



УДК 577.113.6.088 : 547.963.32.057

© 1991 г.

А. И. Гуревич, Н. В. Скапцова, С. В. Луценко,  
В. А. Смирнов, А. Н. Куркин, А. В. Ажаев

### ХИМИКО-ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ СИНТЕЗ УСИЛИТЕЛЯ ТРАНСЛЯЦИИ ГЕНА 10 ФАГА T7 И ФУНКЦИЯ ЭЛЕМЕНТОВ ЕГО СТРУКТУРЫ

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва;  
Всесоюзный научно-исследовательский институт биотехнологии, Москва;  
Совместное малое предприятие «Химтек», Москва

Путем химико-ферментативного синтеза и клонирования искусственных генов сконструированы плазмиды, содержащие нуклеотидную последовательность усилителя трансляции (TREN) гена 10 фага T7 (полностью, а также проксимальную либо дистальную части) непосредственно перед искусственным геном (*il3*) человеческого интерлейкина 3 (*hIL3*). Сравнение уровней экспрессии гена *hIL3* в *E. coli* с этими плазидами показало, что участок, определяющий специфичность действия, расположен в дистальной части TREN, на расстоянии более 40 нуклеотидов от иницирующего кода.

Влияние структуры мРНК вблизи иницирующего кодона на эффективность инициации трансляции подробно исследовано [1]. Однако остаются непонятными механизмы влияния лидерных участков мРНК, которые действуют как активаторы инициации трансляции. Такого рода участки были обнаружены в структуре генома фага  $\lambda$  (гены *C* [2] и *D* [3]), *E. coli* (ген *atp* [4, 5]), фага T7 (ген 10 [6]). Они предшествуют генам, отличающимся особенно высоким уровнем экспрессии (гены основных белков оболочки фагов, а также АТФ-синтазы). Это обстоятельство уже использовалось в работах по повышению уровня экспрессии чужеродных генов в *E. coli* [5, 6]. По-видимому, особенно подходящей для такой цели является лидерная последовательность гена 10 (основного белка оболочки) фага T7, способная увеличивать уровень экспрессии в 50—500 раз [6]. Она была выделена и изучена в качестве усилителя трансляции (translational enhancer, TREN) после клонирования *MlaI/NdeI*-фрагмента ДНК фага T7 (нуклеотиды 22877 — 22965 [7]), но роль отдельных элементов ее структуры оставалась невыясненной. Интересно, что наблюдается большое сходство структуры проксимальной части TREN и другой лидерной мРНК (mini-cistron sequence, MCS), которая, как предполагалось [8], предотвращает возможность образования вторичной структуры в участке инициации трансляции во втором цистроне двухцистронной матрицы (см. рис. 1).

Чтобы выяснить значение отдельных структурных элементов TREN, мы осуществили химико-ферментативный синтез проксимальной его части (до сайта рестриктазы *XbaI*), всего TREN и его варианта с измененной нуклеотидной последовательностью проксимальной части и клонировали их в многокопийной плазмиде рFPCP10.

Исходную плазмиду мы получили на основе другой, рFPCP8 (образованной из рFPCP6 в результате спонтанной делеции одной из ветвей пентадекануклеотидного повтора [9]), путем вставки в сайт рестриктазы *BamHI* синтетической полилинкерной последовательности. Частичная структура плазмиды рFPCP10 приведена на рис. 2. Полилинкеру в плазмиде предшествуют регуляторные участки гена 8 (*fpcp*) фага fd — сильный промотор и эффективно транслируемый ген лидерного пептида, который может служить в качестве своеобразной MCS; вслед за полилинке-

TREN ...TTCGAAATTAATACGACTCA  
 СТАТАGGGAGACCACAACGGTTTCCSTCTAGAAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATG

MCS

СТАСАТGGAGATTAАСТСААТСТAGAGGGTATTAАТААТGTATCGATTТАААТАAGGAGGAATAACATATG

Рис. 1. Нуклеотидные последовательности усилителя трансляции (TREN) гена 10 фага T7 [6] и синтетического мини-цистрона (MCS) [7]. Участки с одинаковой последовательностью подчеркнуты

pFPCP10

150 200  
 ...ATASAAATCTCCGTTGACTTTGTTTCGCGCTTGGTATAATCGCTGGGGTCAAAGATGA...  
 P  
 280 300  
 ...TTAATGGAAACTTCCATGAAAAAGTGTTTAGTCCTCAAAGCCTCCGTAGCCGTTGCTA  
 SD MCS  
 390 BamHI PstI  
 CCCTCGTCCGATGCTGTCTTTCCGCTGCTGAGGGTGACGATCCCGCAAAGCGGATCCTGCAG  
 MCS SD  
 EcoRI 440 560  
 AATTCCGCTGCCAAGGCGATGCCCGATCCGAATTAGCGGCCTTT...AGCTGATAAACCGGATAC  
 MCS  
 580 610 BglIII 770  
 AATTAAAGGCTCCTTTTGGAGCCTTTTTTTTTGGAGATTTT...TTAGATCTCCCCAGTCA...  
 T

pTREN1

390 410 A B EcoRV EcoRI 450  
 . BamHI SphI XbaI .  
 ...CGG GATCCGCATGCTCTAGAAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATCATAATG AATTC...  
 ...CGCTAG CGCTACGAGATCTTTTATT AAAACAAATTGAAATCTTCCSTCTA TAGTATTACTTAA C...  
 C D E

pTREN2

390 BamHI SphI F G XbaI 450  
 ...GGCGATCCGCATG CTTCGAAATTAATACGACTCACTATAGGG AGACCACAACGGTTTCCCT STAGA...  
 ...CGCCTAGCC GTACGAAGCTTTAATTATGCTGA GTGATATCCCTCTGGTGTGCCAAAGGGAGATC T...  
 H I

Рис. 2. Частичная структура плазмид и схема сборки искусственных генов TREN. Указаны сайты рестриктаз, номера нуклеотидов в плазмиде, участки промотора (P), терминатора (T), MCS, связывания рибосомы (SD), терминирующие и иницирующие кодоны

ром нет транслируемых участков и через 150 нуклеотидов находится эффективный терминатор транскрипции.

Для клонирования проксимальной части гена TREN1 мы расщепили pFPCP10 рестриктазами BamHI и EcoRI. Схема сборки в полученном таким образом векторе искусственного гена TREN1 из пяти олигонуклеотидов А — Е (фосфорилированных В, С и D и нефосфорилированных А и Е) приведена на рис. 2. В результате клонирования была получена плазмида pTREN1, которая была использована, с одной стороны, для проверки способности проксимальной части гена TREN1 усиливать трансляцию, а с другой — для достройки дистальной части гена TREN. Сборку этой части искусственного гена из четырех олигонуклеотидов F — I (фосфорилированных, G и H, и нефосфорилированных — F и I) мы проводили в векторе, полученном из pTREN1 путем расщепления рестриктазами SphI и XbaI (см. рис. 2). В результате клонирования была получена плазмида pTREN2.

MetAlaProMetThrGlnThrThrSerLeuLysThrSerTrp

GATCCAAGGAGATATCATATGCTCCGATGACCCAGACCACCTCTCTGAAAACCTCTTGG  
 GTTCCTCTATAGTATACCGAGGCTACTGGGTCTGGTGGAGAGACTTTTGGAGAACC  
 BamHI EcoRV 60

ValAsnCysSerAsnMetIleAspGluIleIleThrHisLeuLysGlnProProLeuPro  
 GTTAAC TGCTCTAACATGATCGACGAAATCATCACCCACCTGAAACAGCCGCCCTGCCG  
 CAATTGACGAGATTGTAAGTACTGCTTTAGTAGTGGGTGGACTTTGTCCGCGCGACGGC  
 HpaI

LeuLeuAspPheAsnAsnLeuAsnGlyGluAspGlnAspIleLeuMetGluAsnAsnLeu  
 CTGCTGGACTTCAACAACCTGAACGGTGAAGACCAAGACATCTGTATGGAAAACACCTG  
 GACGACCTGAAGTTGTTGGACTTGCCACTTCTGGTTCTGTAGGACTACCTTTTGTGGAC

ArgArgProAsnLeuGluAlaPheAsnArgAlaValLysSerLeuGlnAsnAlaSerAla  
 CGTCGTCGCAACCTGGGAAGCTTTCAACCGTGCTGTTAAATCTCTGCAAAACGCTTCTGCT  
 GCAGCAGGCTTGGACCTTCGAAAGTTGGCAGCACAATTTAGAGACGCTTTTGGGAAGACGA  
 HindIII

IleGluSerIleLeuLysAsnLeuLeuProCysLeuProLeuAlaThrAlaAlaProThr  
 ATCGAATCTATCTGAAAACCTGCTGCCGTGCCTGCCGCTGGCTACCCTGCTCCGACC  
 TAGCTTAGATAGGACTTTTTGGACGACGGCACGGACGGCAGCGATGGCGACGAGGCTGG

ArgHisProIleHisIleLysAspGlyAspTrpAsnGluPheArgArgLysLeuThrPhe  
 CGTCACCCGATCCACATCAAACACGGTACTGGAACGAATTTGCTCGTAAACTGACTTTC  
 GCAGTGGGCTAGGTGTAAGTTTCTGCCACTGACCTTGCTTAAAGCAGCATTTGACTGAAAG

340

TyrLeuLysThrLeuGluAsnAlaGlnAlaGlnGlnThrThrLeuSerLeuAlaIlePhe  
 TACCTGAAAACCTGGAACCGCTCAGGCTCAGCAGACTACCCTGTCTCTGGTATCTTC  
 ATGGACTTTTGGAGACCTTTTGGCAGTCCGAGTCTGTATGGGACAGAGACCGATAGAAG

TERTER  
 TAATAG  
 ATTATCTTAA  
 EcoRI

Рис. 3. Нуклеотидная и соответствующая аминокислотная последовательности искусственного гена *il3*. Указаны сайты рестриктаз

Отбор клонов с плазмидами рTREN1 и рTREN2 проводили путем гибридизации колоний с мечеными олигонуклеотидами С и G и рестриктоного анализа (рестриктазы *Bam*HI, *Sph*I, *Xba*I, *Eco*RV, *Eco*RI). Структура гена TREN доказана секвенированием *Bam*HI/*Eco*RI-фрагмента.

Для выяснения влияния элементов структуры TREN на эффективность трансляции мы сопоставили уровни экспрессии одного и того же гена, клонированного в плазмидах, структура которых различалась лишь в области, непосредственно предшествующей старту трансляции. В качестве исходного мы использовали искусственный ген человеческого интерлейкина 3 (*il3*), структура которого приведена на рис. 3\*.

Синтетический ген мы клонировали в *Bam*HI/*Eco*RI-векторе, полученном из плазмиды рFPCP10. Структура образовавшейся плазмиды рFP10IL3 доказана рестриктоным анализом и секвенированием нуклеотидной последовательности искусственного гена (фрагмент *Bam*HI/*Eco*RI). В этой структуре низкий уровень трансляции гена *il3* (ср. работу [10]) мог быть повышен в сопряженной системе с участием предшествующего гена, MCS (см. выше).

Фрагмент *Eco*RV/*Bgl*II, содержащий ген *il3*, мы лигировали с *Eco*RV/*Bgl*II-векторами, полученными из плазмид рTREN1 и рTREN2, и клонировали образовавшиеся плазмиды рTE1IL3 и рTE2IL3, в которых гену *il3* непосредственно предшествует соответственно проксимальная часть

\* Химико-ферментативный синтез этого гена был проведен с использованием центрального фрагмента (нуклеотиды 63—340), любезно предоставленного В. М. Ростанцовым, Т. Л. Аживиной и Е. Д. Свердловым (ИБХ им. М. М. Шемякина АН СССР), которым авторы выражают искреннюю благодарность.



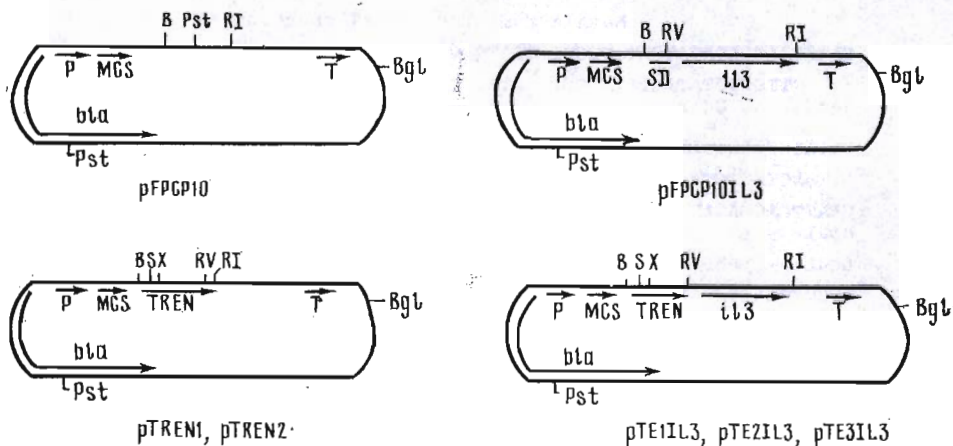
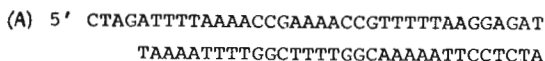


Рис. 4. Схематическое строение плазмид pFPCP10, pFPCP10IL3, серии pTREN и их производных. Указано положение сайтов рестриктаз (B — *Bam*HI, RI — *Eco*RI, RV — *Eco*RV, S — *Sph*I, X — *Xba*I, H — *Hind*III, Bgl — *Bgl*II, Pst — *Pst*I), промотора (P) и терминатора (T) транскрипции, последовательностей SD и TREN и генов *bla* и *il3*

или вся последовательность TREN. Наконец, проксимальную часть TREN в плазмиде pTE2IL3 между сайтами рестриктаз *Xba*I и *Eco*RV мы заменили другой последовательностью путем лигирования соответствующего вектора с синтетическим дуплексом (A):



В результате клонирования была получена плазмида pTE3IL3. Структура плазмид была доказана рестриктным анализом и секвенированием соответствующих *Xba*I/*Hind*III-фрагментов.

Строение полученных плазмид, содержащих различные последовательности TREN, приведено на рис. 4.

Влияние структуры участка, предшествующего SD, на эффективность трансляции наглядно демонстрирует сравнение уровней экспрессии гена *il3* в приведенных выше различных конструкциях (см. рис. 5). На рис. 5 видно, что уровень экспрессии гена *il3*, клонированного в плазмиде pFPCP10, не содержащей участка TREN, очень низок (ср. колонки 1 и 2) и существенно не повышается под действием проксимальной части TREN в плазмиде pTE1IL3 (колонка 3). В то же время введение полной структуры TREN приводит к резкому возрастанию синтеза *il3* с плазмидой pTE2IL3 (колонка 4) \*. Наконец, замена проксимальной части TREN в плазмиде pTE3IL3 не приводит к резкому снижению уровня экспрессии гена (колонка 5). Таким образом, наиболее специфичным в структуре TREN является участок, расположенный в его дистальном районе.

Недавно, сопоставляя структуры лидерных участков активно транслируемых мРНК, Олинс и Рангвала предположили [41], что усиление трансляции обусловлено наличием специфической нонануклеотидной последовательности, комплементарной участку 458—466 16S рРНК, которая расположена непосредственно перед SD. Наши данные не согласуются с этим предположением. Более вероятным кажется влияние структуры находящегося перед сайтом *Xba*I участка, гомологичного в последовательностях TREN и MCS (см. рис. 1), в состав которого входит дополнительная последовательность SD. Возможно, что усиление трансляции достигается за счет сопряжения в двух участках SD либо дистальный участок является сайтом связывания еще неизвестного фактора инициации трансляции.

\* По данным сканирования геля, содержание белка в полосе достигает 30—40%.

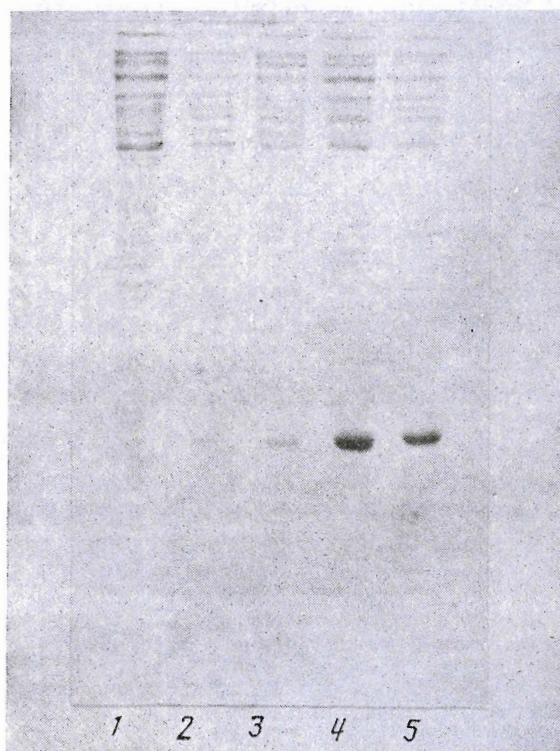


Рис. 5. Гель-электрофорез лизатов клеток *E. coli* HB101, несущих плазмиды с геном *il3*: 1 — pFPCP10 (контроль); 2 — pFPCP10IL3; 3 — pTE1IL3; 4 — pTE2IL3; 5 — pTE3IL3

### Экспериментальная часть

Использовали трис, акриламид, N,N'-метиленабисакриламид, персульфат аммония (Merck); N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (Reanal); агарозу, АТФ, dNTP, бромистый этидий (Sigma); мочевины, ос. ч. (Союз-реактив); агар, триптон, дрожжевой экстракт (Difco); [ $\gamma$ - $^{32}$ P]АТФ, [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP и [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dATP (1500—2000 Ки/ммоль, Ташкент); Т4-ДНК-лигазу (КФ 6.5.1.1), Т4-полинуклеотидкиназу (КФ 2.7.1.78), ДНК-полимеразу (фрагмент Кленова, КФ 2.7.7.7) и рестриктазы (КФ 3.1.23.x) *Eco*RI, *Bam*HI, *Hind*III, *Xba*I (НПЦ «Интер», Москва), *Eco*RV, *Sph*I (НПКО «Диагностикум», Москва).

Синтез олигонуклеотидов проводили модифицированным Н-фосфонатным методом с использованием защитных групп для эндоциклических амидных функций остатков гуанина и тимина, как описано в работе [12]. В реакцию конденсации вводили 1,8-диазабисцикло[5.4.0]ундец-7-еновые соли защищенных нуклеозид-3-гидрофосфитов.

Условия экспериментов по фосфорилированию и лигированию синтетических олигонуклеотидов приведены в работе [13], по получению рекомбинантных плазмид, трансформации компетентных клеток, клонированию, а также гель-электрофорезу и выделению ДНК из гелей — в работе [9]. Гидролиз рестриктазами проводили в универсальном буфере KGB [14]. Для секвенирования ДНК использовали частичную химическую деградацию твердофазным методом [15].

Для анализа белков 1 мл бактериальной культуры центрифугировали, растворяли в лизирующем буфере [16], нагревали 5 мин при 100° С и белки разделяли в 12,5% ПААГ в присутствии додецилсульфата натрия [16]. Гели окрашивали кумасси R-250 в растворе метанол — уксусная кислота — вода. Количественное определение белков проводили по методу [17].

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Stormo G. D.* // Maximizing Gene Expression / Eds. Reznikoff W., Gold L.: Butterworths, Boston, 1986. P. 195—224.
2. *Mahajna J., Oppenheim A. B., Rattray A., Gottesman M.* // J. Bacteriol. 1986. V. 165. № 1. P. 167—174.
3. *Suissa M., Altuvia S., Koby S., Giladi H., Oppenheim A. B.* // Mol. Gen. Genet. 1988. V. 214. № 3. P. 570—573.
4. *McCarthy J. E. G., Schairer H. U., Sebald W.* // EMBO J. 1985. V. 4. № 2. P. 519—526.
5. *McCarthy J. E. G., Sebald W., Lammers R.* // Gene. 1986. V. 41. № 2. P. 201—216.
6. *Olins P. O., Devine C. S., Rangavala S. H., Kavka K. S.* // Gene. 1988. V. 73. № 1. P. 227—235.
7. *Dunn J. J., Studier F. W.* // J. Mol. Biol. 1983. V. 166. № 4—5. P. 477—535.
8. *Schoner B. E., Belagale R. M., Schoner R. G.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. № 22. P. 8506—8510.
9. *Гуревич А. И., Некрасова О. В.* // Биоорганич. химия. 1988. Т. 14. № 2. С. 149—152.
10. *Mosmann T. R., Abrams J. S., Arai K.-I., Arai N., Bond M. W., Lee F. D., Miyama A., Miyatake S., Rennick D. M., Schreurs J., Smith C. A., Takebe Y., Yokota T., Zuravski G., Zuravski S. M.* // Recombinant Lymphokines and their Receptors / Ed. Gillis S. N. Y.: Marcel Dekker Inc., 1987. P. 217—240.
11. *Olins P. O., Rangavala S. H.* // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. № 29. P. 16973—16976.
12. *Сканцова Н. В., Куркин А. Н., Ажаев А. В.* // Биоорганич. химия. 1989. Т. 15. № 7. С. 940—946.
13. *Кулагина М. А., Сканцова Н. В., Батмижова Н. В., Куркин А. Н., Ажаев А. В.* // Биоорганич. химия. 1990. Т. 16. № 5. С. 625—634.
14. *McClelland M., Hanish J., Nelson M., Patel Y.* // Nucl. Acids Res. 1988. V. 16. № 1. P. 364.
15. *Чуепило С. А., Крашечко В. В.* // Биоорганич. химия. 1983. Т. 9. № 12. С. 301—304.
16. *Laemmli U. K.* // Nature. 1970. V. 227. № 5229. P. 680—685.
17. *Bradford M. M.* // Anal. Biochem. 1976. V. 72. № 1—2. P. 248—254.

Поступила в редакцию  
11.VII.1990

После доработки  
4.XII.1990

A. I. GUREVICH, N. V. SCAPTSOVA, S. V. LUTSENKO, V. A. SMIRNOV,  
A. N. KURKIN, A. V. AZHAYEV

THE CHEMICAL-ENZYMATIC SYNTHESIS OF THE TRANSLATIONAL  
ENHANCER OF THE PHAGE T7 GENE 10 AND FUNCTION OF ITS  
STRUCTURAL ELEMENTS

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,  
Academy of Sciences of the USSR, Moscow;  
All-Union Research Institute of Biotechnology, Moscow*

The translational enhancer (TREN) sequence of the phage T7 gene 10 (in full and also its proximal or distal parts) have been obtained by chemical-enzymatic synthesis and cloned into the plasmids immediately before the human interleukin 3 (hIL3) artificial gene. Expression levels of the hIL3 gene in *E. coli* in these constructions show that the region controlling the specific activity is placed in distal part of TREN more than 40 nucleotides upstream from the initiation codon.