

 pismavavilov.ru

DOI 10.18699/LettersVJ2021-7-16

Обзор

Как в Институте цитологии и генетики СО АН СССР синтезировали ген β -интерферона *IFNB1* человека

С.И. Ошевский 

Аннотация: В 1980-е гг. в лаборатории генной инженерии Института цитологии и генетики Сибирского отделения АН СССР (Новосибирск) синтезировали олигонуклеотиды и олигонуклеотидные производные и собрали из них один из четырех искусственных на тот момент крупнейших генов в мире – ген β -интерферона человека – и получили бактериальный продуцент β -интерферона на основе *Escherichia coli*. Этой знаковой работе исполняется 40 лет, и она занимает важное место в истории Института и в судьбе людей, ее выполнявших. Работой занимался коллектив авторов: В.П. Кумарев, М.И. Ривкин, Н.В. Амирханов, Л.В. Баранова, В.С. Богачев, М.Л. Кобец, С.И. Ошевский, Л.В. Обухова, В.Н. Рыбаков, К.Д. Кузнецов, С.И. Вершинина, В.В. Гулевич. Статья посвящена им и, прежде всего, лидерам, организаторам, инициаторам и основным исполнителям уникального исследования: Виктору Прокопьевичу Кумареву и Марку Иосифовичу Ривкину.

Ключевые слова: человек; ген *IFNB1*; продуцент.

Благодарности: Работа частично финансировалась по бюджетному проекту ИЦиГ СО РАН № 0259-2021-0014.

Для цитирования: Ошевский С.И. Как в Институте цитологии и генетики СО АН СССР синтезировали ген β -интерферона *IFNB1* человека. *Письма в Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2021;7(3):138-147. DOI 10.18699/LettersVJ2021-7-16

Review

How the human *IFNB1* gene was synthesized at the ICG SB AS USSR

S.I. Oshevski 

Abstract: It is viewed as in the 1980s. in the newly created laboratory of genetic engineering of the Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Academy of Sciences of the USSR (Novosibirsk), oligonucleotides and oligonucleotide derivatives were synthesized and one of the four artificial at that time largest genes in the world - the human β -interferon gene was assembled and obtained a bacterial producer β -interferon based on *Escherichia coli*. This landmark work turns 40 and occupies an important place in the history of the Institute and in the fate of the people who performed it. The work was carried out by a group of authors: V.P. Kumarev, M.I. Rivkin, N.V. Amirkhanov, L.V. Baranova, V.S. Bogachev, M.L. Kobets, S.I. Oshevski, L.V. Obukhova, V.N. Rybakov, K.D. Kuznedelov, S.I. Vershinina, V.V. Gulevich. The article is dedicated to them and, above all, to the leaders, organizers, initiators, and main performers of the unique research: Viktor Prokopyevich Kumarev and Mark Iosifovich Rivkin.

Key words: human; *IFNB1* gene; producer.

For citation: Oshevski S.I. How the human *IFNB1* gene was synthesized at the IC&G SB AS USSR *Pisma v Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Letters to Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2021;7(2):138-147. DOI 10.18699/LettersVJ2021-7-16 (in Russian)

*Ничего не возникает из ничего.
Парменид*

Все началось с того, что в 1970 г. гениальный Гобинд Корана (Har Gobind Khorana) с коллегами синтезировали химическим путем первый ген – аланиновой тРНК из дрожжей (Agarwal et al., 1970), затем – ген супрессорной тирозиновой тРНК и показали его работу в условиях *in vivo* (Ryan et al., 1979). В процессе работы были заложены фундаменталь-

ные основы развития физико-химической биологии и базис практически всего дальнейшего развития синтетической химии нуклеиновых кислот. Очень многие выдающиеся ученые вышли из его школы: K.L. Agarwal, M.J. Gait, M.H. Caruthers, M. Smith (Нобелевский лауреат 1993 года) и другие. С ними мы встречались и лично общались в дружеской об-

становке, например на 16-й конференции FEBS в Москве в 1984 г., на которой В.П. Кумарев и его сотрудники представили постерный доклад о синтезе и экспрессии гена *IFNB1*.

Прежде чем запланировать синтез и экспрессию гена *IFNB1* в группе В.П. Кумарева в ИЦиГ СО АН СССР был синтезирован и экспрессирован ген ангиотензина I (Kumarev et al., 1980). Этот успех, собственно, первой в Институте генно-инженерной работы и привел к идее открытия лаборатории генной инженерии. Директор Института академик АН СССР Д.К. Беляев поддержал и всесторонне помогал осуществлению задуманного. Он возлагал большие надежды на развитие методов синтеза генов и в честь создания лаборатории организовал банкет в малом зале Дома ученых. К тому времени только что была определена первичная структура гена *IFNB1* (Taniguchi et al., 1980a), и в этом же году он был экспрессирован в *Escherichia coli* (Taniguchi et al., 1980b). В начале 1980-х гг. и в предыдущие годы шло бурное развитие методов синтетической химии нуклеиновых кислот, в связи с чем и появилась идея синтезировать более протяженные гены путем их сборки из коротких блоков – олигодезоксирибонуклеотидов. Такой подход обещал ряд преимуществ, главное из которых – возможность оптимизации структуры гена для максимальной экспрессии в клетке-хозяине. Начальным обязательным условием было создание надежного, эффективного и максимально менее затрат-

ного на тот момент метода олигонуклеотидного синтеза в Институте. Такой триэфирный метод синтеза в своем варианте и разработал В.П. Кумарев. Для синтеза олигонуклеотидных блоков длиной от 12 до 30 нуклеотидных остатков были использованы специально разработанные мономеры, димеры и тримеры (рис. 1).

Блоки запланированы таким образом, чтобы перекрываться в основном по шести нуклеотидным, а иногда и более парам. Для защиты аминогрупп оснований в мономерах (см. рис. 1) использовали бензоильную группу для А и С и изобутирильную группу для G. 5'-ОН защищали диметокситригидрильной группой. Основное достижение этого варианта синтеза состоит в использовании В.П. Кумаревым вместе со стандартной β-цианэтильной группой тиометильной группы для защиты фосфатного остатка. Это привело к ряду преимуществ: группа обеспечила более высокий выход продуктов на стадии межнуклеотидной конденсации и за счет этого оказалось возможным синтезировать олигонуклеотиды длиной до 12 звеньев из тримеров, используя хроматографический метод очистки только на последнем этапе. Это дало существенную экономию сил, времени и материалов. Применение S-метильной защитной группы позволило в одном синтезе легко получать кроме олигонуклеотида с 3'-концевым фосфатом (см. рис. 1, а), который затем с помощью ферментативной реакции полинуклеотидкиназы фага

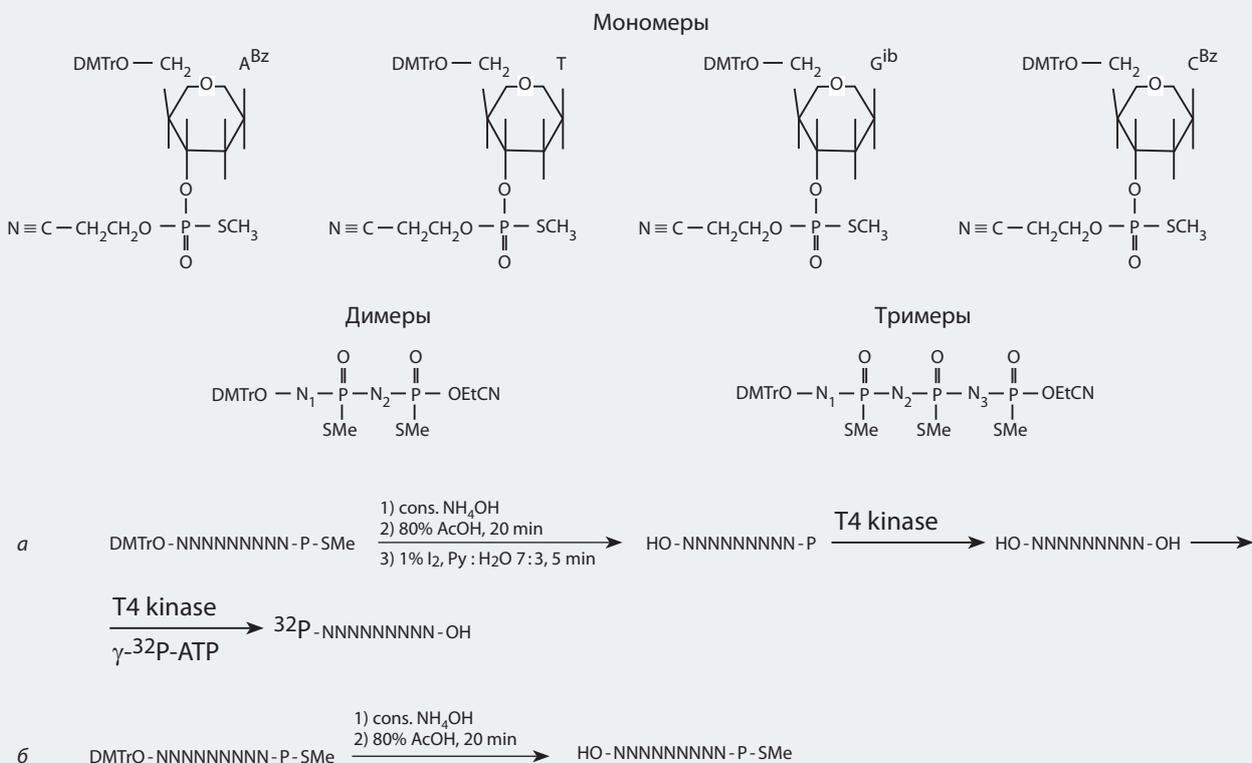
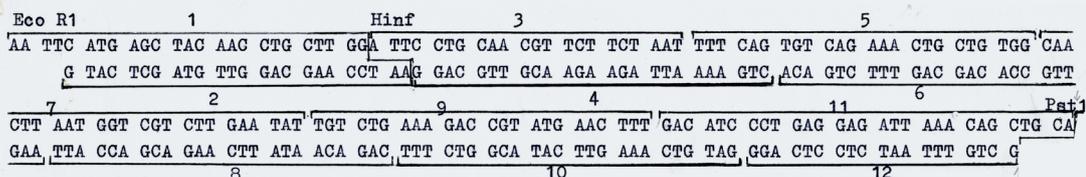


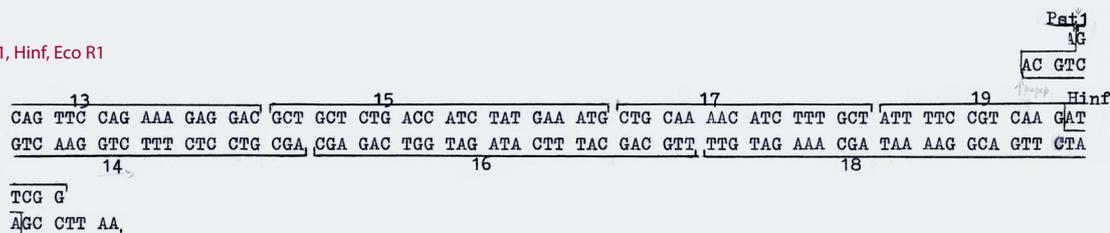
Рис. 1. Структуры мономеров, димеров и тримеров, специально разработанных и использованных для синтеза олигонуклеотидных блоков длиной от 12 до 30 нуклеотидных остатков.

Схемы получения: а – олигонуклеотид-5'-фосфата – строительного материала гена; б – вспомогательных олигонуклеотидных производных – штифтов, содержащих на 3'-конце остаток фосфата, защищенного S-метильной группой

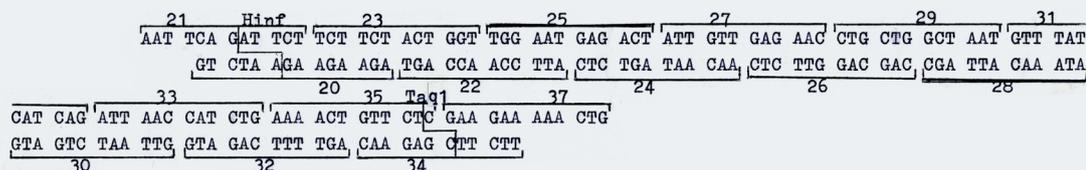
Фрагмент 1: Eco R1, Hinf, Pst1



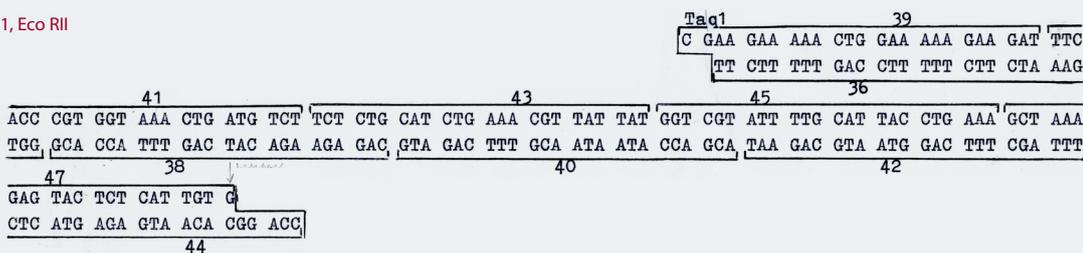
Фрагмент 2: Pst1, Hinf, Eco R1



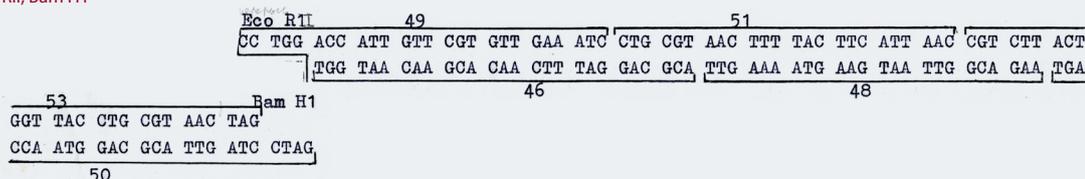
Фрагмент 3: Eco R1, Hinf, Taq1



Фрагмент 4: Taq1, Eco RII



Фрагмент 5: Eco RII, Bam H1

Рис. 2. Разбивка гена *IFNB1* на собираемые фрагменты 1–5.

Линиями и цифрами обозначены синтезированные олиго- и полинуклеотиды, из которых собирали каждый фрагмент. Показаны использованные сайты рестрикции. Приведен оригинальный рисунок периода конструирования гена, в обозначении сайтов есть арабские цифры, так как в то время номенклатура была неустоявшаяся.

T4 превращается в 5'-фосфат олигонуклеотида (на рис. 1 показан радиоактивный вариант), и другой важный компонент сборки гена – олигонуклеотид с 3'-концевым фосфатным остатком, защищенным тиометильной группой (см. рис. 1, б). Олигонуклеотидные производные были необходимы для того, чтобы в комплексе с ними лигировались (ферментативно сшивались) частично комплементарные им олигонуклеотиды с 5'-концевыми фосфатными остатками. Защищенный метильной группой 3'-тиофосфат препятствовал образованию побочных продуктов межолigonуклеотидного лигирования. Эти производные мы называли «штифтами».

Схемы сборки пяти фрагментов гена для их клонирования были различны. Для фрагментов 1, 2 и 4 сначала лигировали пары соседних олигонуклеотидов и затем, после их очистки электрофорезом, собирали из них лигированием с выделением электрофорезом фрагменты для клонирования в плаزمиды (рис. 2) pBR327, pBR327 и pBR322 соответственно.

Фрагмент 3 собирали из 12-мерных олигонуклеотидов: сначала из них лигировали три 36-звенных одноцепочечных полимера, потом их лигировали вместе на штифтах с добавлением еще одного олигонуклеотида и выделяли

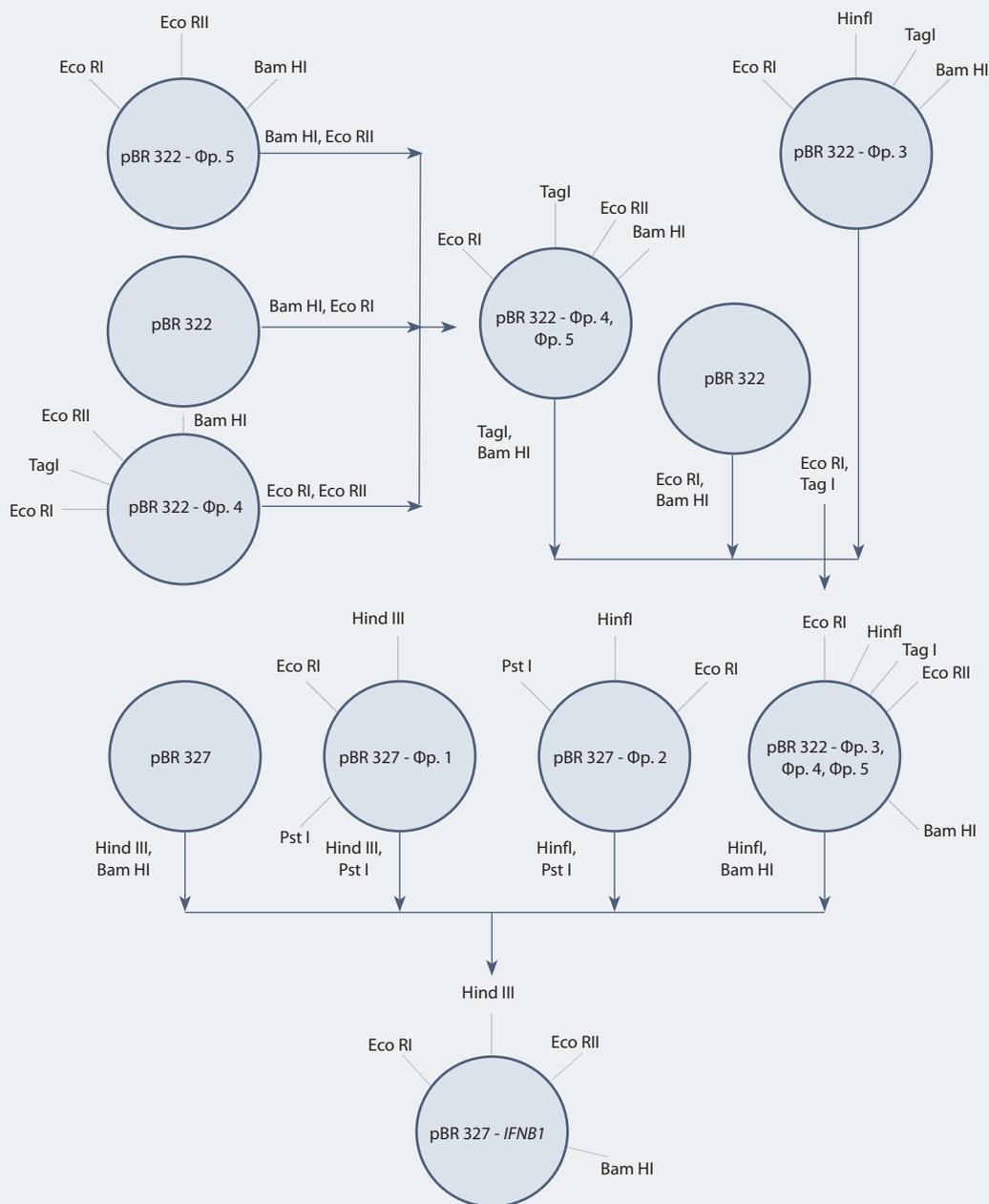


Рис. 3. Схема сборки полного гена *IFNB1* (Кумарев и др., 1987а).

На первом этапе в плазмиде pBR 322 путем последовательной сшивки соединяли фрагмент 5 и фрагмент 4, затем к нему добавляли фрагмент 3. На следующем этапе к фрагменту 3-4-5 присоединяли фрагменты 2 и 1. Все это в плазмиде pBR 327

одноцепочечный 122-мерный полимер. После синтеза второй цепи фрагмента ДНК-полимеразой I его обрабатывали рестриктазами Eco RI и Tag I (см. рис. 2) для дальнейшего клонирования в плазмиде pBR322. Используя такой метод сборки, мы существенно сократили объем олигонуклеотидного синтеза. Фрагмент 5 собирали из 24–27-звенных полинуклеотидов: отдельно лигировали двухцепочечный фрагмент из четырех полинуклеотидов, затем к нему в отдельных реакциях пришивали еще по одному недостающему полинуклеотиду в верхней и нижней цепи слева и

справа, выделяли денатурирующим электрофорезом цепи фрагмента и отжигали их для получения двуцепочечного фрагмента перед встройкой в специально подготовленную плазмиду. Схема промежуточных клонирований всех пяти фрагментов с проверкой их структур, наработкой плазмид, вырезания и аккуратной сборки всего гена *IFNB1* в плазмиде (рис. 3) с уже ее наработкой, проверкой структуры вставки и последующего переклонирования в плазмиду pSK lac95-1 (плазмида разработана нашими замечательными коллегами из ВНИИМБ Олегом Серпинским и Владимиром

M S Y N L L G F L Q R S S N F
 CACTACAGCTCTTTCCATGAGCTACAACCTTGCCTGGATTCCCTACAAAGAAGCAGCAATTT
 CACTACAGCTCTTTCCATGAGCTACAACcTGCCTGGATTCCCTGCAAcgttcttcttAATTT
 TACTCGATGTTGGACGAACCTAAGGACGTTGCAAGAAGATTAAG

Q C Q K L L W Q L N G R L E Y C L K D R
 TCAGTGTGAGAACTCCTGTGGCAATTGAATGGGAGGCTTGAATACTGCCTCAAGGACAG
 TCAGTGTGAGAAcTgCTGTGGCAAcTtAATGGtCgTCTTGAATAtTgTtCgAAaGACcG
 AGTCACAGTCTTTTGACGACACCGTTGAATTACCAGCAGAACTTATAACAGACTTCTCTGGC

M N F D I P E E I K Q L Q Q F Q K E D A
 GATGAACCTTTGACATCCCTGAGGAGATTAAAGCAGCTGCAGCAGTTCCAGAAAGGAGGACGC
 tATGAACCTTTGACATCCCTGAGGAGATTAAaCAGCTGCAGCAGTTCCAGAAaGAGGACGC
 ATACTTGAACCTGTAGGACTCCTCTAATTTGTGACGTCGTCGAAGTCTTTCTCTCTGGC

A L T I Y E M L Q N I F A I F R Q D S S
 CGCATTGACCATCTATGAGATGCTCCAGAACATCTTTGCTATTTTCAGACAAGATTCAATC
 tGCTcTGACCATCTATGAaATGCTgCAaAACATCTTTGCTATTTTCcGtCAAGATTCTtC
 ACGAGACTGGTAGATACTTTACGACGTTTGTAGAAACGATAAAAGGCAGTTCTAAGAAG

S T G W N E T I V E N L L A N V Y H Q I
 TAGCACTGGCTGGAATGAGACTATTGTTGAGAACTCCTGGCTAATGTCTATCATCAGAT
 TtctACTGGtTGGAAATGAGACTATTGTTGAGAACTgCTGGCTAATGTtTATCATCAGAT
 AAGATGACCAACCTTACTCTGATAACAACCTCTGGACGACCGATTACAATAGTAGTCTA

N H L K T V L E E K L E K E D F T R G K
 AAACCATCTGAACACAGTCTCTGGAAGAAAACTGGAGAAAAGAAATTTACCAAGGGAA
 tAAACCATCTGAaAACtGtTCTcGAAGAAAACTGGAAaAAAAGAAATTTACCCcGtGGtAA
 ATTGGTAGACTTTTGACAAGAGCTTCTTTTGGACCTTTTCTCTAAAGTGGGCACCATT

L M S S L H L K R Y Y G R I L H Y L K A
 ACTCATGAGCAGTCTGCACCTGAAAAGATATTATGGGAGGATTCTGCATTACCTGAAGGC
 ACTgATGtctctcTCTGCAtCTGAAAcGtTATTATGGtCgTATTCTGCATTACCTGAAAcC
 TGACTACAGAAGAGACGTAGACTTTGCAATAATACCAGCATAAGACGTAATGGACTTTTCG

K E Y S H C A W T I V R V E I L R N F Y
 tAAGGAGTACAGTCACTGTGCCTGGACCATAGTCAGAGTGGAAATCCTAAGGAACTTTTA
 tAAaGAGTACTcTCAtTGTGCCTGGACCATtGtTcGtGtGAAATCCTgCgTAACTTTTA
 ATTTCTCATGAGAGTAAACACGGACCTGGTAACAAGCAACACTTTAGGACGCAATTGAAAAT

F I N R L T G Y L R N
 CTTTCATTAACAGACTTACAGGTTACCTCCGAAACTGA
 CTTTCATTAACcGtCTTACTGGTTACCTgCGtAACTag
 GAAGTAATTGGCAGAATGACCAATGGACGCATTGATC

Рис. 4. Последовательности β-интерферона человека и его генов: исходного и синтетического.

1-я сверху – последовательность β-интерферона человека;

2-я сверху – исходная последовательность гена *IFNB1* человека; в ней оранжевым цветом выделены замененные нуклеотиды и старт-кодон;

3-я сверху – перекодированная нами последовательность гена *IFNB1* человека; в ней строчными буквами показаны нуклеотиды, на которые заменяли исходные нуклеотиды природного гена.

Нижняя цепь – комплементарная перекодированной нами последовательности гена *IFNB1* (выделена красным)

Кравченко и содержала промотор *lac UV5*, *lac*-оператор и *SD*-сайт), то есть постановкой гена *IFB1* под управление промотора, индуцируемого ИПТГ в *E. coli*, весьма комплексна и является безусловным достижением высокой мысли М.И. Ривкина. Она заслуживает особого внимания и, возможно, будет рассмотрена отдельно.

При этом следует учесть, что существовал еще один важнейший и, безусловно, определяющий весь результат работы этап – это перекодирование исходной последовательности гена (рис. 4), с одной стороны, в коды *E. coli*, с другой стороны, с целью уменьшить проблемы олигонуклеотидного синтеза, при этом не оставив без внимания рестриционные сайты внутри гена, убрав ненужные. Важно было учитывать вторичную структуру синтезируемых олиго- и полинуклеотидов и одноцепочечных участков собираемых фрагментов и потенциальных паразитных межолго- и межполинуклеотидных комплексов.

Проблемы олигонуклеотидного синтеза следующие (они существовали тогда и продолжают иметь место в настоящее время): проблема синтеза олигонуклеотидов, содержащих несколько остатков гуанина друг за другом, в более общем виде – несколько остатков пуриновых нуклеотидов. В.П. Кумарев с коллегами-синтетиками синтезировали олиго- и полинуклеотиды триэфирным методом из тримеров и димеров, их требуется заранее набирать в большом количестве, поэтому чем меньше их – тем рациональнее подход. До некоторой степени при перекодировке гена приходилось рационально подбирать триплеты, по возможности максимально учитывая другие факторы. Более значимым фактором была частота встречаемости кодонов в *E. coli*.

В таблице собраны все использованные замены триплетов. Видно, что у 57 аминокислот были заменены кодоны с явно выраженной тенденцией в 46 случаях к переходу к кодонам с более высо-

Замены триплетов, последовательно произведенные в исходном гене *IFNB1*

AA с измененными кодонами, по порядку	Замена триплета, частота встречаемости триплетов в <i>E. coli</i>	Количество раз замены других триплетов на данный триплет в гене	Особые отметки
1. L	TTG → CTG 12.9 → 45.8	CTG – 9 раз из 24 АК в гене	
2. L	CTA → CTG 4.5 → 45.8		
3. R	AGA → CGT 4.5 → 18.8	CGT – 11 раз из 11 АК в гене	Для синтеза, предпочтение к пиримидинам
4. S	AGC → TCT 15.0 → 11.0	TCT – 7 раз из 9 АК в гене	То же
5. S	AGC → TCT 15.0 → 11.0		
6. K	AAG → AAA 13.1 → 35.6	AAA – 7 раз из 11 АК в гене	
7. L	CTC → CTG 10.1 → 45.8		
8. L	TTG → CTT 12.9 → 12.6		Предпочтение к пиримидинам
9. G	GGG → GGT 11.6 → 24.9	GGT – 4 раза из 6 АК в гене	
10. R	AGG → CGT 2.6 → 18.8		
11. Y	TAC → TAT 12.0 → 18.4	TAT – 1 раз из 10 АК в гене	
12. C	TGC → TGT 6.0 → 5.4	TGT – 1 раз из 3 АК в гене	
13. L	CTC → CTG 10.1 → 45.8		
14. K	AAG → AAA 13.1 → 35.6		
15. R	AGG → CGT 2.6 → 18.8		
16. K	AAG → AAA 13.1 → 35.6		
17. K	AAG → AAA 13.1 → 35.6		
18. A	GCC → GCT 23.8 → 17.4	GCT – 2 раза из 6 АК в гене	Для синтеза
19. A	GCA → GCT 21.6 → 17.4		То же
20. E	GAG → GAA 18.8 → 37.9	GAA – 2 раза из 13 АК в гене	
21. L	CTC → CTG 10.1 → 45.8		
22. Q	CAG → CAA 28.0 → 14.4	CAA – 1 раза из 11 АК в гене	Для синтеза
23. R	AGA → CGT 4.5 → 18.8		
24. S	TCA → TCT 10.0 → 11.0		Предпочтение к пиримидинам
25. S	AGC → TCT 15.0 → 11.0		Для синтеза, предпочтение к пиримидинам
26. G	GGC → GGT 25.5 → 24.9		Для синтеза
27. L	CTC → CTG 10.1 → 45.8		
28. V	GTC → GTT 14.0 → 20.1	GTT – 2 раза из 5 АК в гене	

Окончание таблицы

29. I	ATA → ATT 8.3 → 29.7	ATT – 2 раза из 11 АК в гене	
30. K	AAG → AAA 13.1 → 35.6		
31. T	ACA → ACT 10.8 → 11.0	ACT – 2 раза из 7 АК в гене	Для синтеза, предпочтение к пиримидинам
32. V	GTC → GTT 14.0 → 20.1		
33. L	CTG → CTC 45.8 → 10.1		
34. E	GAG → GAA 18.8 → 37.9		
35. R	AGG → CGT 2.6 → 18.8		
36. G	GGA → GGT 10.7 → 24.9		
37. L	CTC → CTG 10.1 → 45.8		
38. S	AGC → TCT 15.0 → 11.0		Для синтеза, предпочтение к пиримидинам
39. S	AGT → TCT 10.8 → 11.0		То же
40. H	CAC → CAT 8.8 → 12.5	CAT – 2 раза из 5 АК в гене	
41. R	AGA → CGT 4.5 → 18.8		
42. G	GGG → GGT 11.6 → 24.9		
43. R	AGG → CGT 2.6 → 18.8		
44. K	AAG → AAA 13.1 → 35.6		
45. K	AAG → AAA 13.1 → 35.6		
46. S	AGT → TCT 10.8 → 11.0		
47. H	CAC → CAT 8.8 → 12.5		
48. I	ATA → ATT 8.3 → 29.7		
49. V	GTC → GTT 14.0 → 20.1		
50. R	AGA → CGT 4.5 → 18.8		
51. V	GTG → GTT 23.4 → 20.1		Для синтеза, предпочтение к пиримидинам
52. L	CTA → CTG 4.5 → 45.8		
53. R	AGG → CGT 2.6 → 18.8		
54. R	AGA → CGT 4.5 → 18.8		
55. T	ACA → ACT 10.8 → 11.0		
56. L	CTC → CTG 10.1 → 45.8		
57. R	CGA → CGT 4.1 → 18.8		
58. Ter	TGA → TAG opal → amber		

кой встречаемостью в бактерии, а также один стоп-кодон. Все аргининовые кодоны AGG, AGA и CGA во всем гене заменены на CGT. Явно для упрощения синтеза, так как в них преобладают пурины. Это делал В.П. Кумарев, при пожеланиях М.И. Ривкина о сайтах рестрикции: в структуру гена введены сайты Eco R1, Bam H1 и Tag1 (см. рис. 2), три сайта Eco RII из четырех были убраны с сохранением четвертого в качестве полезного уникального сайта. Каждый фрагмент гена собирал кто-то один из сотрудников от начала (рассмотрения паразитарных структур) и до проверки секвенированием отклоненного фрагмента. Сначала С.И. Ошевский с М.И. Ривкиным попробовали собрать сразу весь ген. Возможно, это и получилось бы, если бы тогда существовал метод ПЦР, который бы помог выявить и размножить нужную последовательность из смеси лигирования гена. Но, в отсутствии метода ПЦР, мы пошли путем последовательной сборки гена. С.И. Ошевский собирал первый фрагмент – № 5. После успешной сборки и проверки правильности сборки секвенированием после клонирования фрагмента оказалось, что один из четырех выбранных клонов содержал правильную вставку. Гораздо позже выяснилось, что в одном из олигонуклеотидов нижней цепи фрагмента были неправильно синтезированы два нуклеотида. Это была единственная ошибка во всей синтетической работе по гену. После удачного клонирования фрагмента 5 начали параллельную сборку остальных фрагментов гена. Один собирала Л.В. Обухова, два собрали вместе М.Л. Кобец и М.И. Ривкин, еще один собрал В.Н. Рыбаков. При том что вся работа длилась не один год и была форсирована, ошибок авторы практически не допускали. Важнейшей проверкой всех усилий стало, конечно, определение активности *IFNB1* в продуценте. Гибридной плазмидой, содержащей ген *IFNB1* с промотором, трансформировали *E. coli* JM 103. После подращивания клеток и индукции ИПТГ клетки разрушали. Активность белка *IFNB1* определяли в супернатанте и сравнивали с данными литературы, в которых природный ген *IFNB1* экспрессировали под управлением того же промотора. Оказалось, что активность интерферона в ед./л среды у нас составляет 5×10^5 – 10^6 (Kumarev et al., 1986; Кумарев и др., 1987б), что в 5–10 раз выше, чем у продукта, наработанного с использованием природного гена (Taniguchi et al., 1980b).

Следует отметить, что, как и лейкоцитарный интерферон, *IFNB1* является гликозилированным белком, поэтому генно-инженерные продуценты все-таки имеют меньшую эффективность и меньший спектр активности. Часто это компенсируется количеством препарата.

Выполнение всей этой сложной и многопрофильной пионерской работы по синтезу гена β -интерферона человека и его экспрессии – очевидное достижение нашего Института. Наш продуцент с искусственным геном, при сделанных заменах в структуре, как и планировалось, оказался эффективнее продуцента с природным геном. Работа выполнена на заре генной инженерии в стране и мире и была опубликована в «Докладах академии наук СССР» (Kumarev et al., 1986).

Авторские свидетельства написаны М.И. Ривкиным и С.И. Ошевским. Статья в «Докладах академии наук СССР» – М.И. Ривкиным. Авторы работы расположены следующим образом: сначала В.П. Кумарев с М.И. Ривкиным, затем химики-синтетики, затем сотрудники, собиравшие ген, и С.И. Вершинина с В.В. Гулевичем. На этом настоял В.П. Кумарев.

В работе также принимали участие: академик АН СССР Д.К. Беляев – внимательно следил и помогал, В.М. Меркулов – ранее создавал и поддерживал микробиологическую базу лаборатории, ассистировали лаборанты: Т.И. Грашкевич, Т. Смирнова и В.Н. Стрига, которые трудились очень ответственно.

Практически одновременно с нами искусственный ген лейкоцитарного интерферона был синтезирован и собран совместно (по половине гена) в лаборатории Всесоюзного научно-исследовательского института молекулярной биологии (р.п. Кольцово, Новосибирская область) и лаборатории академика М.Н. Колосова в Институте биоорганической химии (Москва), и тоже успешно (Колосов и др., 1984).

Автор признателен за помощь и поддержку академику РАН Н.П. Гончарову, в.н.с. А.Г. Блинову и профессору И.К. Захарову. Спасибо профессорам И.К. Захарову и Т.И. Меркуловой, академику НАН РК Р.И. Берсимбаеву и Е.В. Кумаревой за предоставленные фотографии.

Список литературы / References

- Колосов М.Н., Коробко В.Г., Добрынин В.Н., Северцова И.В., Чупило С.А., Быстров Н.С., Берлин Ю.А., Каюшин А.Л., Буткус В.В., Полякова И.А., Болдырева Е.Ф., Сандахчиев Л.С., Попов С.Г., Шубина Т.Н., Кравченко В.В., Серпинский О.И., Ямщиков В.Ф., Беликов С.И., Синяков А.Н., Сиволобова Г.Ф. и др. Способ получения искусственного гена интерферона $\alpha 2$ человека и способ получения полипептида с активностью интерферона микробиологическим синтезом. Авторское свидетельство SU 1092176 A1, 15.05.1984. Заявка № 3493457 от 24.09.1982.
- Кумарев В.П., Ривкин М.И., Амирханов Н.В., Баранова Л.В., Богачев В.С., Кобец М.Л., Ошевский С.И., Обухова Л.В., Рыбаков В.Н., Кузнецов К.Д., Вершинина С.И., Гулевич В.В. Способ получения искусственного гена β -интерферона человека. Авторское свидетельство SU 1362016, 22.09.1987а. Заявка № 3947071 от 15.09.1985.
- Кумарев В.П., Ривкин М.И., Амирханов Н.В., Баранова Л.В., Богачев В.С., Кобец М.Л., Ошевский С.И., Обухова Л.В., Рыбаков В.Н., Кузнецов К.Д., Вершинина С.И., Гулевич В.В. Способ получения полипептида с активностью β -интерферона. Авторское свидетельство SU 1362017, 22.09.1987б. Заявка № 3947071 от 15.09.1985.
- Agarwal K.L., Büchi H., Caruthers M.H., Gupta N., Khorana H.G., Kleppe K., Kumar A., Ohtsuka E., Rajbhandary U.L., Van de Sande J.H., Sgaramella V., Weber H., Yamada T. Total synthesis of the gene for an alanine transfer ribonucleic acid from yeast. *Nature*. 1970;227(5253):27-34. DOI 10.1038/227027a0.
- Goeddel D.V., Shepard H.M., Yelverton E., Leung D., Crea R., Sloma A., Pestka S. Synthesis of human fibroblast interferon by *E. coli*. *Nucleic Acids Res.* 1980;8(18):4057-4074. DOI 10.1093/nar/8.18.4057.
- Kumarev V.P., Rivkin M.I., Bogachev V.S., Baranova L.V., Merkulov V.M., Rybakov V.N. Molecular cloning of synthetic angiotensin I gene in *Escherichia coli*. A route to physiologically active hormone. *FEBS Letters*. 1980;114:273-277.
- Kumarev V.P., Rivkin M.I., Amirkhanov N.V., Baranova L.V., Bogachev V.S., Kobets M.L., Oshevsky S.I., Obukhova L.V., Rybakov V.N., Kuznedelov K.D., Verшинina S.I., Gulevich V.V. Chemico-enzymatic synthesis and cloning of a biologically-active human β -interferon gene. *Doklady Biochemistry*. 1986;290(1-6):244-249.
- Ryan M.J., Belagaje R., Brown E.L., Fritz H.J., Khorana H.G. A synthetic tyrosine suppressor tRNA gene with an altered promoter sequence. Its cloning and relative expression *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 1979;254(21):10803-10810. DOI 10.1016/S0021-9258(19)86593-6.
- Taniguchi T., Ohno S., Fujii-Kuriyama Y., Muramatsu M. The nucleotide sequence of human fibroblast interferon cDNA. *Gene*. 1980a;10(1):11-15. DOI 10.1016/0378-1119(80)90138-9.
- Taniguchi T., Guarente L., Roberts T. M., Kimelman D., Douhan 3rd J., Ptashne M. Expression of the human fibroblast interferon gene in *Escherichia coli*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1980b;77(9):5230-5233. DOI 10.1073/pnas.77.9.5230.

Приложение 1

Краткие биографии руководителей работы и ее основных исполнителей

Виктор Прокопьевич Кумарев (1937–2012) – родился в селе Грязнуша Тамбовской области. (Как когда-то сказал ему директор Института цитологии и генетики СО АН СССР Д.К. Беляев: «Мы с тобой тамбовские волки».) Окончил Ленинградский технологический институт им. Ленсовета, вечернее отделение по кафедре красителей. Его учителем был профессор, доктор химических наук Лев Соломонович Эфрос (1915–2013) – один из создателей лекарственного препарата дибазол¹. Важно, что во время учебы в институте В.П. работал аппаратчиком на химическом заводе, что сделало его особенно внимательным к условиям химических реакций. Виктор Прокопьевич работал в Иркутском институте органической химии, учился в аспирантуре в отделе биохимии Новосибирского института органической химии (НИОХ) СО АН СССР и защитил в 1972 г. кандидатскую диссертацию по «химии» под руководством профессора Д.Г. Кнорре. Затем руководил группой в Научно-исследовательском конструкторско-технологическом институте биологически активных веществ (НИКТИ БАВ) (р.п. Кольцово, Новосибирская область), с 1976 г. возглавлял группу в ИЦиГ СО АН СССР (Новосибирск) и с 1980 по 1987 г. лабораторию генной инженерии этого же института, возглавлял лабораторию в Институте лимнологии СО АН СССР (Иркутск) с 1987 по 1991 г. и был сотрудником фирмы GeneSet (Париж, Франция) с 1991 по 2002 г. Виктор Прокопьевич не читал научную литературу ни по-английски, ни по-немецки, ни по-французки. Зато хорошо читал формулы. Он фактически освоил и развил химию нуклеиновых кислот за счет своего экспериментального опыта, базируясь на уме и исключительном трудолюбии. Он не писал статьи: ему было некогда, он торопился исследовать новое.

Марк Иосифович Ривкин (1946–1999) – в 1969 г. окончил НГУ по специальности «биохимия», с 1969 по 1973 г. учился в аспирантуре в НИОХ СО РАН в отделе биохимии под руководством профессора Д.Г. Кнорре (непосредственный руководитель – зам. зав. отделом кандидат химических наук М.А. Грачев). Работал в НИКТИ БАВ, с 1976 г. работал в группе В.П. Кумарева, а затем – в лаборатории генной инженерии до 1987 г. Далее возглавлял группу в лаборатории молекулярной генетики растений и с 1991 г. – сектор генетической инженерии растений. С 1993 г. в США (Университет штата Северная Дакота, Фарго и в Нью Йорке). М.И. изучал

и анализировал английскую литературу. Как и В.П. Кумарев, он был стратегом, очень внимательно все исследовал и аккуратно накапливал свой и чужой экспериментальный опыт. Диссертацию на соискание ученой степени кандидата биологических наук под руководством М.А. Грачева защитил в 1976 г. Диссертацию на соискание ученой степени доктора биологических наук защитил в 1994 г. в ИЦиГ СО РАН.

Людмила Васильевна Баранова (1947–2016) – жена В.П. Кумарева, окончила НГУ по специальности «химия» и работала с В.П. начиная с лаборатории генной инженерии до 2002 г., всегда активно отстаивая интересы Виктора Прокопьевича.

Людмила Васильевна Обухова (1944–2020) – окончила НГУ по специальности «химия», диплом делала под руководством М.А. Грачева, работала в НИОХ СО АН СССР, отдел биохимии, в НИКТИ БАВ, пришла в лабораторию генной инженерии ИЦиГ в 1980 г., работала до 1987 г., затем – в лаборатории молекулярной генетики растений до 1996 г. и в группе физико-химической биологии до 2010 г. С 2010 до 2020 г. в лаборатории генной инженерии ИЦиГ СО РАН.

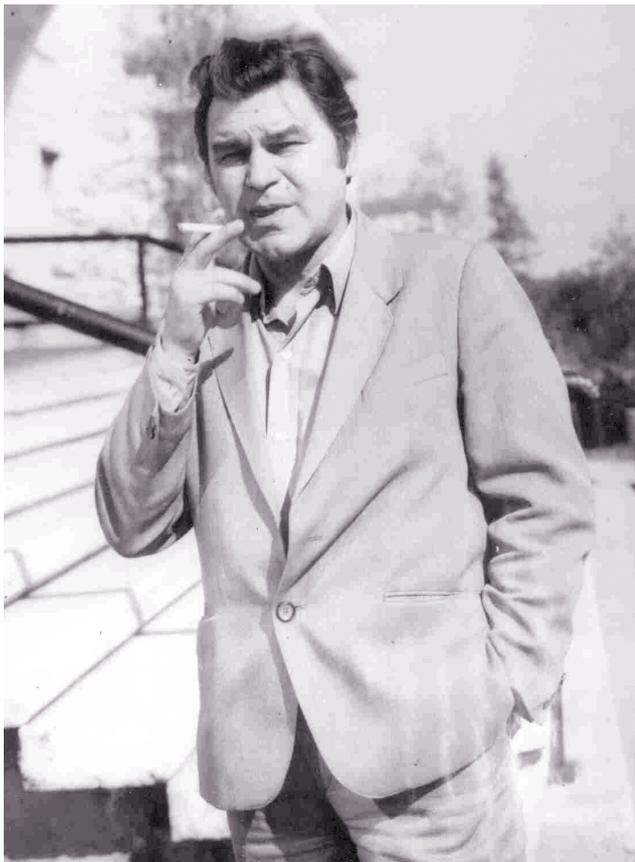
Марина Львовна Кобец – родилась в 1943 г., пришла в лабораторию генной инженерии ИЦиГ в 1980 г., кандидат биологических наук, с 1987 по 1991 г. работала в группе М.И. Ривкина в лаборатории молекулярной генетики растений и с 1991 г. – в секторе генетической инженерии растений. С 1993 по 2010 г. работала в секторе генной инженерии и в лаборатории генной инженерии.

Нариман Валерманович Амирханов – окончил НГУ по специальности «химия», пришел в группу и лабораторию генной инженерии ИЦиГ в 1980 г. и работал до 1984 г., с 1984 по 1987 г. учился в аспирантуре НИБХ СО РАН и там же защитил диссертацию в 1989 г., затем работал с 1999 г. 4 года в Швеции и 5 лет в США, с 2008 г. по настоящее время – в ИХБФМ СО РАН.

Виктор Семенович Богачев – окончил НГУ по специальности «химия» – самый первый сотрудник В.П. Кумарева начиная с НИКТИ БАВ, кандидат химических наук, работал в группе и лаборатории ИЦиГ до 1985 г., затем в группе молекулярных основ генетики животных до 1992 г.

¹ URL: <http://interactive.science.spb.ru/articles/2016/ginzburg/dibazol.html>

(Дата обращения: 27 июня 2021 г.)



Виктор Прокопьевич Кумарев



Марк Иосифович Ривкин

Сергей Иванович Ошевский – окончил НГУ по специальности «биохимия» и аспирантуру в НИОХ СО АН СССР в отделе биохимии под руководством Д.Г. Кнорре и М.А. Грачева, пришел в группу и лабораторию генной инженерии в 1980 г., в 1985 г. защитил кандидатскую диссертацию по «химии», работал до 1987 г., затем – в лаборатории молекулярной генетики растений ИЦиГ до 1996 г. и руководил группой физико-химической биологии до 2010 г. В 1994–1995 гг. стажировался в INSERM (Unite 268, Paris, France). В 1996 г. – associate professor INSERM (Unite 268, Paris, France). С 2010 г. в лаборатории теоретической генетики, лаборатории молекулярных основ генетики животных и с 2012 г. в лаборатории молекулярной генетики человека ИЦиГ СО РАН.

Владимир Николаевич Рыбаков – окончил НГУ по специальности «химия» и с 1978 до 1987 г. работал в группе и лаборатории генной инженерии ИЦиГ.

Константин Дмитриевич Кузнецов – окончил НГУ по специальности «биология», делал дипломную работу и работал в лаборатории генной инженерии ИЦиГ с 1984 по 1987 г., затем в в Институте лимнологии (Иркутск) до 1994 г. и в США, в Waksman Institute of Microbiology.

Светлана Ивановна Вершинина – окончила НГУ по специальности «химия», пришла в 1972 г. в НИКТИ БАН (Новосибирск), с 1977 г. – в группе В.П. Кумарева, а затем в лаборатории генной инженерии до 1987 г. Далее работала в ИЦиГ до 2019 г. в различных лабораториях.

Виктор Васильевич Гулевич – окончил НГУ по специальности «химия», в 1980–1987 гг. работал в лаборатории генной инженерии. Затем в лаборатории молекулярной генетики растений ИЦиГ до 1996 г. и в группе физико-химической биологии до 2010 г. В настоящее время – переводчик в ИЦиГ СО РАН.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 24.06.2021. После рецензирования 20.07.2021. Принята к публикации 21.07.2021.