



УДК 577.213.7;577.218

ЭКСПРЕССИЯ СИНТЕТИЧЕСКОГО ГЕНА ИНТЕРЛЕЙКИНА-10 ЧЕЛОВЕКА И ЕГО ВАРИАНТОВ В КЛЕТКАХ *Escherichia coli*

© 1998 г. Л. Р. Птицын[#], И. Б. Альтман, М. В. Гуров*Государственный научный центр ГосНИИ "Генетика",
113545, Москва, 1-й Дорожный пр., 1;

*НТЦ "Лекбиотех", АО "Биотехнология", Москва

Поступила в редакцию 21.04.97 г. Принята к печати 09.09.97 г.

Химико-ферментативным путем синтезирован ген интерлейкина-10 (IL-10) человека. Получены векторы для цитоплазматической и периплазматической экспрессии гена рекомбинантного IL-10 в клетках *Escherichia coli*. С помощью *in vitro*-мутагенеза получена серия генов IL-10, несущих замены нуклеотидов в районе, предшествующем АТГ-кодону, а также обеспечивающих замену второго аминокислотного остатка в последовательности белка IL-10. Показано, что высокий уровень биосинтеза целевого белка имеет место в рекомбинантных штаммах, продуцирующих IL-10 в виде "слитого" белка (с N-концевым фрагментом IL-3), а также в штаммах, продуцирующих мутантный вариант IL-10, содержащий остаток цистеина в качестве второго аминокислотного остатка.

Ключевые слова: интерлейкин-10, синтез гена, экспрессия мутантных вариантов, штамм-продуцент.

Интерлейкин-10 (IL-10) был впервые обнаружен как продукт хелперных Т-клеток мыши типа 2 (Th2) и сначала получил название "фактор – ингибитор синтеза цитокинов" (cytokine synthesis inhibitory factor – CSIF) в связи со своей способностью ингибировать синтез ряда цитокинов (таких, как γ -интерферон, интерлейкин-2, интерлейкин-3, фактор некроза опухолей, колониестимулирующий фактор гранулоцитов и макрофагов) хелперными Т-клетками типа 1 (Th1) [1, 2]. Последующие исследования показали, что продукция IL-10 осуществляется активированными Т-, В-клетками, кератиноцитами и моноцитами/макрофагами [3]. Интерлейкины-10 как мыши, так и человека проявляют множественные биологические активности, в частности: костимулируют пролиферацию и дифференциацию В-клеток человека [4], тимоцитов мыши, Т-клеток [5], тучных клеток [6], регулируют биосинтез главного комплекса гистосовместимости (МНС) II класса В-клетками мыши [7]. Для IL-10 мыши показано наличие клеточного рецептора (IL-10R), относящегося к классу II (группа рецепторов, подобных рецептору интерферона) семейства цитокиновых рецепторов [8]. Предполагается, что в связи с наличием иммунорегуляторных свойств IL-10 будет иметь широкое клиническое применение, в частности при разнообразных аутоиммунных заболе-

ваниях, а также как потенциальное противовоспалительное средство [2].

В данной работе нами был получен синтетический ген *il-10* человека и исследована возможность его экспрессии в клетках *E. coli* с использованием нескольких экспрессионных систем. Структура искусственного гена *il-10* основана на опубликованной аминокислотной последовательности белка IL-10 [9] с учетом встречаемости кодонов в клетках *E. coli* [10], а также с учетом введения в последовательность ДНК сайтов рестриктаз, необходимых для последующего химико-ферментативного синтеза гена и его клонирования. Для конструирования синтетического гена *il-10* человека и несущих ген экспрессионных векторов были синтезированы 30 олигонуклеотидов, структура которых приведена в табл. 1. Для получения вариантов гена *il-10*, содержащих вырожденную последовательность ДНК в нетранслируемом участке, прилежащем к АТГ-кодону, а также обеспечивающих замену второй аминокислоты в структуре белка и все возможные варианты кодонов для 3-го, 4-го и 5-го аминокислотных остатков, были синтезированы олигонуклеотиды *var1* и *var2* (табл. 1).

Наличие в нуклеотидной цепи гена сайтов рестриктаз *NcoI*, *KpnI*, *PstI*, *HindIII* позволило осуществить его синтез путем последовательной сборки трех блоков (см. рис. 1). Три варианта первого блока (каждый из них состоял из соответствующей пары олигонуклеотидов: *ilnn1*, *ilnn2*; *ilf1*, *ilf2*; *ili1*, *ili2*) содержали последовательности ДНК (1–17),

Сокращения IL и *il* – интерлейкин и его ген; IPTG – изопропил- β -D-тиогалактозид; SD – последовательность Шайна – Дальгарно; RBS – участок связывания рибосомы.

[#]Автор для переписки.

Таблица 1. Олигонуклеотиды, синтезированные для конструирования гена интерлейкина-10 человека

Олигону- клеотид	Последовательность (5' → 3')
iln1	CCAGTCTGAGAACTCTTGCACTCACTTCCCAGGGTAACTTGCCGAACATGC
iln2	TGCGCGACCTGCGCGACGCTTTCTCTCGCGTTAAGACTTTCTTCCAGATGA
iln3	AAGACCAGCTGGACAACCTGCTGCTTAAAGAATCTCTGCTCGAAGACTT
iln4	CAAAGGTTACCTGGGTTGCCAGGCTCTGTCTGAAATGATCCAGTTCTAC
iln5	CTGGAAGAAGTTATGCCGCAGGCTGAGAACCAGGACCCGGACATCAAAGC
iln6	TCACGTTAACTCTCTGGGTGAAAACCTGAAAACCCTGCGTCTGCGTCTGC
iln7	GTCGCTGCCACCGTTTTCTGCGTGCGAGAACAATCCAAAGCTGTTG
iln8	AGCAGGTAAGAACGCATTCACAAGCTGCA
iln9	GCTTGTTGAATGCGTTCTTTACCTGCTCAACAGCTTTG
iln10	GATTTGTTCTCGCACGGCAGGAAACGGTGGCAGCGACGCAGACGCAG
iln11	ACGCAGGGTTTTACAGTTTTTCAACCCAGAGAGTTAACGTGAGCTTTGATGTC
iln12	CGGGTCTGGTTCTCAGCCTGCGGCATAACTTCTTCCAGGTAGAAGCTGG
iln13	ATCATTTTCAGACAGAGCCTGGCAACCCAGGTAACCTTTGAAGTCTTCG
iln14	AGCAGAGATTTCTTAAAGCAGCAGGTTGTCCAGCTGGTCTTTCATCTGGAA
iln15	GAAAGTCTTAAACGCGAGAGAAAGCGTCGCGCAGGTCGCGCAGCATGTTTC
iln16	GGCAGGTTACCCGGGAAGTGAGTGCAAGAGTTCTCAGACTGGGTAC
ilc1	GGAGAAAGGTATCTACAAAGCTATGTCTGAATTTGACATCTT
ilc2	CATCAACTACATTGAAGCATACATGACCATGAAAATCCGTAACATAACATCCA
ilc3	AGCTTGGATGTTAGTTACGGATTTTCATGGTCATGTATGCTTCAAT
ilc4	GTAGTTGATGAAGATGTCAAATTCAGACATAGCTTTGTAGATACSTTTCTCCTGCA
ilnn1	CATGTCTCCAGGTCAAGGTAC
ilnn2	CTTGACCTGGAGACAT
ilf1	AATTCACAGATCTCTCCAGGTCAAGGTAC
ilf2	CTTGACCTGGAGAGATCTGTG
ili1	AGCTTTCAACCGTGCTGTTAAATCTCTG
ili2	AATTCAGAGATTTAACAGCACGGTTGAA
ili3	AATTTGCTCGAGATCGAAGGTAGA
ili4	TCTACCTTCGATCTCGAGCA
var1*	TNNNNNATG(T/A)(C/G)NCCNGGNCA(A/G)GGTAC
var2*	C(T/C)TGNCNGGN(G/C)(A/T)CATNNNNNA

* N – любой из четырех возможных нуклеотидов в данной позиции.

кодирующие N-концевой фрагмент IL-10 (нумерация – в соответствии со структурой гена, приведенной на рис. 2). Второй блок, полученный при лигировании 16 олигонуклеотидов, представлял собой основной фрагмент гена *il-10* (18–395), кодирующий центральную часть белка. Третий блок содержал фрагмент гена *il-10* (396–480), кодирующий C-концевой фрагмент белка. Полученные фрагменты ДНК (блоки II и III) клонировали соответственно в векторы pUC18/*KpnI-PstI* и pUC18/*PstI-HindIII*. Плазмиды pUC18-II и pUC18-III, содержащие правильные последовательности фрагментов гена *il-10*, использовали для конструирования плазмиды pUCnc, несущей

основную часть гена *il-10* (18–480) (рис. 1). Фрагмент *KpnI-HindIII* (471) плазмиды pUCnc и соответствующие пары олигонуклеотидов, кодирующие N-концевую часть IL-10, использовали для конструирования всех экспрессионных векторов, содержащих полную последовательность гена зрелого белка IL-10 (рис. 2).

Два первых варианта экспрессионных плазмид (pKKIL-10 и pVTIL-10, рис. 3а) были получены путем клонирования полной последовательности гена (для этого *KpnI-HindIII*-фрагмент плазмиды pUCnc лигировали с олигонуклеотидами ilnn1 и ilnn2) в векторах pKK233-3/*NcoI-HindIII* и pVTIL-3/*NcoI-HindIII* [11]. Последний вектор со-

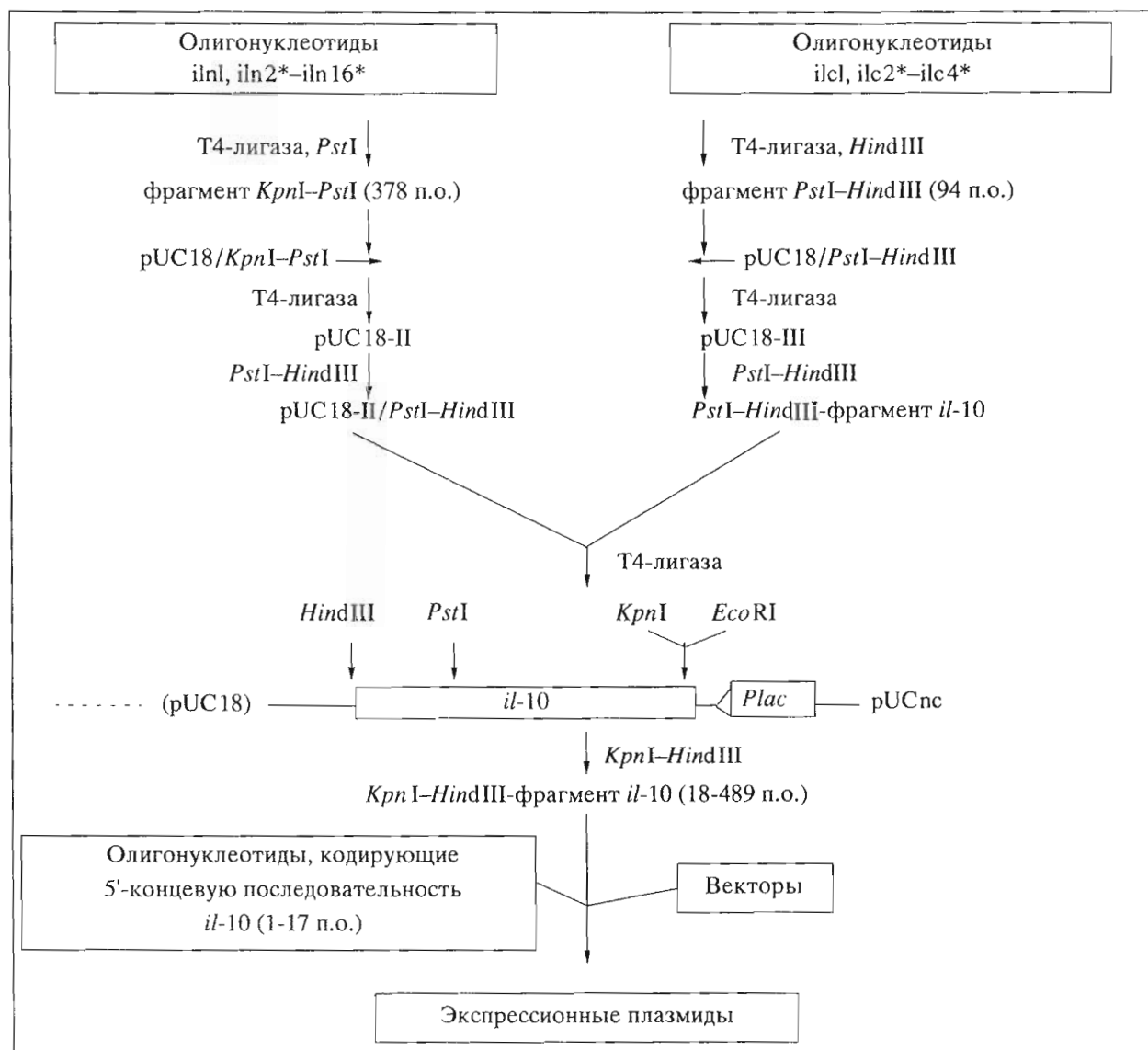


Рис. 1. Синтез гена *il-10*. Звездочкой помечены фосфорилированные олигонуклеотиды. Указаны экзонуклеазы рестрикции и их сайты в структуре полученных фрагментов; плазмиды, образующиеся при промежуточном клонировании частей синтетического гена; использованные для синтеза олигонуклеотиды, структура которых приведена в табл. 1. Указаны длина синтетических фрагментов (п.о.) или их положение в гене в соответствии с нумерацией на рис. 2.

держал промотор *P_{lac}*, два операторных участка связывания *Jac*-репрессора, обеспечивающих более эффективную регуляцию промотора, и RBS гена белка 10 фага T7 – эффективный усилитель трансляции белка [12]. Однако уровень экспрессии гена рекомбинантного белка в клетках *E. coli* TG1, несущих данные плазмиды, был очень низок и IL-10 не обнаруживался при SDS-электрофорезе суммарного клеточного белка (электрофореграммы не представлены). Попытка получения периплазматической продукции IL-10 с использованием гена *il-10*, слитого с геном лидерного пептида белка *OmpF* *E. coli* (*KpnI-HindIII*-фрагмент

гена лигировали с олигонуклеотидами *ilf1* и *ilf2* и клонировали в векторе *pVT-hEGF/EcoRI-HindIII* [13], рис. 3б), также оказалась неудачной. Таким образом, несмотря на использование двух вариантов RBS при прямой цитоплазматической экспрессии и достаточно эффективного лидерного пептида при периплазматической экспрессии, мы не получили существенного уровня продукции IL-10. Данный факт может быть связан как с протеолитическим расщеплением синтезируемого белка, так и с особенностями структуры мРНК IL-10.

Как известно, структура 5'-нетранслируемой области мРНК в значительной степени влияет на

1	10	KpnI	20	30	40	50
*	*	↓	*	*	*	*
TCTCCAGGTCAAGGTACCCAGTCTGAGAACTCTTGCACTCACTTCCCGGGTAAC						
SerProGlyGlnGlyThrGlnSerGluAsnSerCysThrHisPheProGlyAsn						
60	70	80	90	100	110	
*	*	*	*	*	*	*
CTGCCGAACATGCTGCGCGACCTGCGCGACGCTTCTCTCGCGTTAAGACTTTCTTC						
LeuProAsnMetLeuArgAspLeuArgAspAlaPheSerArgValLysThrPhePhe						
120	130	140	150	160		
*	*	*	*	*		
CAGATGAAAGACCAGCTGGACAACCTGCTGCTTAAAGAATCTCTGCTCGAAGACTTC						
GlnMetLysAspGlnLeuAspAsnLeuLeuLeuLysGluSerLeuLeuGluAspPhe						
170	180	190	200	210	220	
*	*	*	*	*	*	*
AAAGTTACCTGGGTTGCCAGGCTCTGTCTGAAATGATCCAGTTCTACCTGGAAGAA						
LysGlyTyrLeuGlyCysGlnAlaLeuSerGluMetIleGlnPheTyrLeuGluGlu						
230	240	250	260	270	280	
*	*	*	*	*	*	*
GTTATGCCCGCAGGCTGAGAACCAGGACCCGGACATCAAAGCTCACGTTAACTCTCTG						
ValMetProGlnAlaGluAsnGlnAspProAspIleLysAlaHisValAsnSerLeu						
290	300	310	320	330		
*	*	*	*	*		
GGTGA AACCTGAAAACCTGCGTCTGCGTCTGCGTCGCTGCCACCGTTTCCTGCCG						
GlyGluAsnLeuLysThrLeuArgLeuArgLeuArgArgCysHisArgPheLeuPro						
340	350	360	370	380	390	PstI
*	*	*	*	*	*	↓
TGCGAGAACAATCCAAAGCTGTTGAGCAGGTAAAGAACGCATTCAACAAGCTGCAG						
CysGluAsnLysSerLysAlaValGluGlnValLysAsnAlaPheAsnLysLeuGln						
400	410	420	430	440	450	
*	*	*	*	*	*	*
GAGAAAGGTATCTACAAAGCTATGTCTGAATTTGACATCTTCATCAACTACATTGAA						
GluLysGlyIleTyrLysAlaMetSerGluPheAspIlePheIleAsnTyrIleGlu						
460	470	480	HindIII			
*	*	*	↓*			
GCATACATGACCATGAAAATCCGTAACATAACATCCAagctt						
AlaTyrMetThrMetLysIleArgAsn---						

Рис. 2. Структура синтетического гена и соответствующая аминокислотная последовательность зрелого белка IL-10 человека. Стрелками указаны сайты эндонуклеаз рестрикции.

уровень биосинтеза белка. Показано, что вовлечение нуклеотидов, формирующих последовательности RBS, и/или стартового кодона AUG в двухцепочечные участки вторичной структуры мРНК, как правило, приводит к снижению эффективности процесса биосинтеза [14, 15]. Для исследования влияния структуры 5'-нетранслируемой области мРНК, прилегающей к AUG-кодону, на уровень синтеза рекомбинантного белка 5'-концевой фрагмент гена *il-10* плазмиды рVTIL-10 был заменен на фрагмент следующей структуры,

полученный при отжиге синтетических олигонуклеотидов var1 и var2:

TNNNNN ATG (A/T)(G/C)N CCN GGN CA(A/G) GGT AC
ANNNNN TAC (T/A)(C/G)N GGN CCN GT(T/C) C

где N – любой из четырех нуклеотидов в данной позиции в последовательности гена.

Частичная рандомизация (т.е. случайное встраивание в результате химического синтеза

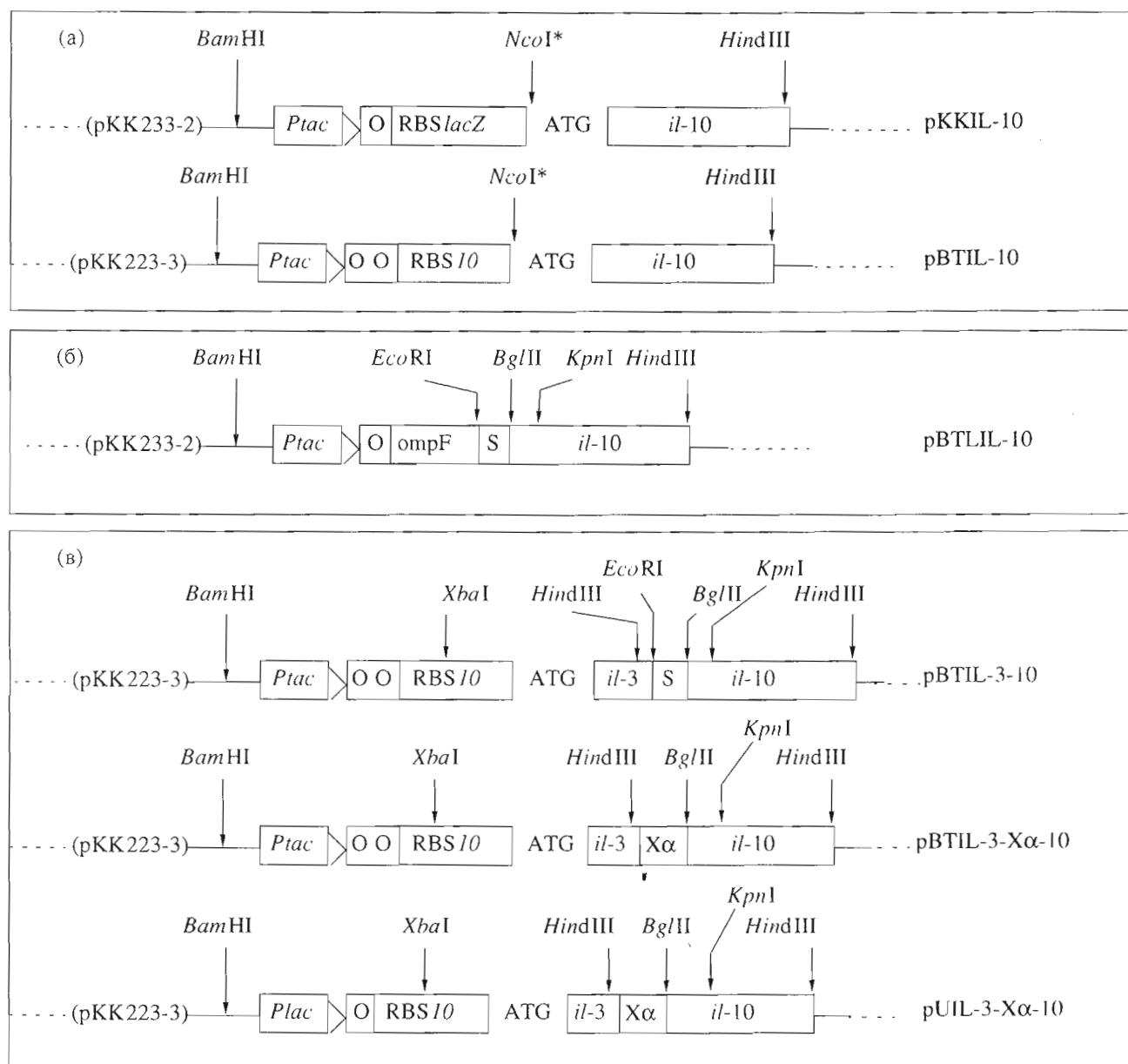


Рис. 3. Схемы плазмид, обеспечивающих экспрессию гена *il-10* человека. (а) – pKKIL-10, pBTIL-10; (б) – pBTLIL-10; (в) – pBTIL-3-10, pBTIL-3-Xα-10, pUIL-3-Xα-10.

Ptac, *Ptac*, *Puvr* – промоторы; O – операторный участок связывания *lac*-репрессора; RBS_{lacZ} и RBS₁₀ – сайты связывания рибосом гена *lacZ* и гена *10* фага T7; ATG – стартовый кодон; *ompF* – фрагмент гена *ompF*, содержащий 5'-нетранслируемую последовательность и последовательность, кодирующую лидерный пептид белка *OmpF E. coli*; *il-3* – фрагмент (204 п.о.) гена интерлейкина-3; S – спейсерный участок ДНК, кодирующий последовательность аминокислот -Asn-Ser-Gln-Ile; *il-10* – ген интерлейкина-10 человека; Xα – последовательность, кодирующая сайт расщепления для протеиназы Xα (-Ile-Glu-Gly-Arg-). Штриховая линия – последовательность плазмид pKK223-3 или pKK233-2. *Nco*I* – утраченный сайт.

одного из возможных оснований в каждое конкретное место последовательности) 5'-концевого участка гена между SD-последовательностью и кодоном шестой аминокислоты IL-10, как мы полагали, позволит получить структуры мРНК, более эффективные для инициации трансляции. Использование последовательностей (A/T)(G/C)N в

качестве кодона второй аминокислоты белка обеспечивало возможность синтеза мутантных вариантов IL-10, содержащих во второй позиции аминокислотные остатки Ser, Arg, Cys, Trp, Thr или терминирующий кодон UGA. Известно [16], что тип аминокислоты во второй позиции последовательности также может влиять на уровень

Таблица 2. Структура 5'-концевой области рекомбинантных плазмид pBTVarIL-10-n

Клон	Последовательность 5'-концевого фрагмента	Аминокислотный остаток в позиции 2	Наличие рекомбинантного продукта
pBTVarIL-10-1	tagacgATG TGA CCAGGGCAGGGT	stop	-
pBTVarIL-10-2	taggaaATG TGT CCGGGACAAGGT	Cys	+ (19 кДа)
pBTVarIL-10-3	tccattATG TGC CCAGGGCAGGGT	Cys	-
pBTVarIL-10-10	tgaccgATG TGA CCCGGTCAGGGT	stop	-
pBTVarIL-10-36	taaagaATG TCT CCTGGGCAGGGT	Ser	-
pBTIL-10 (исх.)	atatccATG TCT CCAGGTCAAGGT	Ser	-

продукции белка, а введение добавочного остатка цистеина может усиливать эффективность процесса формирования телец включения при синтезе рекомбинантного полипептида.

Серия плазмид pBTVarIL-10, содержащих варианты последовательности гена *il-10*, была получена при клонировании в векторе pBTIL-10/*Bam*HI-*Kpn*I фрагмента *Bam*HI-*Eco*RV плазмиды pTOTE2-IL-3 [17], несущего промотор *Ptac*, два *lac*-операторных участка и RBS гена белка 10 фага T7, а также смеси олигонуклеотидов *var1* и *var2*.

Методом SDS-электрофореза мы анализировали уровень продукции рекомбинантного белка в 40 клонах штамма TG1(pBTVarIL-10). Было показано, что только один клон TG1(pBTVarIL-10-2) в присутствии IPTG продуцирует рекомбинант-

ный полипептид с молекулярной массой 19 кДа в виде телец включения; продукт составляет около 20% суммарного клеточного белка. В клоне TG1(pBTVarIL-10-3) при выращивании в присутствии IPTG данный полипептид не обнаруживался (табл. 2, рис. 4). Во всех остальных случаях также не наблюдалось образования существенных количеств рекомбинантных продуктов. Следует отметить, что рост пяти штаммов, в том числе и двух, описанных выше, существенно замедлялся в присутствии IPTG. Результаты секвенирования соответствующих фрагментов ДНК рекомбинантных плазмид, выделенных из этих клонов, представлены в табл. 2. Как видно, образование рекомбинантного белка (очевидно, в тельцах включения) имеет место только в случае мутантного варианта, содержащего остаток Cys во втором положении.

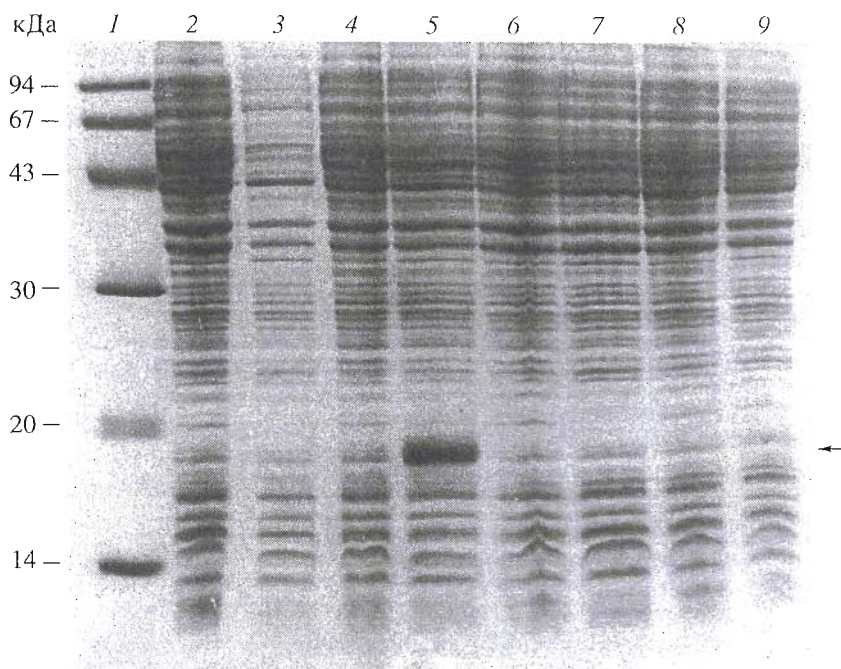


Рис. 4. Электрофореграммы препаратов суммарного клеточного белка штаммов *E. coli* TG1 (pBTVarIL-10-n), варианты 1 – 3, 36, выращенных в отсутствие (2, 4, 6, 8) и в присутствии IPTG (3, 5, 7, 9). 1 – маркеры молекулярных масс. Стрелкой указано положение целевого продукта.

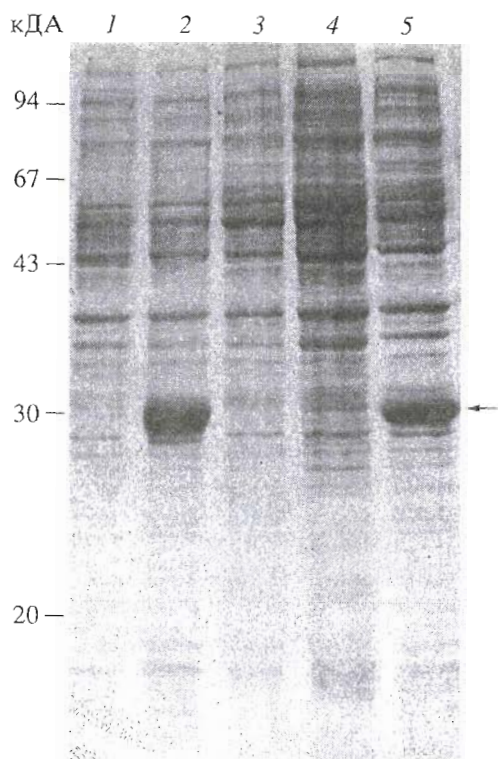


Рис. 5. Электрофореграммы препаратов суммарного клеточного белка штаммов *E. coli* TG1(pVTIL-3-X α -10) (2, 3) и TG1(pUIL-3-X α -10) (4, 5), выращенных в отсутствие (2, 4) и в присутствии IPTG (3, 5). 1 – штамм TG1(pKK223-3), использован в качестве контрольного препарата. Стрелкой указано положение целевого продукта. Слева указано положение маркеров молекулярных масс.

Анализ формирования вторичной структуры мРНК мутантных вариантов белка IL-10(Cys-2) показал, что для варианта, кодируемого плазмидой pBTVarIL-10-3, в отличие от pBTVarIL-10-2 характерно участие нуклеотидов последовательности SD и кодона AUG в формировании шпильчатых структур, что может снижать эффективность трансляции мРНК (данные не представлены). Возможно, уменьшение скорости биосинтеза рекомбинантного белка замедляет процесс формирования телец включения и, как следствие, ведет к интенсивному протеолитическому расщеплению растворимой формы IL-10(Cys-2) цитоплазматическими протеиназами в штамме TG1(pBTVarIL-10-3). Следовательно, уровень продукции рекомбинантного белка в виде телец включения зависит как от структуры мРНК в районе кодона AUG, определяющей эффективность трансляции, так и от типа второго аминокислотного остатка в молекуле белка. Появление добавочного остатка Cys в белке способствует образованию телец включения. Следует подчеркнуть, что нами анализировалась лишь малая часть из теоретически возможных вариантов структур (более 50000 вариантов).

Как известно, в ряде случаев достаточно хорошие результаты могут быть достигнуты при экспрессии рекомбинантных полипептидов в виде “слитых” белков.

Ранее нами была получена рекомбинантная плазмида pVTIL-3 [11], обеспечивающая высокоэффективную экспрессию гена *il-3* человека. Сконструированная с использованием pVTIL-3 плазмида pVTIL-3-10 (рис. 3в) несет ген *il-10*, “слитый” с 5'-концевым фрагментом гена *il-3* (кодирующим N-концевой фрагмент IL-3 размером 69 а.о.) посредством спейсера, кодирующего фрагмент -Asn-Ser-Gln-Ile-. Штамм TG1(pVTIL-3-10) продуцирует рекомбинантный полипептид с молекулярной массой около 28 кДа, что соответствует размеру гибридного белка “фрагмент IL-3-IL-10”.

При изучении уровня продукции гибридного белка в зависимости от условий выращивания культуры было показано, что штамм продуцирует рекомбинантный полипептид в количестве около 30% суммарного клеточного белка при его выращивании в богатой среде при 37°C в условиях репрессии промотора *Ptac*. Увеличение уровня экспрессии гена гибридного белка путем дерепрессии промотора *Ptac* (в присутствии IPTG) сопровождается гибелью продуцирующих клеток, что в целом приводит к значительному уменьшению количества целевого продукта в культуре. Конститутивный синтез рекомбинантного продукта оказывает некоторый токсический эффект на штамм, что сопровождается снижением количества плазмидсодержащих клеток в культуре при ее продолжительном культивировании. Поэтому культуру необходимо поддерживать на минимальном агаре (без казаминовых кислот), содержащем 30 мкг/мл ампициллина, для обеспечения селекции клеток, эффективно продуцирующих гибридный белок.

Дальнейшая модификация данного экспрессионного вектора осуществлялась с целью, во-первых, введения фрагмента ДНК, кодирующего сайт расщепления протеиназы X α , и, во-вторых, достижения регулируемой экспрессии гена рекомбинантного белка. Для этого фрагмент *EcoRI*-*Bgl*II плазмиды pVTIL-3-10 был заменен на последовательность, кодирующую сайт расщепления для протеиназы X α (-Ile-Glu-Gly-Arg-), с использованием синтетических олигонуклеотидов *ili3* и *ili4* (рис. 3в). Штамм TG1(pVTIL-3-X α -10) при выращивании в условиях репрессии промотора *Ptac* также обеспечивает достаточно высокий уровень продукции IL-10 в виде “слитого” полипептида (около 30% суммарного клеточного белка) (рис. 5).

Для осуществления регулируемого биосинтеза гибридного белка была сконструирована плазмида pUIL-3-X α -10 (рис. 3в), экспрессия рекомби-

нантного гена в которой контролируется промотором *Plac*. Плазмида была получена путем замены фрагмента *Bam*HI(*Кленов*)-*Xba*I в плазмиде *pVTIL-3-X α -10* на фрагмент *Pvu*II-*Xba*I плазмиды *pUC-IL-4* [11], содержащий последовательность промотора *Plac* и дистальную часть RBS гена *l0* фага T7. Штамм TG1(*pUIL-3-X α -10*) выращивали в среде LB в отсутствие и в присутствии IPTG. Как видно из рис. 5, в отсутствие индуктора синтез гибридного белка незначителен, в то время как в присутствии IPTG уровень его сравним с таковым в описанных выше штаммах.

Таким образом, мы показали, что в клетках *E. coli* может быть получена высокоэффективная цитоплазматическая экспрессия IL-10 в виде "слитого" белка. Проведенные нами предварительные эксперименты по выделению и очистке данного рекомбинантного продукта свидетельствуют, что гомогенный препарат может быть получен с использованием стандартных процедур выделения телец включения путем растворения их в денатурирующих условиях и перевода "слитого" белка в растворимое состояние в условиях, обеспечивающих его ренатурацию. Следовательно, препарат может быть использован для получения зрелого IL-10 человека при протеолитическом расщеплении его протеиназой *X α* .

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез олигонуклеотидов был осуществлен на автоматическом четырехколоночном синтезаторе ДНК фирмы MilliGen/Biosearch model 8700 с использованием фосфоамидитного метода. Олигонуклеотиды очищали с помощью ВЭЖХ первоначально на ионообменной колонке (4.6 × 250 мм) Synchropak AX 300 (SynChrom Inc., США) в линейном градиенте концентрации (0 → 0.6 М) сульфата аммония в растворе, содержащем 0.05 М дигидрофосфат калия в 60% формаиде, с последующей обращенно-фазовой хроматографией на колонке (4 × 250 мм) Nucleosil 300-5-C18 (Macherey-Nagel) в градиенте концентрации ацетонитрила (0 → 50%) в 0.1 М ацетате аммония. После хроматографии растворы олигонуклеотидов обессоливали на колонке TSKgel G2000S_W (Toyo Soda, Япония).

Фосфорилирование олигонуклеотидов осуществляли с помощью T4-полинуклеотидкиназы (Pharmacia, Швеция).

В работе использован штамм *E. coli* TG1 [18].

Культуры бактериальных клеток выращивали на среде LB или минимальной среде M9 в присутствии казаминовых кислот (0.5%). Продукцию рекомбинантного белка индуцировали добавлением IPTG до концентрации 0.5 мМ. Отбирали аликваты неиндуцированных и индуцированных культур и анализировали полученные из них пре-

параты суммарного клеточного белка путем электрофореза в ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия.

Все генно-инженерные манипуляции, электрофорез олигонуклеотидов, ДНК и белков в ПААГ, выращивание рекомбинантных штаммов, лизис клеток проводили по стандартным методикам [18] с использованием реактивов фирмы Serva (Германия), рестриктаз и T4-лигазы (Pharmacia, Швеция).

Электрофореграммы гелей окрашивали ку-масси R250 и сканировали с использованием сканера гелей, модель CSD-200 (Beckman, США).

Синтез гена *il-10*. Второй блок (18–395): 16 олигонуклеотидов (*iln1* не фосфорилирован, *iln2* – *iln16* фосфорилированы) смешивали (по 20 пмоль каждого) в 100 мкл буфера для лигирования, смесь отжигали, понижая температуру от 85 до 20°C в течение 2 ч, лигировали, затем синтезированную ДНК расщепляли рестриктазой *Pst*I, выделяли фрагмент ДНК второго блока гена *il-10* (378 п.о.) с помощью электрофореза в агарозном геле и клонировали его в векторе *pUC18/KpnI-PstI*. Третий блок гена *il-10* (94 п.о., последовательность 396–489) синтезировали по аналогичной схеме, используя 4 олигонуклеотида (*ilc1* не фосфорилирован, *ilc2*–*ilc4* фосфорилированы), и клонировали в векторе *pUC18/PstI-HindIII*.

Из полученных клонов выделяли плазмиды *pUC18-II* и *pUC18-III* соответственно.

Первичную структуру ДНК клонированных фрагментов определяли по Сэнгеру [19] с использованием α -³³P-меченых стандартных M13-праймеров (прямого и обратного).

Для получения плазмиды *pUCnc*, содержащей последовательность 18–480 гена *il-10*, фрагмент ДНК (94 п.о.) из плазмиды *pUC18-III* клонировали по сайтам *PstI* и *HindIII* в плазмиду *pUC18-II*.

Для конструирования экспрессионных векторов использовали плазмиду *pKK233-2* (Pharmacia, Швеция) и плазмиды из коллекции лаборатории, производные плазмид *pKK233-3* и *pUC18* (Pharmacia, Швеция) [11, 13].

Плазмида *pKKIL-10* была получена путем лигирования *KpnI-HindIII*-фрагмента гена *il-10* и отожженных олигонуклеотидов *ilnn1* (не фосфорилирован) и *ilnn2* (фосфорилирован) с вектором *pKK233-2/NcoI-HindIII*. Лигазной смесью трансформировали клетки *E. coli* TG1, из полученных клонов выделяли плазмидную ДНК. Наличие вставки ДНК (0.47 т.п.о.) определяли с помощью рестриктаз *KpnI* и *HindIII*.

При конструировании плазмиды *pVTIL-10* вектор *pVTIL-3/NcoI-HindIII*, *KpnI-HindIII*-фрагмент гена *il-10* и олигонуклеотиды *ilnn1* и *ilnn2* лигировали с помощью T4-лигазы. Полученной смесью трансформировали клетки *E. coli* TG1, выделяли

рекомбинантные плазмиды из клонов и анализировали их на наличие вставки ДНК гена *il-10*.

Плазида рВТLIL-10, содержащая ген *il-10*, "слитый" с геном лидерного пептида белка OmpF *E. coli*, была сконструирована с использованием вектора рВТ-hEGF/*EcoRI-HindIII* [13], *KpnI-HindIII*-фрагмента гена *il-10* и олигонуклеотидов *ilf1* (не фосфорилирован) и *ilf2* (фосфорилирован). При этом сохранялись рамка считывания *il-10* и сайт процессинга белка лидерной пептидазой *E. coli*, но ген *il-10* имел добавочный фрагмент ДНК, кодирующий четыре дополнительные аминокислоты (-Asn-Ser-Gln-Ile-) в N-концевой части белка. Данный фрагмент был ограничен сайтами рестриктаз *EcoRI* и *BglII* и при необходимости с помощью этих рестриктаз и нуклеазы S1 мог быть дельтирован.

Серия плазмид рВТVar-II-10-n была получена в результате лигирования вектора рВТLIL-10/*BamHI-KpnI* с фрагментом *BamHI-EcoRV* плазмиды рТОТЕ2IL3 [18] и олигонуклеотидов *var1* и *var2*.

Конструирование плазмиды рВТIL-3-10. Плазмиду рВТLIL-10 расщепляли рестриктазами *EcoRI* и *BamHI* и выделяли вектор, содержащий полную последовательность гена *il-10*. Плазмиду рВТIL-3 расщепляли рестриктазами *BamHI* и *HindIII* и выделяли фрагмент *BamHI-HindIII*, включающий последовательности промотора *P_{lac}*, двух операторных участков связывания *lac*-репрессора, RBS гена *l0* фага T7 и 5'-концевой фрагмент гена *il-3* (1–179 п.о.). Затем полученные вектор, фрагмент и отожденные олигонуклеотиды *ili1* (фосфорилирован) и *ili2* (не фосфорилирован), содержащие последовательность (180–204 п.о.) гена *il-3* (которая введена для удобства клонирования и имеет сайты необходимых рестриктаз), лигировали с помощью T4-лигазы. Лигазной смесью трансформировали клетки *E. coli* TG1, из полученных клонов выделяли плазмидную ДНК и анализировали ее с помощью рестриктоного анализа.

Плазида рВТIL-3-Хα-10. Плазмиду рВТIL-3-10 расщепляли рестриктазой *BglII*, обрабатывали нуклеазой S1 и ДНК-полимеразой I *E. coli* (фрагментом Кленова), затем расщепляли рестриктазой *EcoRI*. Полученный вектор и олигонуклеотиды *ili3* (не фосфорилирован) и *ili4* (фосфорилирован) лигировали и трансформировали лигазной смесью клетки *E. coli* TG1.

Плазида рUIL-3-Хα-10. Вектор рВТIL-3-Хα-10/*BamHI*(Кленов)-*XbaI* лигировали с фрагментом *PvuII-XbaI* плазмиды рUC-IL-4 [11], включающим последовательность промотора *P_{lac}* и дистальную часть RBS гена *l0* фага T7.

Структуры всех полученных вариантов гена *il-10* в экспрессионных векторах были подтверждены секвенированием по методу Сэнгера.

Расчет потенциальных вторичных структур мРНК проводили в соответствии с кинетическим алгоритмом [20], реализованным в пакете компьютерных программ DNA-SUN А.А. Мироновым (ГосНИИ "Генетика", Москва).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fiorentino D.F., Bond M.W., Mosmann T.R. // J. Exp. Med. 1989. V. 170. P. 2081–2095.
2. Moore K.W., O'Garra A., de Waal-Malefyt R., Vieira P., Mosmann T.R. // Annu. Rev. Immunol. 1993. V. 11. P. 165–190.
3. Moore K.W., Vieira P., Fiorentino D.F., Trounstein M.L., Khan T.A., Mosmann T.R. // Science. 1990. V. 248. P. 1230–1234.
4. Rousset F., Garcia E., Defrance T., Perrone C., Hsu D.-H., Kastellein R., Moore K.W., Banchereau J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992. V. 89. P. 1890–1893.
5. Chen W.-F., Zlotnik A. // J. Immunol. 1991. V. 147. P. 528–534.
6. Thompson-Snipes L., Dhar V., Bond M.W., Mosmann T.R., Moore K.W., Rennick D. // J. Exp. Med. 1991. V. 173. P. 507–510.
7. Go N.F., Castle B.E., Barrett R., Kastellein R., Dang W., Mosmann T.R., Moore K.W., Howard M. // J. Exp. Med. 1990. V. 172. P. 1625–1631.
8. Ho A.S.Y., Liu Y., Khan T.A., Hsu D.H., Bazan J.F., Moore K.W. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. P. 11267–11271.
9. Vieira P., de Waal-Malefyt R., Dang M.-N., Johnson K.E., Kastelein R., Fiorentino D.F., de Vries J.E., Roncarolo M.-G., Mosmann T.R., Moore K.W. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991. V. 88. P. 1172–1176.
10. Andersson S.G.E., Kurland C.G. // Microbiol. Rev. 1990. V. 54. P. 198–210.
11. Птицын Л.П., Альтман И.Б. // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1995. Т. 59. С. 83–85.
12. Olins P.O., Devine C.S., Rangwala S.H., Kavka K.S. // Gene. 1988. V. 73. P. 227–235.
13. Батчикова Н.В., Альтман И.Б., Луценко С.В., Смирнов В.А., Назимов И.В., Эшкунд Л.Г., Синягина Е.А., Ажаев А.В. // Биоорганическая химия. 1992. Т. 18. С. 766–776.
14. Gheysen D., Iserentant D., Derom C. // Gene. 1982. V. 17. P. 55–63.
15. de Smit M.H., van Duin J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. P. 7668–7672.
16. Looman A.C., Bodlaender J., Comstoch L.J., Eaton D., Jhurani P., de Boer H.A., van Knippenberg P.H. // EMBO J. 1987. V. 6. P. 2489–2492.
17. Луценко С.В., Гуревич А.И., Птицын Л.П., Рязанова Л.А., Смирнов В.А., Ажаев А.В. // Биоорганическая химия. 1992. Т. 18. С. 391–397.
18. Мануатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. М.: Мир, 1984.
19. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. P. 5463–5467.
20. Mironov A., Kister A. // J. Biomolec. Struct. Dyn. 1986. V. 4. P. 1–9.

Expression of the Synthetic Human Interleukin-10 Gene and Its Mutant Variants in *Escherichia coli* Cells

L. R. Ptitsyn, I. B. Al'tman, and M. V. Gurov

Genetika State Research Center, Pervyi Dorozhnyi pr. 1, Moscow, 113545 Russia

Lekbiotekh Research and Technical Center, Biotekhnologiya Association, Moscow, 117246 Russia

Abstract—The human interleukin-10 gene was obtained by chemico-enzymatic synthesis, and vectors for cytoplasmic and periplasmic expression of the recombinant IL-10 gene in *Escherichia coli* cells were constructed. Mutant IL-10 genes bearing substitutions in a region upstream of the ATG codon and in the triplet coding for the second amino acid residue in the protein were obtained by *in vitro* mutagenesis. High levels of expression were observed for the fusion protein composed of IL-10 and an N-terminal fragment of IL-3 and for the mutant IL-10 containing cysteine as the second amino acid residue.

Key words: interleukin-10, gene synthesis, expression of mutant forms, producer strain.