



УДК 577.213.7

© 1992 г.

С. К. Балиян, Н. С. Быстров, Е. Ф. Волдырева,
И. А. Полякова, И. В. Северцова, В. Г. Коробко

ХИМИКО-ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ И КЛОНИРОВАНИЕ
В *Escherichia coli* ГЕНА, КОДИРУЮЩЕГО
ГРАНУЛОЦИТ-КОЛОНИЕСТИМУЛИРУЮЩИЙ ФАКТОР ЧЕЛОВЕКА

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина РАН, Москва

Осуществлен химико-ферментативный синтез и клонирование в *Escherichia coli* гена, кодирующего зрелый гранулоцит-колониестимулирующий фактор человека (G-CSF).

Продукция зрелых клеток крови из мультипотентных стволовых клеток у человека находится под контролем ряда ростовых факторов. Благодаря способности стимулировать образование колоний зрелых клеток эти факторы были названы колониестимулирующими факторами (CSF) [1]. У человека идентифицированы четыре таких фактора в зависимости от типа зрелых клеток, образование колоний которых эти факторы инициируют. Два из них, интерлейкин-3 (IL-3) и гранулоцит-макрофаг-колониестимулирующий фактор (GM-CSF), стимулируют пролиферацию предшественников макрофагов, гранулоцитов и эозинофилов. Остальные два фактора, макрофаг-колониестимулирующий фактор (M-CSF) и гранулоцит-колониестимулирующий фактор (G-CSF), проявляют специфичность к определенным линиям клеток-предшественников, стимулируя пролиферацию соответственно макрофагов и гранулоцитов [2].

Гранулоцит-колониестимулирующий фактор человека (hG-CSF) — гликопротеин с молекулярной массой около 20 кДа — обладает широким спектром биологической активности. Кроме упомянутых свойств hG-CSF усиливает фагоцитоз [3], способствует связыванию гранулоцитами хемотаксического пептида fMet-Leu-Phe [4], а также увеличивает антителозависимую цитотоксичность нейтрофилов и эозинофилов [5, 6]. Предварительное клиническое изучение hG-CSF показало хорошие перспективы использования этого белка при лечении ряда опухолевых заболеваний, а также для нейтрализации нейтропении, возникающей при интенсивной химио- или рентгенотерапии. Кроме того, установлено, что негликозилированный белок обладает полной биологической активностью природного гликопротеина [7]. К настоящему времени кДНК и ген hG-CSF клонированы [8–10] и из данных по их структуре выведена аминокислотная последовательность зрелого белка. Установлено, что существуют две формы мРНК, получающиеся в результате альтернативного сплайсинга. Они кодируют две формы зрелого белка hG-CSF, содержащие 177 (hG-CSFa) и 174 (hG-CSFb) аминокислотных остатка. Аминокислотные последова-

В работе использовали только олигодезоксирибонуклеотиды; поэтому префикс «d» в формулах олигонуклеотидов для краткости опущен.

Сокращения: раствор Денхардта — 0,02% бычий сывороточный альбумин, 0,02% фикоилл, 0,02% поливинилпирролидон; SSC — 0,15 M NaCl, 0,015 M цитрат натрия; SDS — додецилсульфат натрия.

тельности обеих форм hG-CSF идентичны, за исключением дополнительных трех аминокислотных остатков в положении 36 у hG-CSFa.

В настоящей работе мы описываем химико-ферментативный синтез и клонирование в *E. coli* двух вариантов гена, кодирующих обе формы гранулоцит-колониестимулирующего фактора, hG-CSFa и hG-CSFb. Для получения двух форм гена hG-CSF мы предварительно синтезировали ген «предшественник», дизайн которого представлен на рис. 1. Этот ген кодирует делеционный вариант полипептида hG-CSFa, у которого удалено девять аминокислотных остатков (с 34-го по 45-й), и содержит в месте делеции уникальный для этого гена сайт рестриктазы *HindIII*. Встраивание по этому сайту синтетических дуплексов F или G приводит к обеим формам гена, кодирующим зрелые формы белков hG-CSFa и hG-CSFb. С целью упрощения синтеза и промежуточного клонирования ген был разбит на пять сегментов (A–E) длиной 25, 82, 163, 111 и 133 нуклеотидных пар соответственно. Используя вырожденность генетического кода, мы снабдили каждый из сегментов уникальными для этого гена фланкирующими сайтами рестрикционных эндонуклеаз, что позволяет проводить последовательную сборку гена из сегментов после предварительного клонирования в плазмидном векторе, за исключением сегмента D, который вследствие наличия сайта *VamHI** обязательно должен быть клонирован в векторе с клонированным сегментом C. Следует отметить, что в N-концевую часть гена был введен сайт эндонуклеазы рестрикции *XhoI*, что позволяет в случае необходимости легко изменить состав кодонов и структуру участка инициации трансляции.

С целью синтеза двух вариантов гена фосфитамидным способом было синтезировано 44 олигодезоксирибонуклеотида величиной от 16 до 39 нуклеотидных звеньев. Лигазные шивки проводили в один (в случае сегментов B и D), два (в случае сегмента E) или три этапа (в случае сегмента C) в четырех- или шестикомпонентных системах. При этом были фосфорилированы все олигонуклеотиды, за исключением 5'-концевых, содержащих сайты узнавания рестриктаз. Продукты шивок выделяли при помощи электрофореза в ПААГ подходящей концентрации, содержащем 7 М мочевины, и использовали для дальнейшего клонирования.

Клонирование продуктов лигазных реакций проводили в специально сконструированном плазмидном векторе pGEM4M. Этот вектор был получен замещением полилинкера плазмиды pGEM4 новым полилинкером, содержащим последовательно в направлении транскрипции гена *lacZ'* сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции *EcoRI*, *ClaI*, *XhoI*, *HindIII*, *VamHI*, *PstI* и *SalGI*. Для промежуточного клонирования сегмента в ДНК плазмиды pGEM4M гидролизовали смесью рестриктаз *XhoI* и *HindIII* и образовавшийся вектор лигировали с избытком нефосфорилированного синтетического сегмента B. Отбор нужных клонов проводили при помощи гибридизации с одним из 5'-³²P-меченых олигонуклеотидов, входящим в состав сегмента B. Структуру клонированного фрагмента подтверждали анализом нуклеотидной последовательности при помощи твердофазного метода химических модификаций [11] (см. рис. 2). Аналогичным образом были клонированы остальные сегменты и проведена сборка гена. В результате была получена плаزمида pGCSFA, содержащая делеционный вариант искусственного гена, кодирующий «предшественник» hG-CSF. Для получения альтернативных форм синтетического гена G-CSF плазмиду pGCSFA расщепляли рестрикционной эндонуклеазой *HindIII* и образовавшуюся линейную форму лигировали с синтетическим дуплексом F или G. Скрининг целевых клонов проводили гибридизацией с одной из целей клонируемого синтетического дуплекса. В результате получили рекомбинантные плазмиды pGCSFa и pGCSFb, содержащие искусственные гены, кодирующие две формы зрелого гранулоцит-колониестимулирующего

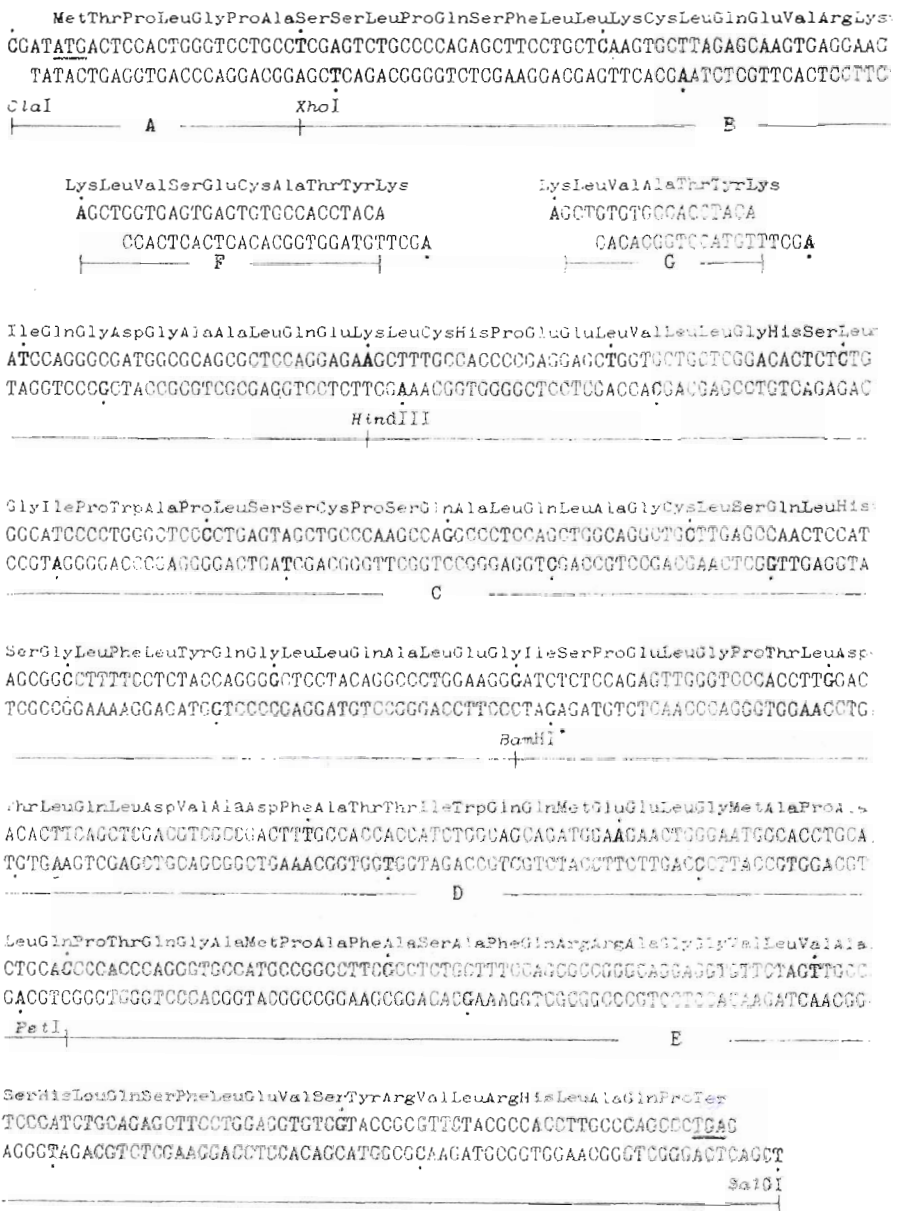
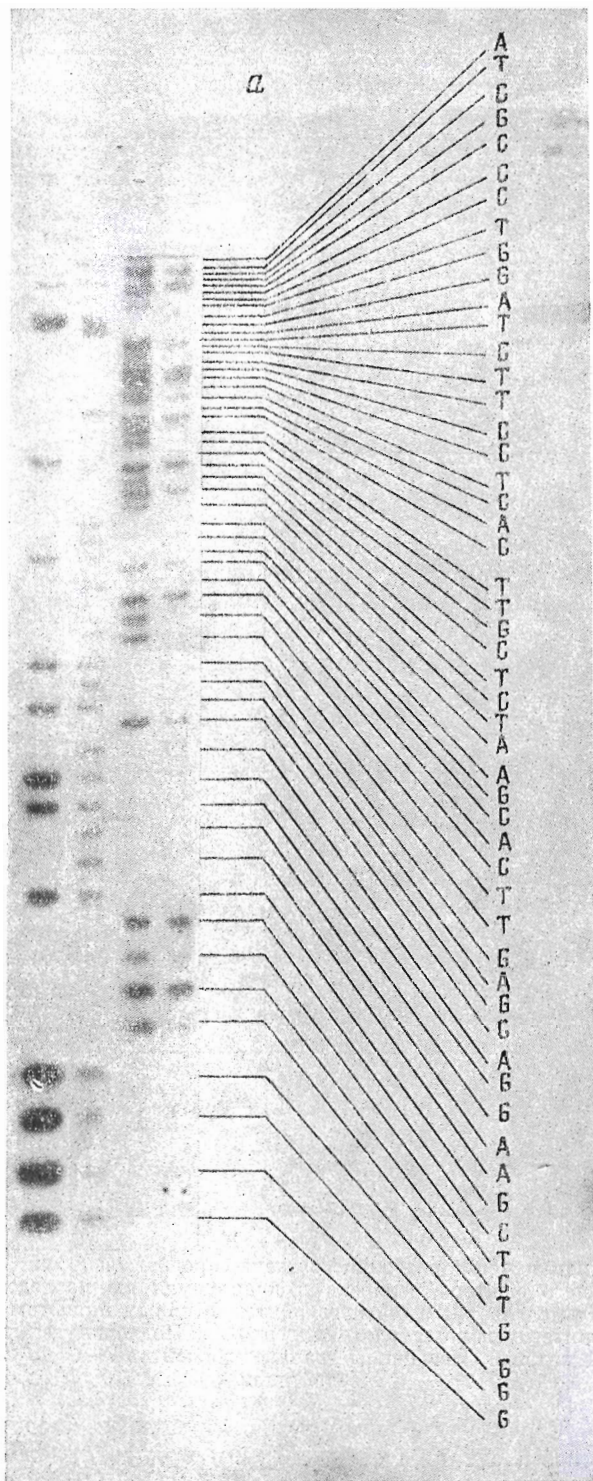


Рис. 1. Нуклеотидная последовательность гена «предшественника» гранулоцит колониестимулирующего фактора человека и кодируемая ею последовательность аминокислот. Указаны сайты узнавания рестриктаз. Жирным шрифтом выделены 5'-концевые звенья синтезированных олигонуклеотидов. Подчеркнуты иницирующий и терминирующий кодоны. Обозначены границы сегментов А–Е по верхней, кодирующей цепи

щего фактора. Структуру рекомбинантных плазмид подтверждали рестриктивным анализом, а также определением нуклеотидной последовательности между сайтами рестриктаз *ClaI* и *HindIII* по методу Сэнгера, адаптированного к использованию термофильной ДНК полимеразы [12].

Таким образом, осуществлен химико-ферментативный синтез и клонирование в *E. coli* двух вариантов искусственного гена гранулоцит-колониестимулирующего фактора человека.



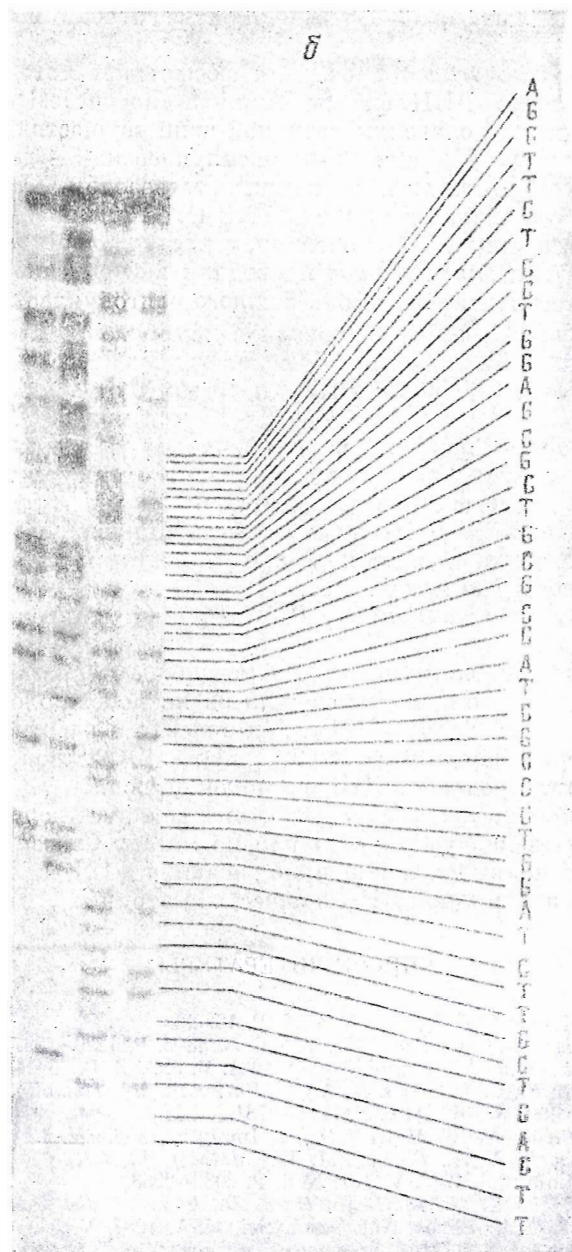


Рис. 2. Радиоавтограммы разделяющих полпакриламидных гелей при определении нуклеотидной последовательности клонированного сегмента В методом химических модификаций в твердофазном варианте от сайта рестриктазы *XhoI*. а — короткие фрагменты (начало последовательности); б — длинные фрагменты (конец последовательности)

Экспериментальная часть

В работе использованы dNTP фирмы Boehringer Mannheim (ФРГ), $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ фирмы Amersham (Англия); рестрикционные эндонуклеазы *Bsu151* (*Clai*), *XhoI*, *HindIII*, *BamHI*, *PstI*, *SalGI*, *BspI*, *MspI* и ДНК-полимераза *Thermus aquaticus* НИО «Фермент» (Вильнюс); ДНК-лигазу

и полинуклеотидкиназу фага T4 выделяли по способу, опубликованному в работе [13].

Синтез олигонуклеотидов проводили фосфитным методом на автоматическом синтезаторе ДНК фирмы Applied Biosynthesis, модель 380A (США). Нарастивание олигонуклеотидной цепи осуществляли с помощью 5'-диметокситритил - N - ацил-2'-дезоксинуклеозид-3'-(диизопропилами-но)-β-дианэтилфосфитов, активированных тетразолом. Олигонуклеотиды после удаления защитных групп очищали при помощи электрофореза в 20% ПААГ, содержащем 7 М мочевины, с последующей ВЭЖХ.

Лигирование олигонуклеотидов проводили как описано в работе [14]. Для получения сегмента В 5 пмоль каждого олигонуклеотида (за исключением 5'-концевых) фосфорилировали с помощью 10 ед. акт. полинуклеотидкиназы фага T4 в 25 мкл буфера, содержащего 50 мМ трис-НСl (рН 7,5), 10 мМ MgCl₂, 50 мкМ АТР и 10 мкКи [γ-³²P]АТР, в течение 40 мин при 37°С, после чего прогревали 15 мин при 65°С для инактивации фермента. Затем прибавляли оставшиеся олигонуклеотиды, смесь прогревали 5 мин при 100°С, затем медленно охлаждали до 12°С, прибавляли АТР и дитиотреит до концентрации 0,1 мМ и 5 мкМ соответственно и 100 ед. акт. T4-ДНК-лигазы. Смесь инкубировали 6–12 ч при 12°С и продукт сшивки выделяли при помощи электрофореза в 10% ПААГ, содержащем 7 М мочевины.

Рекомбинантные плазмидные ДНК получали как описано в работе [15].

Гибридизацию колоний in situ и блот-гибридизацию по Саузерну с олигонуклеотидными зондами проводили на нитроцеллюлозных фильтрах BA85 (Schleicher und Schüll, ФРГ), как описано в работе [16] при 56°С в буфере, содержащем 6×SSC, 0,2% SDS, 2×раствор Денхардта и 100 мкг/мл денатурированной ДНК из молок лосося.

Нуклеотидную последовательность определяли твердофазным методом химических модификаций [11] или по методу Сэнгера, адаптированному к технике полимеразной цепной реакции [12], с использованием двухцепочечной плазмидной ДНК в качестве матрицы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Metcalf D. // Science. 1985. V. 229. № 4708. P. 16–22.
2. Clark S. C., Kamen R. // Science. 1987. V. 236. № 4805. P. 1229–1237.
3. Nicola N. A., Vadas M. // Immunol. Today. 1984. V. 5. № 3. P. 76–80.
4. Platzer E., Welte K., Gabrilove J. L., Lu L., Harris P., Mertelsmann R., Moore M. A. S. // J. Exp. Med. 1985. V. 162. № 6. P. 1778–1781.
5. Vadas M. A., Nicola N. A., Metcalf D. // J. Immunol. 1983. V. 130. № 2. P. 795–799.
6. Lopez A. F., Nicola N. A., Burgess A. W., Metcalf D., Bottye F. L., Sewell W. A., Vadas M. // J. Immunol. 1983. V. 131. № 6. P. 2983–2988.
7. Cohen A. M., Zsebo K. M., Inoue H., Hines D., Boone T. C., Chazin V. R., Tsai L., Ritch T., Souza L. M. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. № 8. P. 2484–2488.
8. Nagata S., Tsuchiya M., Asano S., Kaziro Y., Yamazaki T., Yamamoto O., Hirata Y., Kubota N., Oheda M., Nomura H., Ono M. // Nature. 1986. V. 319. № 6052. P. 415–418.
9. Nagata S., Tsuchiya M., Asano S., Yamamoto O., Hirata Y., Kubota N., Oheda M., Nomura H., Yamazaki T. // EMBO J. 1986. V. 5. № 3. P. 575–581.
10. Souza L. M., Boone T. C., Gabrilove J., Lai P. H., Zsebo K. M., Mudrock D. C., Chazin V. R., Bruszewski J., Kenneth H. L., Chen K. K., Barendt J., Platzer E., Moore M. A. S., Mertelsmann R., Welte K. // Science. 1986. V. 232. № 4746. P. 61–65.
11. Chuvpilo S. A., Kravchenko V. V. // FEBS Lett. 1985. V. 179. № 1. P. 34–36.
12. Innes M. A., Myambo K. B., Gelfand D. H., Brow M. A. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. № 24. P. 9436–9440.
13. Dolganov G. M., Chestukhin A. V., Shemyakin M. F. // Eur. J. Biochem. 1981. V. 114. № 2. P. 247–254.
14. Коробко В. Г., Добрынин В. Н., Северцова И. В., Болдырева Е. Ф., Быстров Н. С., Колосов М. Н. // Биооргани. химия. 1982. Т. 8. № 6. С. 830–839.

15. Maniatis T., Fritsch F. F., Sambrook J. // Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 1982. Cold Spring Harbor Laboratory. P. 309-402.
16. Коробко В. Г., Добрынин В. Н., Северцова И. В., Болдырева Е. Ф., Шингарова Л. Н., Чуваило С. А., Филиппова Л. Ю., Звонок Н. М., Васильева Т. Е., Колосов М. Н. // Биоорганич. химия. 1987. Т. 13. № 1. С. 69-81.

Поступила в редакцию
20.VIII.1991

S. K. KASHYAP, N. S. BYSTROV, E. F. BOLDYREVA, I. A. POLYAKOVA,
I. V. SEVERTSOVA, V. G. KOROBKO

**CHEMICAL-ENZYMATIC SYNTHESIS AND CLONING IN *ESCHERICHIA*
COLI OF GENES CODING FOR HUMAN GRANULOCYTE COLONY
STIMULATING FACTOR**

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

Two artificial genes, encoding two forms of human granulocyte colony stimulating factor as products of a normal and an alternative splicing, have been by a chemical-enzymatic way synthesized and cloned in *Escherichia coli*. The genes are supplied with recognition sites of restriction endonucleases to facilitate the further cassette mutagenesis.