



УДК 577(214.625 + 217.52):577.113.6
© 1991 г.

**В. Г. Коробко, И. В. Давыдов, Л. Н. Шингарова,
С. А. Филиппов, Д. С. Есинов, Н. П. Беркова,
В. Н. Добрынин**

ГЕНЫ ГИБРИДНЫХ ЛИМФОКИНОВ ЧЕЛОВЕКА I. КОНСТРУИРОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ ПЛАЗМИД, КОДИРУЮЩИХ ГИБРИДЫ ИММУННОГО ИНТЕРФЕРОНА И ФАКТОРОВ НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ ЧЕЛОВЕКА

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

Сконструированы рекомбинантные плазмиды, кодирующие гибриды иммунного интерферона с фактором некроза опухолей или лимфотоксином человека. Для этого с помощью олигонуклеотиднаправленного мутагенеза в С-концевой части гена γ -интерферона была проведена замена динуклеотида АТ на ТС, которая в свою очередь привела к замене Ser¹⁴³ на Pro и возникновению последовательности узнавания рестриктазы *SacI* (GAGCTC). Для соединения генов γ -интерферона с генами фактора некроза опухолей (TNF α) и лимфотоксина (TNF β) использовали синтетические олигонуклеотидные линкеры и уникальные сайты узнавания рестриктаз *XhoI* и *SmaI* в N-концевой части полусинтетических генов TNF α и TNF β . Исследована экспрессия гибридных генов в *Escherichia coli*. Найдено, что гибридные белки подвергаются частичному протеолитическому расщеплению в клетках бактерий.

Интерферон γ (IFN γ), фактор некроза опухоли (TNF α) и лимфотоксин (фактор некроза опухоли β , TNF β) являются белками-иммуномодуляторами, играющими важную роль в формировании иммунного ответа при бактериальной и вирусной инфекции. Так, IFN γ проявляет антивирусную и антипролиферативную активности, стимулирует цитотоксическую активность естественных киллеров, индуцирует экспрессию антигенов гистосовместимости I и II классов [1]. С другой стороны, факторы некроза опухолей α и β , будучи гомологичными белками (30% аминокислотной последовательности) [2], обладают сходным спектром биологической активности. В частности, они избирательно токсичны в отношении ряда опухолевых клеток *in vitro* и *in vivo*, но в то же время могут стимулировать рост некоторых нормальных клеток [3–5].

Было установлено, что во многих случаях IFN γ , с одной стороны, и TNF α или TNF β — с другой, проявляют синергизм действия. Так, например, в присутствии IFN γ значительно усиливается цитотоксичность TNF α и TNF β [5–9], а для некоторых опухолевых линий цитотоксический эффект проявляется лишь при совместном действии TNF и IFN γ [7, 9, 10]. Кроме того, TNF и IFN γ синергично усиливают экспрессию антигенов гистосовместимости II класса на поверхности макрофагов [11]. Таким образом, TNF и IFN γ взаимосвязаны в функционировании иммунной системы. Для дальнейшего изучения биологических свойств и синергизма действия этих белков на различные клеточные мишени представляет интерес получение гибридных молекул, в которых аминокислотные последовательности двух лимфокинов находились бы в единой полипептидной цепи, например, IFN γ -TNF α и IFN γ -TNF β . Подобный подход оказался продуктивным в отношении ряда белков. Так, методами белковой инженерии осуществлено клонирование и исследована экспрессия гибридных генов, кодирующих сплавленные белки IFN γ —интерлейкин-2 [12], дифтерийный токсин—интерлейкин-2 [13], интерлейкин-2—псевдо-

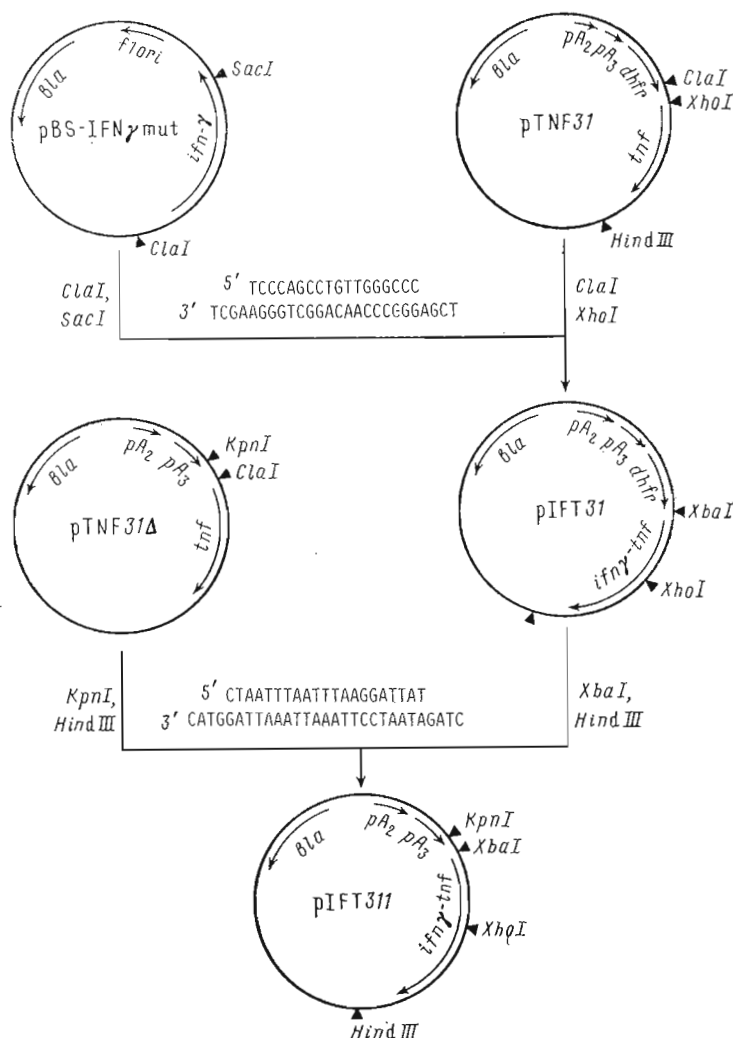


Рис. 1. Схема конструирования плазмид, содержащих ген гибридного белка IFN γ -TNF α

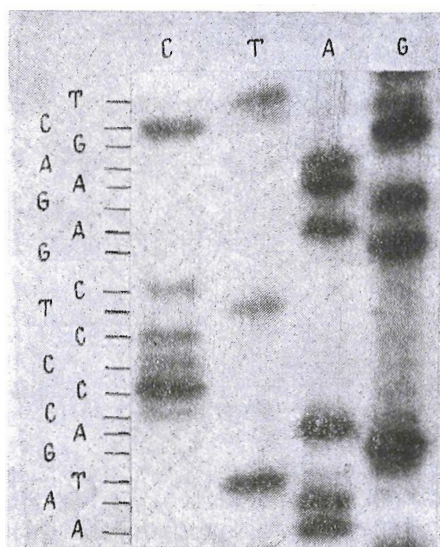
монадный экзотоксин [14], стафилококковый белок А—рицин [15] и др.

Ранее нами было осуществлено клонирование генов лимфотоксина и фактора некроза опухолей человека и описана экспрессия адаптированного для бактерий гена *tnfa* [16, 17]. В настоящей работе мы описываем конструирование генов, кодирующих гибридные белки IFN γ -TNF α и IFN γ -TNF β , и экспрессию этих генов в *Escherichia coli*.

Известно, что N-концевая часть TNF α не является необходимой для проявления биологической (цитотоксической) активности этого цитокина. В частности, удаление нескольких аминокислотных остатков не только не снижает его биологической активности, но даже увеличивает ее [18]. Что касается лимфотоксина, то установлено, что при выделении этого гликопротеина из активированных лимфобластоидных клеток человека линии RPMI-1778 идентифицирован биологически активный белок, у которого отсутствуют 23 аминокислотных остатка с N-конца [19]. В то же время имеются данные о том, что C-концевая последовательность этих лимфокинов весьма существенна для их биологической активности. Так, например, было установлено, что экспрессия синтетического гена, кодирующего первые 155 аминокислот TNF β , дала биологически неактивный белок [9], а удаление трех C-концевых аминокислот TNF α приводило практически к полной потере биологической активности [20].

С другой стороны, известно, что по крайней мере 13 C-концевых аминокислотных остатков IFN γ не существенны для биологической актив-

Рис. 2. Последовательность нуклеотидов во фрагменте мутантного гена *ifn γ* в фагмиде pBS-IFN γ mut. Приведен фрагмент разделяющего полиакриламидного геля



ности этого белка (ссылка [7] в работе [21]). Поэтому гибридные гены были сконструированы таким образом, чтобы в кодируемых ими белках последовательность IFN γ была расположена с N-конца, а последовательности TNF α и TNF β — соответственно с С-конца. При этом полная аминокислотная последовательность IFN γ слита в гибридном белке через короткий пептидный линкер Pro-Val-Gly-Pro либо с последовательностью зрелого TNF α , лишенного двух аминоконцевых остатков, либо с последовательностью зрелого TNF β . Мы предполагаем, что наличие в пептидном линкере двух остатков пролина обусловит существование полипептидных цепей IFN γ и TNF в гибридном белке как отдельных доменов, сохранив, таким образом, биологическую активность каждого входящего в его состав лимфокина.

На рис. 1 показана схема конструирования гибридных генов. В качестве источника кодирующей части гена *ifn γ* использовали плазмиду pIFN γ , в которой последовательность кДНК, кодирующая IFN γ , ограничена сайтами рестриктаз *Xba*I и *Pst*I [22]. На первом этапе работы был осуществлен олигонуклеотиднаправленный мутагенез С-концевой части гена *ifn γ* с введением двух нуклеотидных замен, в результате которого в конце гена образовался сайт расщепления рестриктазы *Sac*I. Мутагенез проводили по методу Т. Kunkel [23, 24] в одноцепочечном фагмидном векторе pBS(+)^{*} (Stratagene, США), из которого сначала удалили сайт рестриктазы *Sac*I, после чего клонировали ген *ifn γ* по сайтам *Hind*III и *Pst*I. Для мутагенеза использовали олигонуклеотид CCATTACTGGGGAGCTCTTGCACC^{*}, который впоследствии был использован для поиска клонов, содержащих плазмиды с мутантным геном, методом гибридизации. Правильность введения нуклеотидных замен подтверждена определением нуклеотидной последовательности фагмиды pBS-IFN γ mut в районе мутагенеза (см. рис. 2).

В качестве источника гена *tnfa* использована плазида pTNF31, содержащая полусинтетический ген *tnfa* [17], экспрессирующийся под контролем тандема промоторов A₂ и A₃ ранней области бактериофага T7. Для конструирования гена, кодирующего слитный белок IFN γ —TNF α , мы использовали уникальный рестриктный сайт *Xho*I, имеющийся в N-концевой части полусинтетического гена. Объединение генов осуществляли с помощью синтетического олигонуклеотидного линкера, выступающие концы которого комплементарны концам, образующимся при расщеплении ДНК рестриктазами *Sac*I и *Xho*I (см. рис. 1). Для этого двухцепочечную ДНК фагмиды pBS-IFN γ mut расщепили рестриктазами *Cla*I и *Sac*I и малый фрагмент (около 500 п.о.) лигировали с вектором,

* Подчеркнуты некомплементарные матрице нуклеотиды.

...^{EcoRI}GAATTCAGGAGGCCTCTAGATG...^{XbaI} α

...GGTACCTAATTTAATTTAAGGATTATCTAGATG...
^{KpnI} ^{XbaI}

...GGTACCTAATTTAATTTAAGGATTATAATTTAATTTAAGGA-
8

TTATCTAGATTTAATTTAAGGATTATCTAGATG...

Рис. 3. Структура участков связывания рибосомы гибридных генов в плазмидах pIFT31 (а), pIFT311 и pIFL311 (б), pIFT313 (в)

полученным расщеплением плазмиды pTNF31 рестриктазами *Cla*I и *Xho*I, в присутствии избытка олигонуклеотидного дуплекса (см. рис. 1). В результате получили плазмиду pIFT31, структуру которой подтверждали рестриктным анализом и определением нуклеотидной последовательности в районе соединения генов *ifn γ* и *tnf α* . В плазмиде pIFT31 экспрессия гибридного гена находится под контролем конститутивных промоторов A2 и A3 фага T7 и участка инициации трансляции, предшествующего гену *ifn γ* в плазмиде pIFN γ . Анализ методом электрофореза и иммуно-блоттинга суммарного лизата клеток *E. coli*, содержащих плазмиду pIFT31, показал присутствие белка с молекулярной массой около 34 кДа, взаимодействующего с поликлональной антисывороткой против TNF α . Однако общее количество его в клеточном лизате было незначительным, по-видимому, вследствие недостаточной эффективности инициации трансляции.

Для оптимизации экспрессии гибридного гена *ifny—tnfa* мы изменили участок связывания рибосомы, значительно уменьшив при этом содержание остатков G и C в спейсере между последовательностью Шайн — Дальгарно (SD) и иницирующим кодоном и несколько уменьшив размер самого спейсера (рис. 3). Для этого из плазмиды pIFT31 выщипали при помощи рестриктаз *HindIII* и *XbaI* фрагмент, содержащий гибридный ген, и клонировали его вместе с синтетическим линкером в плазмиду pTNF31Δ, являющуюся производной плазмиды pTNF31, по сайтам *Clal* и *HindIII*. В результате получили плазмиду pIFT311, в которой структуру начала гибридного гена вместе с новым рибосомсвязывающим участком подтверждали определением нуклеотидной последовательности. Интересно, что наряду с клонами, содержащими плазмиды с ожидаемой последовательностью рибосомсвязывающего участка, был обнаружен клон с плазмидой pIFT313, в которой эта последовательность была трижды тандемно повторена (см. рис. 3). Механизм образования такой рекомбинантной плазмиды остается непонятным; по всей видимости, его появление — артефакт клонирования.

При конструировании плазмиды, кодирующей гибридный γ -интерферон и лимфотоксина (LT), в качестве источника гена *tnf β* использовали плазмиду pLT19. Эта плазида содержит между сайтами *KpnI* и *SalI* полусинтетический ген, кодирующий зрелый лимфотоксин человека, причем в N-концевой части имеется уникальный сайт расщепления рестриктазой *SmaI*. Соединение генов *ifn γ* и *tnf β* осуществляли с помощью синтетического олигонуклеотидного линкера, кодирующего такой же пептидный линкер, как и в случае гибрида IFN γ —TNF α . Конструирование плазмиды pIFL311, содержащей гибридный ген *ifn γ —tnf β* , показано на рис. 4.

На следующем этапе работы мы исследовали экспрессию полученных гибридных генов в различных штаммах *E. coli*. С этой целью проводили электрофорез суммарного клеточного белка с последующим анализом методом иммуноблоттинга. При этом для анализа использовали поликлональные антисыворотки против рекомбинантных белков TNF α и TNF β и пероксидазный конъюгат моноклональных антител против рекомби-

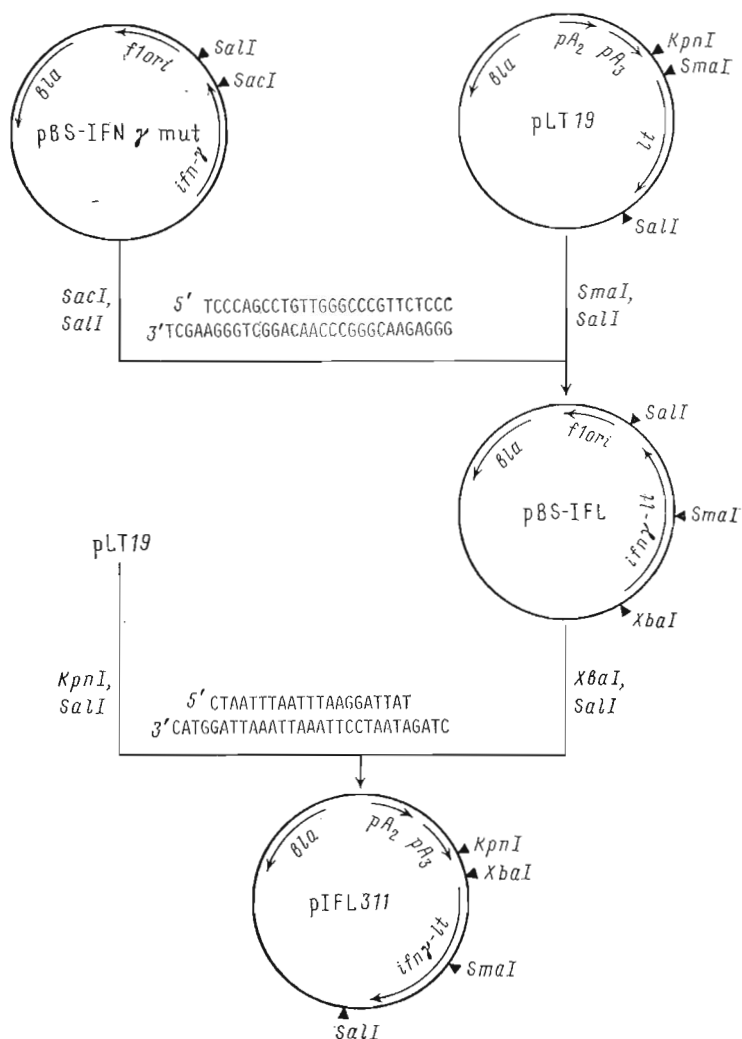


Рис. 4. Схема конструирования плазмиды, содержащей ген гибридного белка IFN γ — TNF β

нантного IFN γ . Оказалось, что из 12 исследованных штаммов наивысший уровень экспрессии наблюдался в клетках *E. coli* SG20050, являющихся мутантами по *lon*-протеиназе. Интересно, что уровень экспрессии гибридного гена *ifn γ -tnf α* в клетках, несущих плазмиду pIFT313, несколько выше, чем в клетках, содержащих плазмиду pIFT311. Очевидно, это связано с наличием трех тандемных рибосомсвязывающих участков.

На рис. 5 показаны результаты анализа электрофорезом в SDS-ПААГ и иммуноблоттингом суммарного белка клеток бактерий, содержащих плазмиды pIF311, pIF313 и pIFL311. Как и ожидалось, клетки бактерий с плазмидами синтезируют дополнительно белок с молекулярной массой около 34 кДа, взаимодействующий в блоте в случае плазмид pIFT311 и pIFT313 как с антителами против TNF α , так и с антителами против IFN γ , а в случае плазмиды pIFL311 — с антителами против TNF β и с антителами против IFN γ , что свидетельствует о биосинтезе в клетках *E. coli* ожидаемых гибридных белков. Дополнительное подтверждение этому получили при исследовании биологической активности клеточных лизатов. Оказалось, что лизаты клеток *E. coli*, содержащих плазмиды pIFT31, pIFT311, pIFT313 и pIFL311, в отличие от клеток без плазмиды или с плазмидой pIFN γ обладали высоким уровнем цитотоксической активности в классическом тесте на клетках трансформированных мышинных фибробластов линии L929.

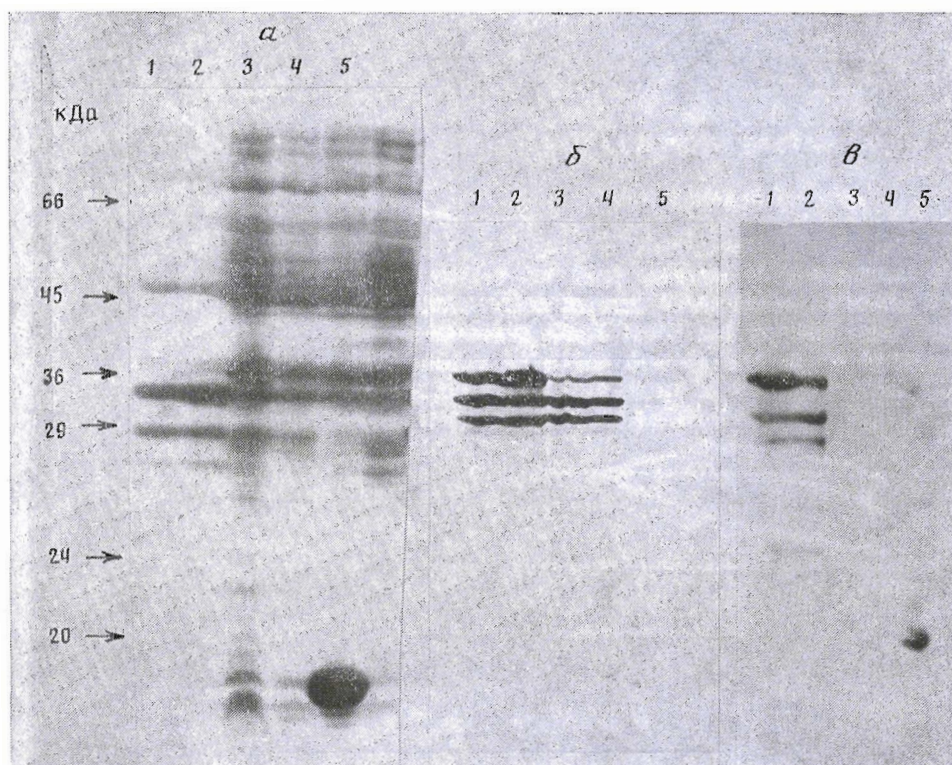


Рис. 5. Анализ методом электрофореза и иммуноблоттинга продуктов экспрессии полученных в данной работе гибридных генов: *a* — электрофорез суммарных клеточных экстрактов *E. coli*, содержащих плазмиды pIFT311 (1), pIFT313 (2), pIFL313 (3, 4), pTNF31Δ (5); *б* — иммуноблот с моноклональными антителами против рекомбинантного IFNγ клеточных экстрактов *E. coli* с плазмидами pIFT311 (1), pIFT313 (2), pIFL311 (3, 4), pTNF31Δ (5); *в* — иммуноблот с поликлональной антисывороткой против рекомбинантного TNFα клеточных экстрактов *E. coli* с плазмидами pIFT313 (1), pIFT311 (2), pIFL311 (3, 4), pTNF31Δ (5). Стрелками показана подвижность белков-маркеров

Следует упомянуть, что недавно в работе [21] было описано конструирование двух вариантов гибридного гена *ifnγ*—*tnfβ* и изучена экспрессия этих генов, причем в обоих вариантах был использован не полный ген *tnfβ*, а его делеционный мутант, кодирующий белок без 23 N-концевых аминокислотных остатков, а ген *ifnγ* был либо полным, либо был укорочен с 3'-конца на 39 нуклеотидов и, таким образом, кодировал укороченный на 13 аминокислот с C-конца белок. При экспрессии этих генов было установлено, что гибридный белок с полной последовательностью IFNγ практически полностью деградировал в клетках *E. coli*, в то время как гибрид с укороченной последовательностью IFNγ был вполне устойчив.

Проведенный нами анализ методом иммуноблоттинга гибридных белков IFNγ—TNFα и IFNγ—TNFβ показывает, что в клетках *E. coli* происходит их частичная деградация, причем гибрид IFNγ—TNFβ подвергается более глубокому протеолитическому расщеплению по сравнению с гибридом IFNγ—TNFα. Механизм деградации рекомбинантных белков в клетках бактерий к настоящему времени остается неясным, хотя само явление нестабильности рекомбинантных, в особенности гибридных, белков описано и в других работах [13, 21].

Таким образом, сконструированы рекомбинантные плазмиды, обеспечивающие достаточно высокий уровень биосинтеза в клетках *E. coli* гибридных белков IFNγ—TNFα и IFNγ—TNFβ. Эти белки накапливаются в клетках в растворимом виде, но подвергаются частичной деградации. Они сочетают в себе иммунологические свойства составляющих их

лимфокинов, а также обладают свойственной TNF цитотоксичностью в тестах на мышинных фибробластах L929.

Авторы выражают благодарность чл.-кор. АН СССР Е. Д. Свердлову и С. А. Цареву за плазмиду pIFN γ с геном иммунного интерферона, а также В. М. Афанасьеву (Институт иммунологии Минмедпрома, г. Чехов) за пероксидазный конъюгат моноклональных антител против IFN γ .

Экспериментальная часть

В работе использованы dNTP фирмы Pharmacia-P-L (Швеция), [γ - 32 P]rATP и эндонуклеаза *SacI* фирмы Amersham (Англия); рестрикционные эндонуклеазы *HindIII*, *PstI*, *ClaI*, *XhoI*, *XbaI*, *KpnI*, *SmaI*, *SalI*, *HaeIII* и ДНК-полимераза *Thermus aquaticus* НПО «Фермент» (Вильнюс). ДНК-лигазу и Т4-полинуклеотидкиназу выделяли модифицированным способом [25], а ДНК-полимеразу I *E. coli* (фрагмент Кленова) получали из штамма-суперпродуцента модифицированным способом [26]. Конъюгат пероксидазы хрена с моноклональными антителами против рекомбинантного IFN γ получен из Института иммунологии Минмедпрома.

Синтез олигонуклеотидов выполняли твердофазным методом на автоматическом синтезаторе «System 1 plus» (Beckman, США) с использованием Н-фосфонатных синтонов, активируемых пивалоилхлоридом или адамантоилхлоридом, как описано в работе [27]; олигонуклеотиды очищали электрофорезом в денатурирующем ПААГ с последующей ВЭЖХ.

Клонирование и скрининг рекомбинантных клонов методом гибридизации с олигонуклеотидным зондом проводили как описано в работе [28].

Одноцепочечную ДНК рекомбинантных фагмид выделяли по методике, рекомендуемой фирмой Stratagene, с небольшими изменениями. Клетки *E. coli* XL1 или BW313, содержащие рекомбинантную фагмиду, выращивали на богатой среде, содержащей 3,5% бактотриптона, 2% дрожжевого экстракта, 0,5% NaCl, до мутности 0,3 в объеме 10 мл, затем добавляли фаг-помощник VCSM13 (Stratagene) при множественности инфекции 20 бляшкообразующих единиц на клетку и инкубировали 6—8 ч при 37° С. После этого клетки осаждали центрифугированием, а к супернатанту добавляли 1,3 мл раствора 20% полиэтиленгликоля 6000 с 2,5 М NaCl, выдерживали 15 мин при 20° С, после чего центрифугировали 20 мин при 11 000g. Осадок растворяли в 300 мкл ТЕ-буфера, содержащего 10 мМ трис-HCl (pH 8,0) и 0,1 мМ EDTA, экстрагировали фенолом и хлороформом по стандартному методу, переосаждали спиртом и растворяли в подходящем объеме буфера TE.

Направленный мутагенез осуществляли как описано в работах [23, 24] с некоторыми изменениями. Одноцепочечную ДНК для проведения мутагенеза получали как описано выше, причем перед внесением фаг-помощника в среду добавляли уридин до концентрации 0,25 мкг/мл. Для отжига готовили смесь 0,5 пмоль одноцепочечной матрицы, 10 пмоль 5'-фосфорилированного мутагенизирующего олигонуклеотида, 20 мМ трис-HCl (pH 7,5), 10 мМ MgCl₂, 50 мМ NaCl, 1 мМ дитиотреит, нагревали до 70° С и охлаждали до комнатной температуры. Во время отжига готовили 100 мкл раствора, содержащего dNTP (0,8 мМ каждый), 1 мМ rATP, 3 ед. акт. ДНК-лигазы, 2 ед. акт. ДНК-полимеразы (фрагмента Кленова), 20 мМ трис-HCl (pH 7,5), 10 мМ MgCl₂, 10 мМ дитиотреит, который затем смешивали с вышеприготовленным раствором после отжига в отношении 1 : 1 и инкубировали 30 мин при 37° С. После достройки этой смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli* XL1.

Секвенирование одноцепочечной матрицы с помощью ДНК-полимеразы *T. aquaticus* и меченого праймера (универсальный M13-праймер) проводили как описано в работе [29]. Для секвенирования также использовали двухцепочечную суперскрученную плазмидную ДНК, выделенную стандартным способом «минипреп».

Белковый электрофорез и иммуноблоттинг проводили как описано в работе [17].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Pestska S., Langer J.* // Ann. Rev. Biochem. 1987. V. 56. P. 727—777.
2. *Pennica D., Nedwin G., Hayflick J., Seeburg P., Derynck R., Palladino M., Kohr W., Aggarwal B., Goeddel D.* // Nature. 1984. V. 312. № 5996. P. 724—729.
3. *Ruff M. R., Gillford G. E.* // Lymphokines. V. 2/Ed. Rick E. N. Y.: Acad. Press, 1981. P. 235.
4. *Old L. J.* // Science. 1985. V. 230. № 4726. P. 630—632.
5. *Sugarman B. J., Aggarwal B. B., Hass P. E., Figari J. S., Palladino M. A., Shepard H. M.* // Science. 1985. V. 230. № 4728. P. 943—945.
6. *Williamson B. D., Carswell E. A., Rubin B. Y., Prendergast J. S., Old L. J.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1983. V. 80. № 17. P. 5397—5401.
7. *Lee S., Aggarwal B. B., Rinderknecht E., Assisi F., Chiu H.* // J. Immunol. 1984. V. 133. № 3. P. 1083—1086.
8. *Fransen L., Van der Heyden J., Ruyschaert R., Fiers W.* // Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 1986. V. 22. № 4. P. 419—426.
9. *Gray P. W., Aggarwal B. B., Benton C. V., Bringman T. S., Henzel W. J., Jarrett J. A., Leung D. W., Moffat B., Ng P., Svedersky L. P., Palladino M. A., Nedwin G. E.* // Nature. 1984. V. 312. № 5996. P. 721—724.
10. *Lewis G. D., Aggarwal B. B., Eessalu T. E., Sugarman B. J., Shepard H. M.* // Cancer Res. 1987. V. 47. № 20. P. 5382—5385.
11. *Chang R. J., Lee S. N.* // J. Immunol. 1986. V. 137. № 9. P. 2853—2856.
12. *Seno M., Hinuma S., Onda H., Igarashi K.* // FEBS Lett. 1986. V. 199. № 2. P. 187—192.
13. *Williams D. P., Parker K., Bacha P., Bishai W., Borowski M., Genbauffe F., Strom T. B., Murphy J. R.* // Protein Engineering. 1987. V. 1. № 6. P. 493—498.
14. *Chaudhary V. K., Queen C., Junghans R. P., Waldmann T. A., Fitzgerald D. J., Pastan I.* // Nature. 1989. V. 339. № 6223. P. 394—397.
15. *Kim J., Weaver R. F.* // Gene. 1988. V. 68. № 2. P. 315—321.
16. *Nedospasov S. A., Shakhov A. N., Turetskaya R. L., Mett V. A., Azizov M. M., Georgiev G. P., Korobko V. G., Dobrynin V. N., Filippov S. A., Bystrov N. S., Boldyreva E. F., Chuwpilo S. A., Chumakov A. M., Shingarova L. N., Ovchinnikov Yu. A.* // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1986. V. LI. P. 611—624.
17. *Добрынин В. Н., Беркова Н. П., Болдырева Е. Ф., Быстров Н. С., Кравченко В. В., Филиппов С. А., Чувило С. А., Шамборант О. Г., Коробко В. Г.* // Биоорган. химия. 1988. Т. 14. № 11. С. 1530—1537.
18. *Mark D. F., Wang A. M., Lander M. B., Creasey A. A., Lin L. S., Van Arsdell J. N.* // PCT/US85/01921.
19. *Aggarwal B. B., Moffat B., Harkins R. N.* // J. Biol. Chem. 1984. V. 262. № 2.
20. *Korobko V. G., Dobrynin V. N., Shingarova L. N., Filippov S. A., Maksimova Yu. N., Davydov I. V.* // 2nd International conference on tumor necrosis factor and related cytokines. 1989. Abstracts. P. 21.
21. *Feng G., Gray P. W., Shepard H. M., Taylor M. W.* // Science. 1988. V. 241. № 4872. P. 1501—1503.
22. *Sverdlov E. D., Tsarev S. A., Krykbaev R. A., Chernov I. P., Rostapshov V. M.* // FEBS Lett. 1987. V. 212. № 2. P. 233—236.
23. *Kunkel T. A.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. № 2. P. 488—492.
24. *McClary J. A., Witney F., Geisselsoder J.* // BioTechniques. 1989. V. 7. № 3.
25. *Dolganov G. M., Chestukhin A. M., Shemyakin M. F.* // Eur. J. Biochem. 1981. V. 114. № 2. P. 247—254.
26. *Klenow H., Henning L.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1970. V. 65. № 1.
27. *Филиппов С. А., Есипов Д. С., Калинин С. В., Добрынин В. Н.* // Биоорган. химия. 1989. Т. 15. № 4. С. 527—529.
28. *Коробко В. Г., Добрынин В. Н., Северцова И. В., Болдырева Е. Ф., Шингарова Л. Н., Чувило С. А., Филиппова Л. Ю., Звонок Н. М., Васильева Т. Е., Колосов М. Н.* // Биоорган. химия. 1987. Т. 13. № 1. С. 69—81.
29. *Innes M. A., Myambo K. B., Gelfand D. H., Brow M. A.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. № 24. P. 9436—9440.

Поступила в редакцию
17.V.1990

V. G. KOROBKO, I. V. DAVYDOV, L. N. SHINGAROVA, [S. A. FILIPPOV],

D. S. ESIPOV, N. P. BERKOVA, V. N. DOBYNIN

**GENES FOR HUMAN HYBRID LYMPHOKINES. I. CONSTRUCTION OF
RECOMBINANT PLASMIDS CODING FOR HYBRID PROTEINS BETWEEN
HUMAN IMMUNE INTERFERON AND HUMAN TUMOUR NECROSIS FACTORS**

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

Recombinant plasmids coding for hybrid proteins between human interferon γ and human tumour necrosis factor α or β have been constructed using site-directed mutagenesis. The genes were fused via a synthetic oligonucleotide linker coding for tetrapeptide Pro-Val-Gly-Pro. The fused genes were expressed in *Escherichia coli* under control of early promoters of bacteriophage T7. *E. coli* cells harbouring the plasmids with the hybrid genes gave rather high level of the fused proteins biosynthesis. The hybrid recombinant proteins proved to be unstable in *E. coli* cells.