



УДК 577.214.3

© 1993 Е. Н. Лебеденко, Ю. А. Берлин

СИНТЕЗ ГЕНА АНТАГОНИСТА РЕЦЕПТОРА ИНТЕРЛЕЙКИНА-1
С ПОМОЩЬЮ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Институт биоорганической химии

им. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

Интерлейкин-1 (IL-1), представляющий собой смесь двух полипептидов IL-1 α и IL-1 β , является цитокином с многообразной биологической активностью, который функционирует в качестве медиатора различных болезней, а также защитных механизмов хозяина [1]. Ввиду выраженной плеiotропности воздействия IL-1 на физиологию клетки и в особенности его активного участия в процессах патогенеза большое внимание привлекают исследования по регуляции его содержания в клетке, в частности поиск и изучение свойств его антагонистов. В связи с этим значительный интерес представляет недавно охарактеризованный белковый фактор — природный антагонист рецептора IL-1 (IL-1ra), специфически блокирующий связывание IL-1 с рецепторами на Т-клетках и фибробластах, но не связывающийся с самим IL-1 и не обладающий его биологической активностью [2]. Первичная структура антагониста была установлена путем секвенирования кДНК из библиотеки моноцитов человека: он синтезируется в виде 177-звенного полипептида, превращающегося после отщепления 25-звенной N-концевой сигнальной последовательности в функционально активный 152-звенный IL-1ra [3].

Нас интересовала возможность создания плазмидной конструкции, включающей ген IL-1ra и пригодной для направленного мутагенеза и экспрессии в прокариотических системах (ср. [3]). С этой целью мы сконструировали ген зрелого IL-1ra с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) на дуплексе мРНК · кДНК в качестве матрицы; ранее этот подход [4] был использован нами для синтеза гена IL-1 α [5].

Располагая информацией о нуклеотидной последовательности мРНК IL-1ra [3], мы сконструировали праймер (5')d(CTACTCGTCCTCCTGGAAGTA) (I), комплементарный 3'-концевому участку ее транскрируемой части — кодонам 147—152 (здесь и далее нумерация кодонов начинается от триплета CGA, кодирующего аргинин — N-концевой остаток зрелого IL-1ra) и терминирующему кодону TAG и способный избирательно инициировать обратную транскрипцию именно этой мРНК в составе многокомпонентной смеси полиаденилированных мРНК из моноцитов человека. Полученный в результате обратной транскрипции (cDNA Synthesis System Plus, Amersham) специфический гибридный дуплекс мРНК · кДНК без выделения и какой-либо дополнительной обработки служил матрицей в последующей ПЦР [6]. Для этой реакции в качестве прямого праймера предполагалось использовать 31-звенный нуклеотид (5')d(CGGATCCATGCGACCCTCTGGGAGAAAATCC) (II), содержащий наряду с 21-звенным 3'-концевым участком, идентичным 5'-концу значащей цепи гена IL-1ra (кодонами 1—7), также дополнительную декануклеотидную последовательность, отвечающую *Vam*HI-сайту (фланкированному с 5'-конца звеном C) и

инициирующему кодону ATG. Что касается обратного праймера, то для этой цели был синтезирован 28-мер (5')d(CGGATCCCTACTCGTCCCTCCTGGAAGTA) (III), в котором последовательность (I), комплементарная кодонам 147—152 и терминатору трансляции TAG и использовавшаяся нами для обратной транскрипции (см. выше), дополнена, как и в прямом праймере, фланкированным *Bam*HI-сайтом d(CGGATCC). Наличие у праймеров (II) и (III) таких свисающих концов должно было привести к продукту амплификации, в котором ген IL-1 α фланкирован с обеих сторон *Bam*HI-сайтами и, наряду с нативным терминирующим кодоном TAG, содержит также инициирующий кодон ATG, непосредственно предшествующий началу гена зрелого антагониста.

Однако такая комбинация праймеров в ПЦР с гибридом мРНК · кДНК в качестве матрицы не дала нужного продукта амплификации даже в результате двух последовательных ПЦР по 30 циклов каждая (денатурация 1 мин при 94° С, отжиг 2 мин при 55° С, элонгация 3 мин при 72° С), хотя в общем случае праймеры со свисающими концами вполне эффективны (см., например, [7]). Поэтому на первом этапе ПЦР мы использовали в качестве праймеров олигонуклеотиды, не содержащие свисающих концов, т. е. образующие с матрицей совершенные дуплексы. В качестве обратного праймера был использован олигонуклеотид (I), а в качестве прямого — олигонуклеотид (5')d(CGACCCTCTGGGAGAAAATCC) (IV), составляющий 3'-концевую часть праймера (II) и, таким образом, полностью идентичный 5'-концу значащей цепи гена IL-1 α . Хотя при электрофоретическом анализе реакционной смеси (после 30 циклов) с окрашиванием бромистым этидием полоса нужного полинуклеотида не была видна, однако при использовании аликвоты (1 : 1000) этой реакционной смеси для повторной ПЦР (еще 30 циклов) — на этот раз с праймерами (II) и (III) со свисающими концами — была идентифицирована полоса, отвечающая полинуклеотиду ожидаемого размера (476 п. о.). Необходимость аналогичной двухэтапной ПЦР наблюдалась ранее при получении, исходя из геномной ДНК, одного из экзонов гена IL-1 α [8].

После второго этапа ПЦР продукт амплификации гена IL-1 α был выделен электрофорезом в 10% ПААГ с последующей электроэлюцией и обессоливанием с помощью гель-фильтрации и встроен по тупым концам в плазмиду pUC19, предварительно расщепленную эндонуклеазой *Sma*I и дефосфорилированную. Далее полученной никлированной рекомбинантной ДНК трансформировали клетки *E. coli* TG1 и ДНК, выделенную из серии клонов по методу [9], секвенировали по Сенгеру [10].

Среди проанализированных образцов не было обнаружено ДНК с нативной последовательностью гена IL-1 α — все они содержали нуклеотидные замены, ведущие как к молчащим, так и к миссенс-мутациям. В принципе причиной возникших замен могли быть как обратная транскриптаза RAV2 (Amersham), так и термостабильная ДНК-полимераза *Thermus thermophilus* (ЛИЯФ РАН, Гатчина), использовавшиеся нами в синтезе гена и не обладающие 3'-корректирующей активностью. Следует отметить, что именно на счет обратной транскриптазы было отнесено несовпадение данных о природе второго звена в составе 1-го кодона в гене зрелого IL-1 α (26-й кодон полного гена антагониста) по данным анализа кДНК и геномной ДНК [3]. О возможном участии обратной транскриптазы в мутагенезе свидетельствует также то, что ранее при конструировании гена IL-1 α с помощью *Tih*-полимеразы без участия обратной транскриптазы мы без труда обнаруживали среди получаемых клонов нативную последовательность [8]. Разумеется, источником мутаций могла быть и ДНК-полимераза, тем более что суммарное число циклов ПЦР (60), приведшее к искомому гену, было весьма значительным. Это особенно вероятно в случае мутации в кодоне 148, которая может быть связана с репликацией или же со структурным дефектом обратного праймера (например, в какой-то доле его молекул), проявившимся в части клонов, но не с обратной транскрипцией, начинающейся за пределами этого праймера.

Чтобы из имевшихся мутантных ДНК получить ДНК, в которой последовательность триплетов в точности отвечает первичной структуре IL-1ra [3], мы использовали ДНК из трех различных клонов, несущие в совокупности четыре значащие мутации в различных частях гена. Проведенные с участием этих ДНК две рекомбинации *in vitro* по сайтам *KpnI/Eco47III* и *Eco47III/HindIII* с переклонированием в не содержащий *KpnI*-сайта экспрессирующий вектор pDR540 [11] позволили устранить мутации, вызывающие аминокислотные замены, и привели к гену, хотя и сохранившему две молчащие мутации (транзиции T → C и C → T в третьем положении кодонов 105 и 148), но в точности кодирующему ранее описанную [3] 152-звенную последовательность зрелого IL-1ra.

Таким образом, был синтезирован безынtronный ген зрелого антагониста рецептора IL-1 (наряду с несколькими его структурными вариантами), пригодный для экспрессии в прокариотических системах.

Авторы благодарны С. А. Кетлинскому (ВНИИОЧБ, Санкт-Петербург) за препарат полиаденилированной мРНК из моноцитов человека, Е. И. Шварцу и О. К. Кабоеву (ЛИЯФ, Гатчина) за Tth-полимеразу и О. В. Плуталову (ИБХ, Москва) за синтез олигонуклеотидов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dinarello C. A. // Blood. 1991. V. 77. № 8. P. 1627—1652.
2. Hannum C. H., Wilcox C. J., Arend W. P., Joslin F. G., Dripps D. J., Heimdal P. L., Armes L. G., Sommer A., Eisenberg S. P., Thompson R. C. // Nature. 1990. V. 343. № 6256. P. 336—340.
3. Eisenberg S. P., Evans R. J., Arend W. P., Verderber E., Brewer M. T., Hannum C. H., Thompson R. C. // Nature. 1990. V. 343. № 6256. P. 341—346.
4. Brenner C. A., Tam A. W., Nelson P. A., Engleman E. G., Suzuki N., Fry K. E., Larrick J. W. // BioTechniques. 1989. V. 7. № 10. P. 1096—1103.
5. Лебедево Е. Н., Плуталов О. В., Берлин Ю. А. // Биоорган. химия. 1990. Т. 16. № 11. С. 1570—1573.
6. Kogan S. C., Doherty M., Gitschier J. // New Engl. J. Med. 1987. V. 317. № 16. P. 985—990.
7. Horton R. M., Hunt H. D., Ho S. N., Pullen J. K., Pease L. R. // Gene. 1989. V. 77. № 1. P. 61—68.
8. Lebedenko E. N., Birikh K. R., Plutalov O. V., Berlin Yu. A. // Nucl. Acids Res. 1991. V. 19. № 24. P. 6757—6761.
9. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. P. 1.25—1.28, 1.40—1.41.
10. Murphy G., Ward E. S. // Nucleic Acids Sequencing: a Practical Approach/Eds Howe C. G., Ward E. S. Oxford, New York, Tokyo: IRL Press at Oxford University Press, 1989. P. 99—115.
11. Pharmacia LKB Biotechnology, Catalogue 90/91. P. 343.

Поступила в редакцию
24.XI.1992

E. N. Lebedenko, Yu. A. Berlin

PCR-MEDIATED SYNTHESIS OF A GENE CODING FOR THE INTERLEUKIN 1 RECEPTOR ANTAGONIST

*M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,
Russian Academy of Sciences, Moscow*

A gene encoding a natural receptor antagonist of interleukin 1 has been synthesised with the use of PCR, on a mRNA-cDNA hybrid as template and cloned into a prokaryotic expression vector.