс). ДНК-лигазу фага T4 по-

лучали из штамма-суперпродуцента модифицированным способом [12].

Синтез олигонуклеотидов выполняли твердофазным методом на автоматическом синтезаторе «System 1 plus» (Beckman, США) с использованием Н-фосфонатных синтонов, активируемых пивалонилхлоридом или адамантоилхлоридом, как описано в работе [13]. Олигонуклеотиды очищали с помощью электрофореза в ПААГ с последующей ВЭЖХ.

Клонирование и скрининг клонов проводили как описано в работе [14].

Лигировали олигонуклеотиды соответственно работе [9] с последующим выделением продуктов сшивки электрофорезом в денатурирующем ПААГ.

Сайт-направленный мутагенез осуществляли с помощью полимеразной цепной реакции в 100 мкл раствора, содержащего 9 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 25 мМ трис- HCl (pH 8,8), 1,5 мМ MgCl_2 , 2,5 мМ меркаптоэтанол, 10 нмоль каждого из dNTP, 0,5 мкг ДНК-матрицы, 50 нмоль праймера и 2 ед. ДНК-полимеразы *T. aquaticus*. Для амплификации (20 циклов) использовали прибор фирмы Perkin — Elmer Cetus (США). Каждый цикл состоял из прогревания (95°C , 30 с), отжига (55°C , 1 мин) и полимеризации (72°C , 2 мин). Продукты реакции выделяли при помощи электрофореза в 1% геле легкоплавкой агарозы.

Плазмидную ДНК секвенировали с помощью полимеразной цепной реакции и $5'$ - ^{32}P -меченых олигонуклеотидов (I) и (IV) в качестве праймеров как описано в работе [11].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Old L. J. // Science. 1985. V. 230. № 4726. P. 630—633.
2. Goeddel D. V., Aggarwal B. B., Gray P. W., Leung D. W., Nedwin G. E., Palladin M. A., Patton J. S., Pennica D., Shepard H. M., Sugarman B. J., Wong G. H. W. // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1986. V. LI. P. 597—610.
3. Sugarman B. J., Aggarwal B. B., Hass P. E., Figari I. S., Palladin M. A., Shepard H. M. // Science. 1985. V. 230. № 4728. P. 943—945.
4. Nedwin G. E., Sverdetski L. P., Bringman T. S., Palladin M. A., Jr., Goeddel D. V. // J. Immunol. 1985. V. 135. № 4. P. 2492—2497.
5. Kriegler M., Perez C., DeFay K., Albert I., Lu S. D. // Cell. 1988. V. 53. № 1. P. 43—53.
6. Decker T., Lohman-Matthes M.-L., Gufford G. E. // J. Immunol. 1987. V. 138. № 3. P. 957—962.
7. Nedwin G. E., Naylor S. L., Sakaguchi A. J., Smith D., Jarett-Nedwin J., Pennica D., Goeddel D. V., Gray P. W. // Nucl. Acids Res. 1985. V. 13. № 17. P. 6361.
8. Недоспасов С. А., Шахов А. Н., Турецкая Р. Л., Мемм В. А., Георгиев Г. П., Добрынин В. Н., Коробко В. Г. // Докл. АН СССР, 1985. Т. 285. № 6. С. 1487—1490.
9. Добрынин В. Н., Беркова Н. П., Болдырева Е. Ф., Быстров Н. С., Кравченко В. В., Филиппов С. А., Чупило С. А., Шамборант О. Г., Коробко В. Г. // Биооргани. химия. 1988. Т. 14. № 11. С. 1530—1537.
10. Kadowaki H., Kadowaki T., Wondisford F. E., Taylor S. I. // Gene. 1989. V. 76. № 1. P. 161—166.
11. Innis M. A., Myambo K. R., Gelfand D. H., Brow M. A. D. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. № 12. P. 9436—9440.
12. Dolganov G. M., Chestukhin A. M., Shemyakin M. F. // Eur. J. Biochem. 1981. V. 114. № 2. P. 247—254.
13. Филиппов С. А., Есипов Д. С., Калинин С. В., Добрынин В. Н. // Биооргани. химия. 1989. Т. 15. № 4. С. 527—529.
14. Коробко В. Г., Добрынин В. Н., Северцова И. В., Болдырева Е. Ф., Шингарова Л. Н., Чупило С. А., Филиппова Л. Ю., Звонок Н. М., Васильева Т. Е., Колосов М. Н. // Биооргани. химия. 1987. Т. 13. № 1. С. 69—81.

Поступила в редакцию 3.IV.1991

V. G. KOROBKO, I. I. SELEZNEVA, L. N. SHINGAROVA,

[S. A. FILIPPOV], V. N. DOBRYNIN

CONSTRUCTION OF A GENE CODING FOR A PRECURSOR OF HUMAN TUMOR NECROSIS FACTOR

M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

The cDNA sequence for human tumor necrosis factor (hTNF) was reconstructed in vitro from genomic sequence. Using the oligonucleotide directed mutagenesis, a site for restriction endonuclease *Cla*I was introduced into the end of the first exon. The nucleotide sequence representing the second and third exons flanked with restriction sites *Cla*I and *Xho*I was obtained by means of chemicalenzymatic synthesis. Assembly of the total gene coding for precursor of hTNF was accomplished in pTNF33 plasmid containing semisynthetic gene for mature hTNF with appropriate restriction sites.