

## **Chemoenzymatische Synthese eines funktionellen Gens für Human-Gammainterferon\*\***

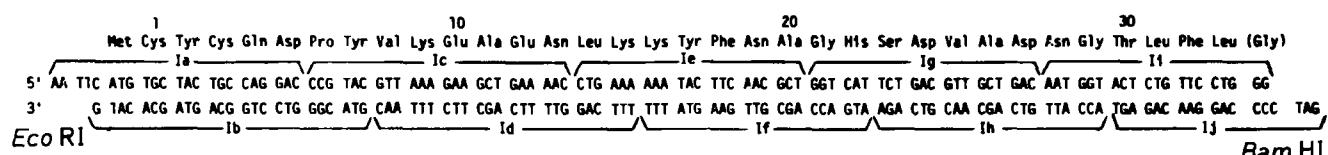
Von Joachim Engels\*, Michael Leineweber und  
Eugen Uhlmann

Gammainterferon ( $\gamma$ -IFN), früher Immuninterferon genannt, ist ein Lymphokin mit wichtigen antiproliferativen und immunmodulierenden Eigenschaften<sup>[1]</sup>. Nach aufwendigen und langwierigen Isolierungen aus Zellkulturen gelang es 1982 zwei Arbeitsgruppen<sup>[2,3]</sup> unabhängig voneinander, die Primärstruktur von  $\gamma$ -IFN aus dessen Gensequenz abzuleiten und das Gen in Bakterien einzuschleusen und zu exprimieren. Kennt man die Aminosäuresequenz eines Proteins, so bietet die chemoenzymatische Gensynthese gegenüber der DNA-Gewinnung aus biologischem Material folgende Vorteile: 1) Man umgeht den oft sehr schwierigen Schritt der Isolierung der mRNA oder der genomischen DNA. 2) Man erhält direkt exakt die gewünschte DNA-Sequenz ohne zusätzliches „Zurechtschneiden“ oder Prozessieren der gewonnenen DNA. 3) Die Verwendung von Codons, die in den jeweiligen Wirtsorganismen hochexprimierte Proteine codieren, ist möglich. 4) Restriktionsenzymschnittstellen können so ein-

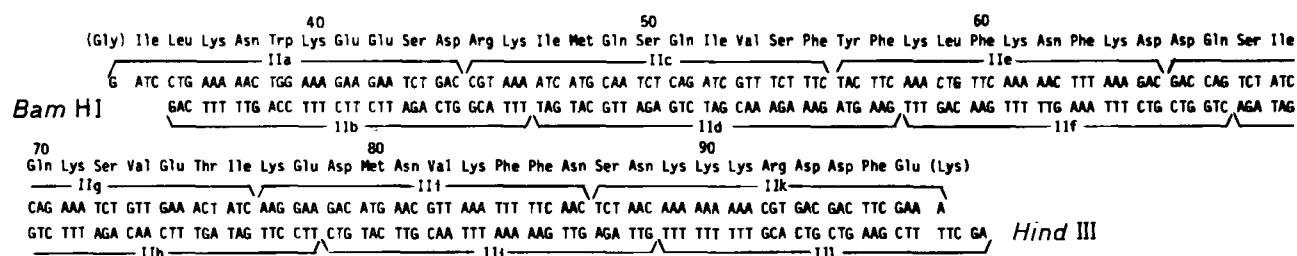
geplant werden, daß eine spätere Modifizierung des Gens, selbst wenn es sich um eine Verkürzung oder eine Verlängerung handelt, einfach durchzuführen ist. Dadurch können auch in relativ großen Peptiden Struktur-Aktivitäts-Studien in Angriff genommen werden.

Anhand des genetischen Codes wurde aus der 146 Aminosäuren umfassenden Sequenz des Gammainterferons eine DNA-Sequenz abgeleitet. Wir berücksichtigten dabei Codons von Proteinen, die in *E. coli* hochexprimiert werden, führten Restriktionsenzymsschnittstellen ein und vermieden störende Symmetrien oder Redundanzen innerhalb der DNA-Sequenz. Zusätzlich zu den 146 codierenden Nucleotidtriplets wurden am 5'-Terminus ein Startcodon sowie am 3'-Terminus zwei Translationsstopcodons angefügt. Daran schließen sich die überhängenden DNA-Enden für die Erkennung durch die Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *Sall* an. Das aus 452 Basenpaaren bestehende Gesamtgen wurde in drei Untereinheiten, IFN-I, IFN-II und IFN-III, zerlegt (Abb. 1), die an ihren Enden sonst im Gen nicht vorhandene Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme tragen, die die Insertion in Plasmide in der gewünschten Art und Orientierung ermöglichen. Der Vorteil des Subklonierungsprinzips, in dem sich unsere

IFN- $\beta$



IFN-II:



IFN-III:

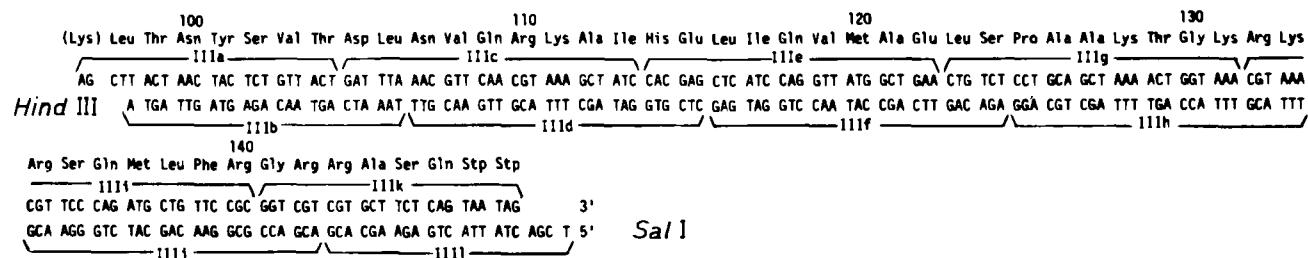


Abb. 1. Aminosäure- und Nucleotidsequenz des synthetischen Human-Gammainterferons. Die synthetischen Oligonucleotide Ia-III sind durch Klammern gekennzeichnet. Die Numerierung der Aminosäuren zeigt die native humane  $\gamma$ -IFN-Sequenz. Zur Synthese der Oligonucleotide Ia-III wurden je 1  $\mu$ mol des über die 3'-Hydroxygruppe an controlled-pore-Glas (cpg) gebundenen 5'-OH-Nucleosides mit 10  $\mu$ mol 5'-O-Dimethoxytrityl-nucleosid-3'-phosphoramidit und 50  $\mu$ mol Tetrazol in Acetonitril umgesetzt. Nach dem Capping unumgesetzter 5'-OH-Komponente mit Acetanhydrid/4-Dimethylaminopyridin in Tetrahydrofuran (THF) wurde der internucleotidische Phosphitester mit  $I_2$  in Collidin/Wasser/THF oxidiert. Zur weiteren Kettenverlängerung mußte dann die 5'-O-Dimethoxytrityl-Gruppe mit 3proz. Trichloressigsäure in 1,2-Dichlorethan (w/v) abgespalten werden. Die Oligonucleotide wurden durch Polyacrylamid-Gelektrophorese (15% Polyacrylamid, 7M Harnstoff) gereinigt und nach der Elution aus dem Gel über eine Sephadex-G-50-Säule entsalzt.

[\*] Dr. J. Engels, Dr. M. Leineweber, Dr. E. Uhlmann  
Hoechst Aktiengesellschaft  
Postfach 800320, D-6230 Frankfurt/Main 80

[\*\*] Wir danken Dr. Rolly für die Durchführung der biologischen Tests, Dr. Ulmer für die Reinigung des Gammainterferons und Dr. Amann für die Bereitstellung des tac-Plasmids.

Synthesestrategie von der früheren Gensynthesen<sup>[4,5]</sup> unterscheidet, sind einfach durchführbare Eintopf-Ligations schritte. Danach erzielt man durch Klonierung in *E. coli* und Reisolierung eine Reinigung der Subfragmente, deren Sequenz durch Analyse bestätigt wird. Bei früheren Gen synthesen ließen sich mutierte Gen-Zwischenprodukte nur

schwer oder überhaupt nicht abtrennen, da physikalische Reinigungsverfahren verwendet wurden. Durch die Subklonierung reduziert man zum einen die Mutationshäufigkeit im Gesamtgen, zum anderen kann man für nachfolgende Veränderungen des Gens auf ein nahezu unerschöpfliches Reservoir des jeweiligen Subfragments zurückgreifen.

Die Subfragmente wurden retrosynthetisch so in Oligonucleotide (18 bis 33 Nucleotide) zerlegt, daß an den Verknüpfungspunkten Überlappungen von sechs Basenpaaren vorliegen. Die benötigten 34 Oligonucleotide wurden mit der Phosphoramidit-Methode an fester Phase nach *Caruthers et al.*<sup>[6]</sup> synthetisiert und die Rohprodukte durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese oder HPLC (C18-reversed phase oder Ionenaustauscher Partisil SAX) gereinigt. Die Oligonucleotide Ia–IIIb entstanden als 5'-Hydroxyverbindungen. Daher wurden die an beiden Enden zu verknüpfenden Oligomere Ib–Ii, IIb–IIk und IIIb–IIIk mit Adenosintriphosphat und T4-Polynucleotid-Kinase am 5'-Ende phosphoryliert. Zur enzymatischen Verknüpfung wurden je 1 nmol der Oligomere Ia–Ij in wäßriger Lösung 5 min

auf 90°C erhitzt und danach langsam (2–3 h) auf 16°C abgekühlt, um eine Hybridisierung zum DNA-Doppelstrang zu erreichen. Nach Zugabe des Enzyms Polynucleotid-Ligase incubierte man 18 h bei 16°C und isolierte das entstandene Subfragment IFN-I durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Auf gleiche Weise wurden auch die Subfragmente IFN-II und IFN-III aus den Oligonucleotiden IIa–III bzw. IIIa–IIIb hergestellt. Nach der Subklonierung der Genfragmente in geeigneten Plasmiden steht eine unerschöpfliche Quelle für diese Fragmente zur Verfügung, da sie nach Schneiden mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *BamHI* aus IFN-I mit *BamHI* und *HindIII* aus IFN-II und mit *HindIII* und *SalI* aus IFN-III reisoliert werden können. Die DNA-Sequenz wurde jeweils durch Sequenzierung bestätigt<sup>[7]</sup>.

Mit Polynucleotid-Ligase wurden die Genfragmente zum Gesamtgen (Abb. 2) verknüpft, das dann in ein mit *EcoRI* und *SalI* geöffnetes Plasmid direkt hinter einer Expressionsregulationseinheit (tac-Promotor<sup>[8]</sup>) inseriert wurde. Nach Transformation und Klonierung in *E. coli* konnten wir die Korrektheit des gesamten Gens durch Restriktionsenzym-Kartierung und Totalsequenzierung nach *Maxam* und *Gilbert*<sup>[7]</sup> bestätigen. Zur Expression des Human-Gammainterferongens wurden transformierte Zellen von *E. coli* 7902 in einer Schüttelkultur bis zu einer optischen Dichte von 1 bei 578 nm kultiviert. Danach wurde die Synthese des Gammainterferons durch Zugabe von Isopropyl-β-D-thiogalactosid (IPTG; 10<sup>-3</sup> M) 2 h induziert. Nach Ernten der Zellen durch Zentrifugation und Zellaufschluß durch Lysozym/EDTA-Behandlung wurden die in den Zellüberständen erreichten Gammainterferontiter sowohl durch einen auf Human-Gammainterferon spezifischen Radioimmunoassay (Firma CELLTECH, Slough, Großbritannien) wie auch durch einen biologischen Test auf Schutzwirkung des Gammainterferons bei Vero-Zellen gegen eine virale Infektion (Vesicular-Stomatitis-Virus) bestimmt. Induzierte Kulturen wiesen Interferontiter von 1 mg pro Liter und OD (Optische-Dichte-Einheit bei 578 nm) auf, während nicht induzierte Kulturen lediglich 0.01 mg Gammainterferon pro Liter und OD produzierten. Die interferonhaltigen Überstände wurden anschließend mit monokonalen Antikörpern (Firma CELLTECH), die an Affinitätsäulen gebunden waren, gereinigt und die von den Antikörpern spezifisch gebundene Fraktion auf SDS-Polyacrylamidgelelen analysiert. Die gefundene Proteinbande entsprach einem Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 16000 (Molekulargewicht von γ-IFN).

Eingegangen am 2. August,  
ergänzt am 10. Oktober 1984 [Z 945]

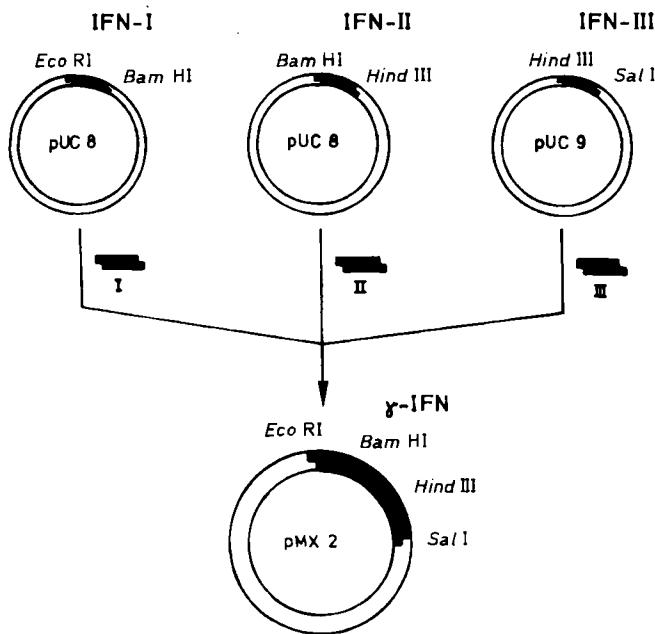


Abb. 2. Klonierungsvektoren pUC8 und pUC9 mit den Genfragmenten IFN-I–IFN-III und Expressionsvektoren pMX2 mit der tac-Regulationseinheit. Zur Konstruktion des Expressionsvektors pMX2 wurden zunächst die Genfragmente IFN-I–IFN-III in pUC8 bzw. pUC9 wie folgt subkloniert. 1 µg des pUC-Plasmids (Firma BRL, Neu-Isenburg) wurden mit 2 bis 5 Einheiten der Restriktionsendonukleaseen bei 37°C 2 h in einem Puffer nach Maßgabe des Herstellers verdaut. Danach wurde das Rumpfplasmid von den herausgeschnittenen Oligonucleotiden durch Elektrophorese auf einem 0.7proz. niedrigschmelzenden Agarosegel abgetrennt. Nach Ausschneiden der gewünschten Bande, Auflösen des Gels bei 60°C, Phenol- und Etherextraktion der wäßrigen Phase, wurde die Plasmid-DNA durch Fällung mit Ethanol wieder gewonnen. 0.1 µg des geöffneten Plasmids wurden anschließend mit 0.2 µg des jeweiligen synthetischen DNA-Fragments mit 10 Einheiten T4-DNA-Ligase bei 4°C ca. 15 h ligiert und nach der CaCl<sub>2</sub>-Methode in *E. coli* 7902 transformiert. Klone mit hybriden Plasmiden wurden nach einer Schnelllysat-Methode durch Alkalibehandlung [9] aufgearbeitet und anhand des Restriktionsenzymeschnittmusters auf 10proz. Agarosegelen analysiert. Die Genfragmente IFN-I–IFN-III wurden mit den jeweiligen Restriktionsendonukleaseen aus den pUC-Vektoren herausgeschnitten, durch Elektroelution, Phenolextraktion und Fällung mit Ethanol reisoliert und die Korrektheit beider DNA-Strände durch Sequenzierung nach *Maxam* und *Gilbert* [7] bestätigt. Dann wurde durch Ligation der drei Genfragmente IFN-I, IFN-II und IFN-III das Gesamtgen für γ-IFN erhalten, das wiederum in ein Expressionsplasmid stromabwärts der tac-Kontrollregion (trp-lac-Fusionspromotor, lac-Operator) [8], wie für die Subfragmente beschrieben, eingebaut wurde.

- [1] W. E. Stewart II: *The Interferon System*, 2. Aufl. Springer, Berlin 1981.
- [2] P. W. Gray, D. W. Leung, D. Pennica, E. Yelverton, R. Najarian, C. Simonsen, R. Deryck, P. J. Sherwood, D. M. Wallace, S. L. Berger, A. D. Levinson, D. V. Goeddel, *Nature London* 294 (1982) 503.
- [3] R. Devos, H. Cheroutre, Y. Taya, W. Degrave, H. van Heuverswyn, W. Fiers, *Nucleic Acids Res.* 10 (1982) 2487.
- [4] M. D. Edge, A. R. Greene, G. R. Heathcliffe, P. A. Meacock, W. Schuck, D. B. Scanlon, T. C. Atkinson, C. R. Newton, A. F. Markham, *Nature London* 292 (1981) 756.
- [5] S. Tanaka, T. Oshima, K. Ohsuye, T. Ono, A. Mizono, A. Ueno, H. Nakazato, M. Tsujimoto, N. Higashi, T. Noguchi, *Nucleic Acids Res.* 11 (1983) 1707.
- [6] M. H. Caruthers, S. L. Beaucage, K. Becker, W. Efcavitch, E. F. Fischer, G. Galloppi, R. Goldman, P. de Haseth, F. Martin, M. Matteucci, Y. Stabinsky in Setlow, Hollaender: *Genetic Engineering*, Vol. 4. Plenum, New York 1982, S. 1–17.
- [7] W. Gilbert, A. Maxam, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 74 (1977) 560; siehe auch W. Gilbert, *Angew. Chem.* 93 (1981) 1037.
- [8] E. Amann, J. Brosius, M. Ptashne, *Gene* 25 (1983) 167.
- [9] H. C. Birnboim, J. Doly, *Nucleic Acids Res.* 7 (1979) 1513.