

Síntesis total del gen de la eritropoyetina humana

V. JIMÉNEZ¹, R. GÜMIL¹, J. DE LA FUENTE², R. LEONART², R. RUBIERA², G. VILLEGAS¹, B. BENCOMO¹ y L. HERRERA²

¹ División de Proteínas y Hormonas, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) Apartado 6162, La Habana, Cuba

² División de Genética de Células de Mamíferos (CIGB)

Recibido en agosto de 1990

Aprobado en mayo de 1991

RESUMEN

En el presente trabajo se reporta la síntesis total del gen que codifica para la eritropoyetina humana, hormona glicoproteica de 166 aminoácidos, que constituye la hormona principal para la regulación y el mantenimiento, a niveles fisiológicos, de la masa de eritrocitos circulantes en la sangre. El diseño del gen sintético de 620 pb, incluye la secuencia que codifica para el péptido señal de 27 aminoácidos, la secuencia consenso CCACC, los sitios de restricción Bgl II y EcoR I en los extremos 5' y 3' y los codones más frecuentes en eucariotas. Fueron sintetizados en fase sólida, por el método del β -cianoetilfosforamidito, 54 oligonucleótidos. El gen sintetizado, uno de los mayores reportados sin el uso de subclonajes de fragmentos, fue insertado en un vector de expresión para células de mamíferos y secuenciado totalmente por el método de Sanger.

SUMMARY

The human erythropoietin gene (EPO), a glycoprotein hormone of 166 amino acid residues, that is the principal hormone involved in the regulation and maintenance of a physiological level of circulating erythrocyte mass, has been chemically synthesized. The design of the synthetic gene of 620 bp, included the signal peptide sequence (27 a.a.), initiation and termination signals, Bgl II and EcoR I restriction enzyme sites, the consensus sequence

CCACC and eukaryotic-preferred codons. Fifty four oligodeoxyribonucleotides were synthesized on polymer support by the β -cyanoethylphosphoramidite chemistry. The synthetic gene, one of the greatest reported without fragments subcloning, was cloned in a mammalian cells expression vector and totally sequenced by Sanger method.

INTRODUCCION

La eritropoyetina (EPO) es la hormona principal asociada a la regulación y al mantenimiento a niveles fisiológicos de la masa de eritrocitos circulantes en la sangre de los mamíferos (Goldwasser, 1984; Graber y Krantz, 1978).

Esta hormona se produce principalmente en los riñones y en el hígado humanos (Adamson *et al.*, 1968; Jacobson *et al.*, 1957; Fried, 1972). Fue aislada y purificada de la orina de pacientes con anemia y realizados diferentes estudios biológicos y estructurales (Espada y Gutnisky, 1970; Miyake *et al.*, 1977; Yanagawa *et al.*, 1984). El gen de la EPO fue clonado y expresado en células de mamíferos (Jacobs *et al.*, 1985; Lin *et al.*, 1985; Powell *et al.*, 1986).

La EPO humana es una glicoproteína de 166 aminoácidos de peso molecular (aproximado) de 35 000 Da. El 24-50 % de su masa molecular corresponde a los carbohidratos presentes en su estructura (Yanagawa *et al.*, 1984; Jacobs *et al.*, 1985). La EPO purificada de la orina de individuos con anemia aplásica, consiste de dos formas distinguibles α y β , que difieren en el contenido de carbohidratos (31 y 24 % respectivamente) (Miyake *et al.*, 1977).

La secuencia de aminoácidos de la EPO (ver figura 1), presenta tres sitios potenciales de N-glicosidación de acuerdo con la presencia de Asn-X-Ser/Thr (Parekh *et al.*, 1989) en las asparaginas de las posiciones 24, 38 y 83 y una O-glicosidación en la serina de la posición 126 (Broudy *et al.*, 1988; Dubé *et al.*, 1988). Además presenta dos puentes disulfuros, uno formado entre las cisteínas 7 y 161 y el otro entre las cisteínas 29 y 33 (Lai *et al.*, 1986).

Los carbohidratos presentes resultan indispensables para su actividad eritropoyética, constituyendo la estructura ramificada de los oligosacáridos, de una influencia decisiva para su actividad biológica (Takeuchi *et al.*, 1989) y en el proceso de biosíntesis, maduración y secreción de la EPO (Dubé *et al.*, 1988).

Existen numerosos estudios de aplicación clínica de EPO humana recombinante en la anemia asociada a fallo renal crónico, con resultados muy favorables (Winearls *et al.*, 1986; Eschbach *et al.*, 1989; Urabe *et al.*, 1988). También se ha usado con éxito en el tratamiento de la anemia asociada a algunos tipos de cáncer (Miller *et al.*, 1990; Ludwig *et al.*, 1990) así como en el tratamiento de la anemia asociada a la artritis reumatoidea (Pincus *et al.*, 1990) y en los pacientes de SIDA que

desarrollan anemia cuando son tratados con 3'-azidotimidina (AZT) (Fischl *et al.*, 1990).

En el presente trabajo se reporta la síntesis químico-enzimática del gen que codifica para la EPO humana, lo que constituye la primera vez que ésta se reporta.

La secuencia nucleotídica de la EPO humana ha sido reportada por varios grupos de investigadores (Jacobs *et al.*, 1985; Lin *et al.*, 1985; Powell *et al.*, 1986). A partir de ella diseñamos una variante para la síntesis química de este gen (ver figura 1), que contuviera, además de la secuencia codificante para el gen EPO, la secuencia que codifica para el péptido señal de 27 aminoácidos, la secuencia consenso CCACC precediendo el ATG y los sitios Bgl II y EcoR I, en los extremos 5' y 3' para facilitar la inserción del gen en un vector adecuado para su expresión en células de mamíferos.

MATERIALES Y METODOS

Enzimas y reactivos

La T4 ADN ligasa fue suministrada por ENZIBIOT (Cuba) y la T4 polinucleótido quinasa (PNK) utilizada fue de la casa BioLABS (USA) y ENZIBIOT (Cuba).

Los solventes utilizados para la síntesis de los β -cianoetilfosforamiditos fueron purificados de acuerdo con lo descrito en trabajo anterior (Jiménez *et al.*, 1990). El 1H-tetrazol (Aldrich y Fluka) fue purificado por sublimación. El [τ 32 P] ATP (>500 Ci/nmol; 1 Ci = 37 GBq) fue suministrado por la casa Amersham.

Los nucleósidos 5'-0-Dimetoxitritil-N-acilados fueron preparados según lo descrito en trabajo anterior (Jiménez *et al.*, 1984). La síntesis de los N,N-diisopropil- β -cianoetilfosforamiditos se realizó en lo fundamental de acuerdo con lo descrito (Sinha *et al.*, 1984).

El vidrio de poro controlado con cadena alquilaminada de 500 Å (Pierce), fue funcionalizado de acuerdo con lo descrito en trabajo anterior (Jiménez *et al.*, 1990).

Síntesis de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos fueron preparados mediante un sintetizador automático Gene Assembler (Pharmacia) utilizando el método del β -cianoetilfosoramidito, en la escala de 1,3 μ moles y con una eficiencia por ciclo superior al 98%.

Purificación de los oligonucleótidos

Se siguieron los mismos procedimientos descritos en trabajo anterior (Jiménez *et al.*, 1990).

Fosforilación conjunta

Una mezcla de 3 a 6 oligonucleótidos (0,5 nmoles de cada uno), 1 nmol de ATP/0,5 nmoles de oligonucleótido, 1 μ Ci [γ - 32 P]ATP/0,5 nmoles de oligonucleótido, en solución tampón (50 mM Tris-HCl, pH 7,6; 10 mM MgCl₂; 5 mM DTT; 0,1 mM espermidina; 0,02 mM EDTA (Valenzuela y Méndez, 1982) y en un volumen total de 30 μ l, se incubó a 37°C durante 30 minutos. Después de inactivar la enzima calentando a 90-95°C durante 3 minutos, se utiliza la mezcla de oligonucleótidos fosforilados sin purificar.

Síntesis enzimática

Para la síntesis total del gen de la EPO se siguió el esquema mostrado en la figura 4A-D. Los fragmentos E₁E₈, E₄E₁₅, E₁₂E₁₈, P₁P₆, P₃P₁₃, P₁₀P₁₆, O₁O₈, O₄O₁₆ y O₁₂O₂₀ (figura 3 A-C), fueron sintetizados según se explica a continuación.

Las soluciones de los oligos fosforilados de forma conjunta (no fueron fosforilados los oligos de los extremos 5' E₁ y 3' O₂₀), se ajustan a una solución 50 mM Tris-HCl, pH 7,6; 10 mM MgCl₂, se calientan a 100°C durante 1 minuto y se dejan enfriar lentamente (alrededor de 0,5°C/min). Se adicionan DTT (10 mM), ATP (2 mM) y 100 unidades/ml de T4 ADN ligasa. La mezcla se incubó 2 horas a temperatura ambiente. Se precipita con 2,5 volúmenes de etanol y se purifica en electroforesis de geles preparativos (2 mm de espesor) de poliacrilamida al 10% en condiciones no desnaturalizantes. Los fragmentos de doble cadena se detectan mediante autorradiografía y se cortan las bandas apropiadas.

Los fragmentos de geles se electroeluyen en papeles de DEAE celulosa, utilizando una corriente de 10 mA por tubo de electroelución durante 20 minutos. Los papeles de DEAE celulosa se tratan con NaCl 1M a 45°C durante 15 minutos y se realiza

posteriormente la precipitación del fragmento de ADN con 2,5 volúmenes de etanol.

Para obtener los fragmentos E (209/214 pb), P (194/196 pb) y O (217/210 pb) (ver figura 4) se mezclan los subfragmentos E₁E₈, E₄E₁₅, E₁₂E₁₈; P₁P₆, P₃P₁₃, P₁₀P₁₆ y O₁O₈, O₄O₁₆ y O₁₂O₂₀ (ver figura 4 A-C) en cantidades equimoleculares, efectuando igual procedimiento al descrito anteriormente, sólo que el calentamiento inicial para efectuar la hibridación se realizó a 50°C con posterior enfriamiento lento a la temperatura ambiente.

La síntesis final del gen EPO, de 620 pares de bases (ver figura 4), se obtuvo mediante la síntesis enzimática de los fragmentos E, P y O, en cantidades equimoleculares (18 pmoles) con un procedimiento igual al descrito en el párrafo anterior (ver figura 3D).

Después de clonar el gen EPO en el plasmidio pAd25, este fue secuenciado en su totalidad mediante el método de Sanger (Chen y Seeburg, 1985). En la figura 6 se muestra parte de la secuencia de la región carboxi terminal, correspondiente a las bases 524-620.

RESULTADOS Y DISCUSION

Diseño del gen sintético

El gen de la EPO fue diseñado teniendo en cuenta la secuencia reportada por varios grupos (Jacobs *et al.*, 1985; Lin *et al.*, 1985; Powell *et al.*, 1986) que incluye además la secuencia que codifica para el péptido señal de 27 aminoácidos y la secuencia consenso CCACC que precede al ATG, reportado por M. Kozak, que permite una alta eficiencia de inicio de la traslación en el ARNm de mamíferos (Kozak 1986).

Utilizando un paquete de programas de computación* y haciendo uso de los codones más frecuentes en mamíferos (tabla 1) (Maruyama *et al.*, 1986), fueron detectadas y reemplazadas (sin que conlleven variaciones en la secuencia aminoacídica) las secuencias repetidas y repetidas inversas mayores de cinco bases, lo que facilita la síntesis enzimática (Jiménez *et al.*, 1990).

* Ochagavía, M., *et al.*, resultados no publicados.

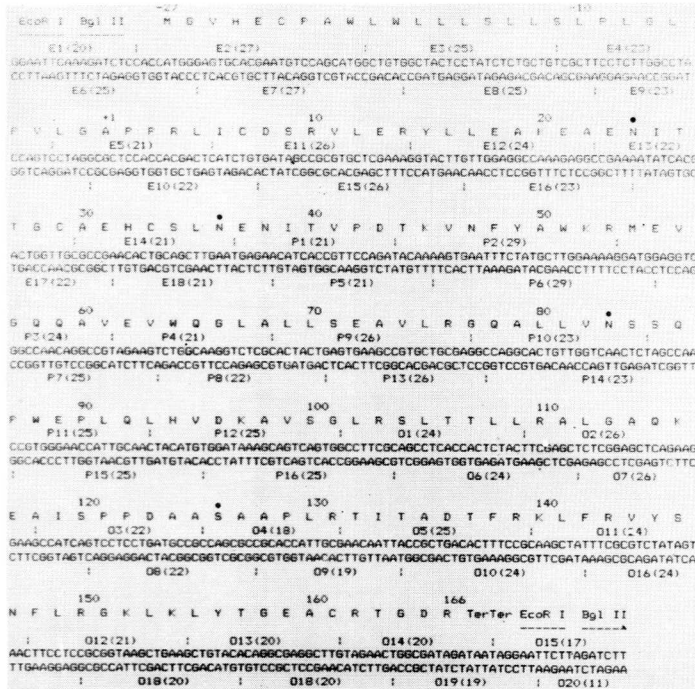


FIG. 1. Secuencias nucleotídica y de aminoácidos del gen sintético de la eritropoyetina humana. El gen fue dividido en 3 regiones E, P y O. Se señalan los 54 oligonucleótidos sintetizados y su tamaño entre paréntesis. Los aminoácidos señalados con puntos gruesos representan los sitios de glicosidación.

TABLA I
FRECUENCIA DE USO DE CODONES DEL GEN SINTÉTICO Y NATURAL DE LA ERITROPOYETINA HUMANA.

	U	C	A	G	
U	F L	S	Y Ter Ter	C Ter V	U C A G
	L	P	H Q	R	U C A G
C	L	P	H Q	R	U C A G
	I	T	N	S	U C A G
A	I	T	N	S	U C A G
	M		K	R	U C A G
G	V	A	D E	G	U C A G

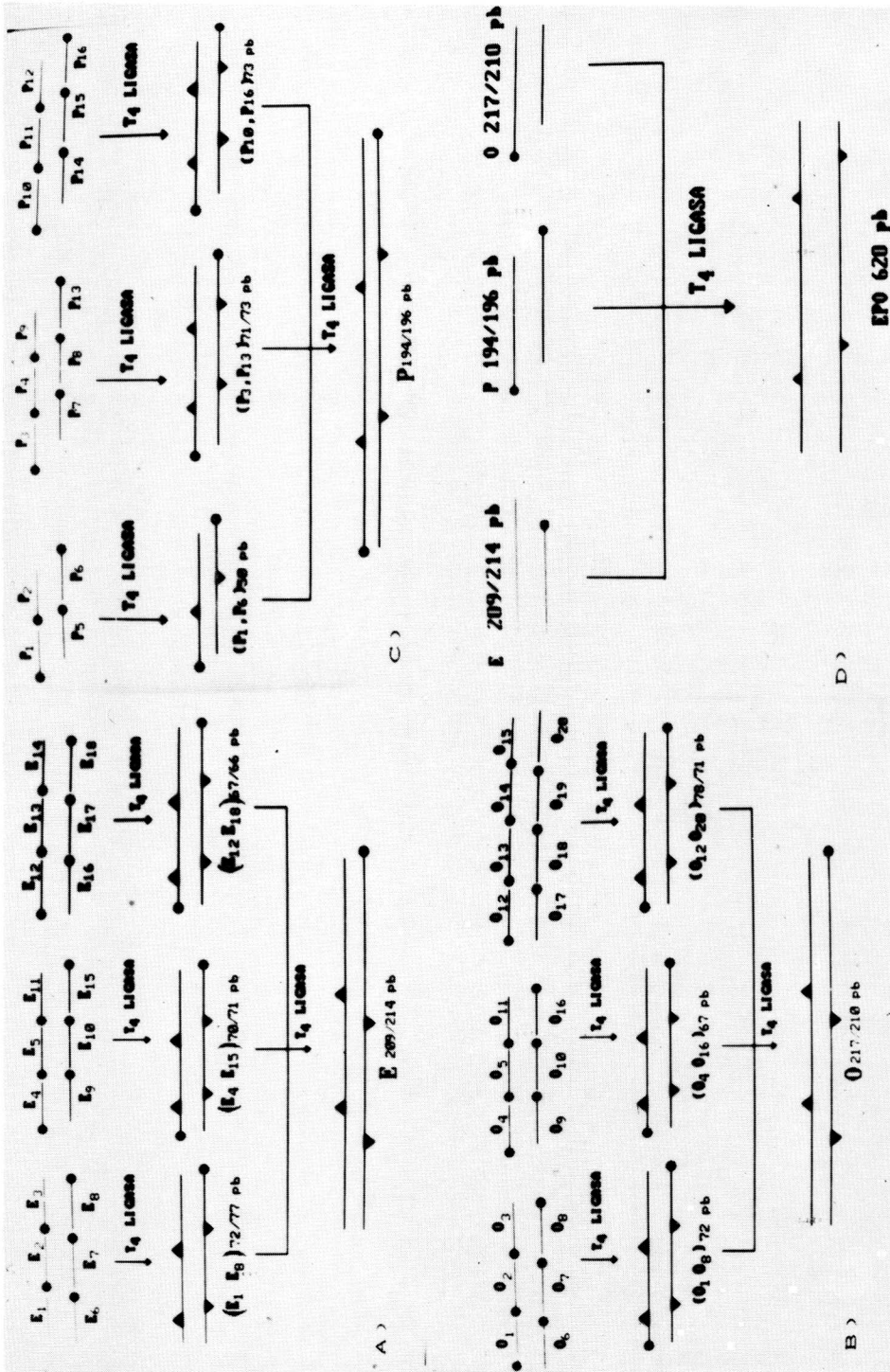


FIG. 3. Estrategia de ligazón. Los puntos gruesos en los extremos de los oligonucleótidos representan las posiciones 5'-fosforilados.

Síntesis de oligonucleótidos

Utilizando una máquina sintetizadora automática fueron sintetizados por el método del β -cianoetilfosforamido en fase sólida de vidrio de poro controlado (Sinha *et al.*, 1984) 54 oligonucleótidos de longitudes de 11-29 bases.

Los oligonucleótidos fueron purificados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 20%, 7 M urea y cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

Estrategia de ligazón

Los oligonucleótidos fosforilados de forma conjunta (excepto los terminales 5' E₁ y O₂₀), descritos en trabajo anterior (Jiménez *et al.*, 1990), fueron ligados mediante T4 ligasa para producir 9 subfragmentos: E₁E₈, E₄E₁₅, E₁₂E₁₈, P₁P₆, P₃P₁₃, P₁₀P₁₆, O₁O₈, O₄O₁₆ y O₁₂O₂₀ (figuras 3 A-C). Los fragmentos E (209/214 pb), P (194/196 pb) y O (217/210 pb), se obtienen mediante la síntesis enzimática de los subfragmentos anteriores (figuras 3A-C y 4).

Posteriormente estos tres fragmentos E, P y O se ligan para producir el gen que codifica para la eritropoyetina humana de 620 pares de bases (figuras 3D y 5).

Todas las síntesis enzimáticas fueron seguidas por electroforesis de geles de poliacrilamida al 10%, los fragmentos detectados mediante autorradiografía y extraídos del gel según lo descrito en trabajo anterior (Jiménez *et al.*, 1990).

El gen sintético de la eritropoyetina humana, fue clonado en el vector de expresión para células de mamíferos pAd25* y secuenciado en su totalidad por el método de Sanger (Sanger *et al.*, 1977; Chen y Seeburg, 1985). A modo de ejemplo, en la figura 6 se muestra la zona del gen que codifica para la región carboxi terminal de la proteína madura.

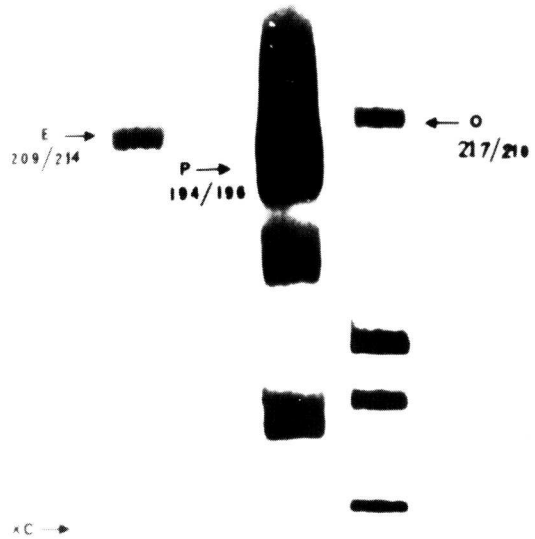


FIG. 4. Autorradiograma de la síntesis enzimática de los fragmentos E (209/214 pb), P (194/196 pb) y O (217/210 pb). Gel de poliacrilamida: 10%

* R. Leonart (resultados no publicados).

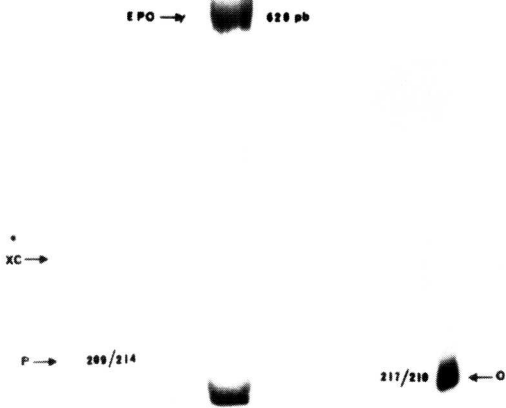


FIG. 5. Autorradiograma de la síntesis enzimática final del gen sintético de la eritropoyetina humana (620 pb). Se colocaron como referencia los fragmentos E (209/214 pb) y O (217/210 pb). Gel de poliacrilamida: 5%

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a R. Ortega por la preparación de algunas figuras del presente trabajo.

REFERENCIAS

ADAMSON, J.M.; J.W. ESCHBACH y C.A. FINCH (1968). The kidney and erythropoiesis. *Am. J. Med.* **44**: 725-733

BRINGAS, R. y S. PEREZ (1986). CIFSOFT Un paquete de programas para el análisis de ácidos nucleicos y proteínas. *Interferón y Biotecnología* **3**(3): 225-228

BROUDY V.C.; J.F. TAIT y J.S. POWELL (1988). Recombinant human erythropoietin: Purification and analysis of carbohydrate linkage. *Arch. Biochem. & Bioph.* **265**: 329-336

CHEN, E. y P. SEEBURG (1985). Supercoil sequencing: a fast simple method for sequencing plasmid DNA. *DNA* **4**: 165-170

DUBE, S.; J. W. FISHER y J. S. POWELL (1988). Glycosylation at specific sites of erythropoietin is essential for biosynthesis, secretion and biological function. *J. Biol Chem.* **263**: 17516-17521.

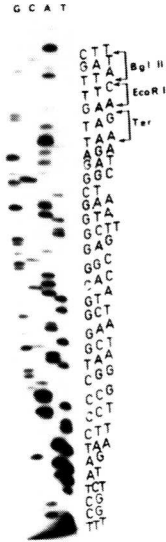


FIG. 6. Autorradiograma de la secuencia nucleotídica de la región carboxi terminal, correspondiente a las bases 524-620 del gen sintético EPO.

ESCHBACH, J.W.; M.H. ABDULHADI; J.K. BROWNE; B.G. DELANO; M.R. DOWNING; J.C. EGRIE; R.W. EVANS; E.A. FRIEDMAN; S.E. GRABER; N.R. HALEY; S. KORBET; S.B. KRANTZ; A.P. LUNDIN; A.R. NISSENSON; D.A. OGDEN; E.P. PAGANINI; B. RADER; E.A. RUTSKY; J. STIVELMAN; W.J. STONE; P. TESCHAN; J.C. Van WYCK; K. ZUKERMAN y J.W. ADAMSON (1989a). Recombinant human erythropoietin in anemic patients with end-stage renal disease. Results of a Phase III multicenter clinical trial. *Ann. Int. Medicine* **111**: 992-1000.

ESPADA, J. y A. GUTNISKY (1970). Purificación de eritropoyetina urinaria humana. *Acta Physiol. Lat. Am.* **20**: 122-129.

FISCHL, M.; J.E. GALPIN; J.D. LEVINE; J.E. GROOPMAN; D.H. HENRY; P. KENNEDY; S. MILES; W. ROBBINS; B. STARRETT; R. ZALUSKY; R.I. ABELS; H.C. TSAI y S.A. RUDNICK (1990). Recombinant human erythropoietin for patients with AIDS treated with zidovudine. *New Engl. J. of Med.* **322**: 1488-1493.

FRIED, W. (1972). The liver as source of extrarenal erythropoietin. *Blood* **40**: 671-677.

FRIED, W.; J. BARONE-VARELAS y C. MORLEY (1984). Factors that regulate extrarenal erythropoietin production. *Blood Cells* **10**: 287-304.

- GOLDWASSER, E. (1984). Erythropoietin and its mode of action. *Blood Cells* 10: 147-162.
- GRABER, S.E. y S.B. KRANTZ (1978). Erythropoietin and the control of red cell production. *Ann. Rev. Med.* 29: 51-66.
- JACOBS, K.; C. SHOEMAKER; R. RUDERSDORF; S.D. NEILL; R.J. KAUFMANN; A. MUFSON; J. SEEHRA; S.S. JONES; R. HEWICK; E.F. FRITSCH; M. KAWAKETA, T. SHIMIZU y T. MIYAKE (1985). Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature* 313: 806-810.
- JACOBSON, L.O.; E. GOLDWASSER, E. FRIED y L. PLZAK (1957). Role of the kidney in erythropoiesis. *Nature* 179: 633-634.
- JAYARAMAN, K.; J. SHAH y J. FYLES (1989). PCR mediated gene synthesis. *Nucleic Acids Res.* 17: 4403.
- JIMENEZ, V.; G. PADRON; L. CASTELLANOS y L. RODES (1984). Síntesis química de oligonucleótidos por el método del fosfotriéster. *Interferón y Biotecnología* 1(3): 39-51.
- JIMENEZ, V.; R. GÜMIL, R. UBIETA, M. OCHAGAVIA, A. SILVA, G. VILLEGAS y L. HERRERA (1990). Síntesis química-enzimática del gen de la proinsulina humana. *Biotecnología Aplicada* 7(2): 142-152.
- KOZAK, M. (1986). Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* 44: 283-292.
- LAI P.H.; R. EVERETT, F.F. WANG, T. ARAKAWA y E. GOLDWASSER (1986). Structural characterization of human erythropoietin. *J. Biol. Chem.* 261: 3116-3121.
- LIN, F.K.; S. SUGGS, C.H. LIN, J.K. BROWNE, R. SMALLING, J.C. EGRIE, K.K. CHEN, G.M. FOX, F. MARTIN, Z. STABINSKY, S.M. BADRAWI, P.H. LAI y E. GOLDWASSER (1985). Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 7580-7584.
- LUDWIG, H.; E. FRITZ, H. KOLTZMANN, P. HÖCKER, H. GISSLINGER y U. BARNAS (1990). Erythropoietin treatment of anemia associated with multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* 322: 1693-1699.
- MARUYAMA T.; T. GOJOBORI, S. AOTA y T. IKEMURA (1986). Codon usage tabulated from the GenBank genetic sequence data. *Nucleic Acids Res.* 14 Supp.: r151-r197.
- MILLER, C.B.; R.J. JONES, S. PIANTADOSI, M.D. ABELOFF y J.L. SPIVAK (1990). Decreased erythropoietin respons in patients with anemia of cancer. *N. Engl. J. Med.* 322: 1689-1692.
- MIYAKE, T.; C.K.H. KUNG y E. GOLDWASSER (1977). Purification of human erythropoietin. *J. Biol. Chem.* 252: 5558-5564.
- NAUGHTON, B.A.; S.M. KAPLAN, M. ROY, A.J. BURDOWSKI, A.S. GORDON y S.J. PILIERO (1977). Hepatic regeneration and erythropoietin production in the rat. *Science* 196: 301-302.
- PAREKH R.B.; R.A. DWEK, C.J. EDGE y T.W. RADEMACHER (1989). N-glycosylation and the production of recombinant glycoproteins. *TIBTECH* 7: 117-121.
- PINCUS, T.; N.J. OLSEN; I.J. RUSSELL; F. WOLFE; R. HARRIS; T.J. SCHNITZER; J.A. BOCCAGNO y S.B. KRANTZ (1990). Multicenter study of recombinant humanerythropoietin in correction of anemia in rheumatoid arthritis. *Amer. J. of Med.* 89: 161-168.
- POWELL, J. S., K. L. BERKNER, R. V. LEBO y J. W. ADAMSON (1986). Human erythropoietin gene: High level expression in stably transfected mammalian cells and chromosome localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 6465-6469
- SANGER, F.; S. NICKLEN y A.R. COULSON (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 463-467.
- SINHA, N. D.; J. BIERNAT, J. McMANUS y H. KÖSTER (1984). Polymer support oligonucleotide synthesis XVIII: use of β -cyanoethyl N,N-dialkiylamino-N-morpholinophosphoramidite of deoxynucleosides for the synthesis of DNA fragments simplifying deprotection and isolation of the final product. *Nucleic Acids Res.* 12: 4539-4557.
- URABE, A.; F. TAKAKU, H. MIZOGUCHI, K. KUBO, K. OTA, N. SHIMIZU, K. TANAKA, N. MIMURA, H. NIHEI, S. KOSHIKAWA, T. AKIZAWA, N. AKIYAMA, O. OTSUBO, Y. KAWAGUCHI y T. MAEDA (1988). Effect of recombinant human erythropoietin on the anemia of chronic renal failure. *Int. J. Cell Cloning* 6: 179-191.
- VALENZUELA, P. y B. MENDEZ (1982). *Techniques in Molecular Biology*. San Francisco, USA.
- WINEARLS, C.G.; D.O. OLIVER; M.J. PIPPARD; C. REID; M.R. DOWNING y P.M. COTES (1986). Effect of human erythropoietin derived from recombinant DNA on the anaemia of patients maintained by chronic haemodialysis. *Lancet* II 8517: 1175-1178.
- YANAGAWA S.; K. HIRADE, H. OHNOTA, R. SASAKI, H. CHIBA, M. UEDA y M. GOTO (1984). Isolation of human erythropoietin with monoclonal antibodies. *J. Biol. Chem.* 259: 2707-2710.