



УДК 577.27

© 1991 г.

Н. Н. Анисеева, Т. В. Виноградова, Е. С. Дементьева,
А. Р. Ибрагимов***

ВЛИЯНИЕ ФЛАНКИРУЮЩИХ ОБЛАСТЕЙ НА ЭКСПРЕССИЮ ХРОМОСОМНОГО ГЕНА ИНТЕРЛЕЙКИНА-2 ЧЕЛОВЕКА В МЫШИНОЙ МИЕЛОМНОЙ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР, Москва;

** Всесоюзный научно-исследовательский институт биотехнологии, Москва;*

*** Институт молекулярной генетики АН СССР, Москва*

Из банка геномной ДНК человека выделили клон, содержащий ген интерлейкина-2 (IL-2). Выделенный ген с различными по длине 5'- и 3'-фланкирующими областями встраивали в плазмиды на основе ретровирусного вектора рPSneo. Полученными плаزمидами трансфицировали миеломную клеточную линию мыши X63Ag8-658. Клетки, трансфицированные плазмидами с полностью или частично удаленной (слева от положения —165) 5'-фланкирующей областью гена, конститутивно экспрессировали биологически активный IL-2. Уровень экспрессии IL-2 в трансфицированных клетках не зависел от удаления 3'-фланкирующей области гена IL-2.

Интерлейкин-2 (IL-2) — антиген-неспецифический лимфокин, синтезируемый и секретируемый зрелыми Т-лимфоцитами после стимуляции аллоантигенами или митогенами. IL-2 обладает широким спектром биологического действия, однако его основная функция заключается в регуляции пролиферации и дифференцировки Т-лимфоцитов, что в конечном счете приводит к развитию и усилению иммунного ответа (см. обзоры [1, 2]).

Функциональные исследования и клиническое использование IL-2 стали возможны после клонирования его кДНК и получения бактериальных и эукариотических клеток-продуцентов этого белка [2—5]. Клонирование хромосомного гена IL-2 и его структурный анализ [6—9] позволили начать исследование механизма регуляции гена IL-2 на уровне транскрипции.

В данной работе мы исследовали влияние 3'- и 5'-фланкирующих областей гена IL-2 на его экспрессию в гетерологичной эукариотической системе.

Ген IL-2 человека был получен нами из геномной клонотекы гепатомной клеточной линии Alexander в фаре Харон 4А (клонотека была предоставлена ВНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов Минмедпрома СССР). Выделенный ген содержал протяженные 5'- и 3'-фланкирующие области, и его рестриктивная карта совпадала с данными, опубликованными ранее [9] (рис. 1).

При конструировании рекомбинантных плазмид для экспрессии гена IL-2 в эукариотической системе учитывали:

1) неамплифицированные или слабо амплифицированные векторные системы, содержащие ген IL-2, дают низкий уровень экспрессии, близкий к фоновому, причем индукция не влияет на количество продуцируемого белка [10, 11]. Это может объясняться наличием на 5'-конце гена IL-2 области, отвечающей за индуцибельность и тканеспецифичность его экспрессии [12—15];

2) присутствие ТАТТ-повтора, расположенного в 3'-нетранслируемой области гена IL-2, понижает стабильность мРНК IL-2 и, следовательно, количество продуцируемого белка [16].

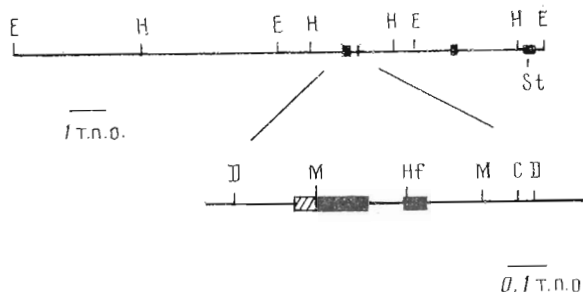


Рис. 1. Рестриктивная карта гена IL-2 человека. Черные прямоугольники — кодирующие области гена IL-2, заштрихованные — 5'-нетранслируемая область. Указаны все сайты расщепления для рестриктаз *EcoRI* (E), *HindIII* (H). Для рестриктаз *StuI* (St), *DraI* (D), *MnlI* (M), *HinfI* (Hf), *ClaI* (C) указаны только те участки узнавания, которые используются при конструировании рекомбинантных плазмид (см. «Экспер. часть»)

Исходя из этих данных, на основе вектора pPSneo [17] сконструировали ряд рекомбинантных плазмид, содержащих ген IL-2 с различными по длине фланкирующими областями.

Плазмиды pPSOEIL2 и pPSEIL2 (рис. 2а) содержали ген IL-2 с фланкирующими областями и различались ориентацией гена относительно ретровирусного длинного концевой повтора (LTR).

Плазмида pPSDIL2 (рис. 2б) включала в себя ген IL-2, укороченный с 5'-конца до положения —164 (относительно сайта инициации транскрипции).

Плазмида pPSDSIL2 (рис. 2в) содержала ген IL-2 с укороченными 5'-и 3'-концевыми областями от положения —164 (относительно сайта инициации транскрипции) до положения 5031 (нумерация по данным работы [7]), т. е. от *DraI*- до *StuI*-сайтов.

Плазмида pPSMSIL2 (рис. 2г) содержала фрагмент гена IL-2 (от *MnlI*-сайта в положении 276 до *StuI*-сайта в положении 5031), в котором фланкирующие области практически полностью удалены.

Для экспрессии гена IL-2 в составе полученных рекомбинантных ретровирусных плазмид использовали миеломную линию клеток X63Ag8-653. Клетки трансформировали линейаризованной плазмидной ДНК методом электропорации. Отбор клонов проводили по биологической активности IL-2 с помощью стандартного теста после селекции на антибиотике G-418.

Для каждой из плазмид получили от 5 до 15 первичных клонов, однако биологически активный IL-2 был обнаружен только в культуральных жидкостях клеток, трансфицированных плазмидами pPSDIL2, pPSDSIL2 и pPSMSIL2 (таблица). Клетки, трансфицированные плазмидами pPSEIL2 и pPSOEIL2, не секретировали IL-2 даже после стимуляции конканави-

Продукция биологически активного IL-2 человека клонами, полученными после трансфекции рекомбинантных плазмид в клеточную линию X63Ag8-653 *

pPSDIL2		pPSDSIL2		pPSMSIL2	
Клон	биол. акт., ед/мл	Клон	биол. акт., ед/мл	Клон	биол. акт., ед/мл
2.1B4	42	3.1C3	10	4.1B5	2
2.1C2	2	3.1C4	2	4.1C5	8
2.1C3	2	3.1C5	2	4.2C2	15
2.1C4	5	3.2B4	10	4.2C4	15
2.1C5	25	3.3B3	30	4.3B3	10
		3.3C3	200	4.3B4	8
		3.3C4	4		
		3.4B4	4		

* В качестве контроля использовалась культуральная среда исходной клеточной линии и клонов, полученного после трансфекции этой линии ретровирусным вектором pPSneo. Приведены данные для клонов, секретирующих более 1 ед. IL-2 на 1 мл; при этом уровень фона, определенный с помощью контрольных образцов, не превышал 0,1 ед./мл.

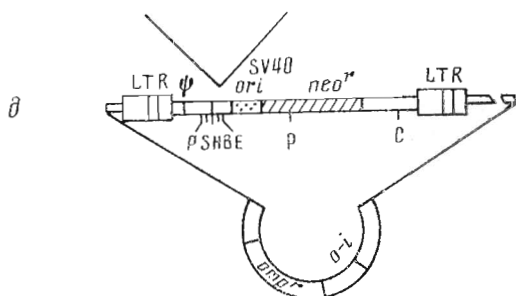
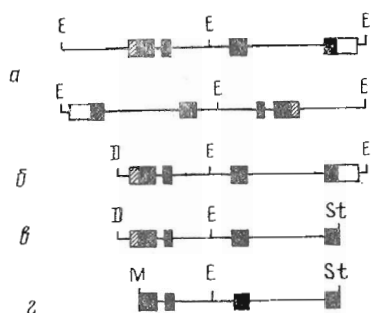


Рис. 2

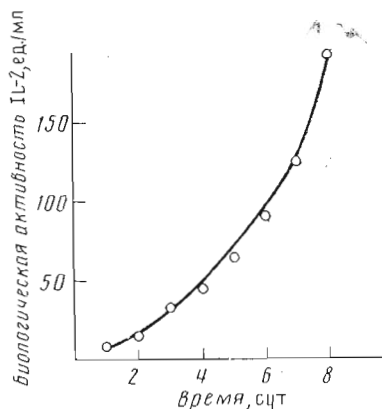


Рис. 3

Рис. 2. Схематическое изображение ДНК рекомбинантных ретровирусных плазмид, содержащих ген IL-2 (а — вставки плазмид pPSEIL2 и pPSOEIL2, б — pPSDIL2, в — pPSMSIL2, г — pPSMSIL2, д — структура вектора pSneo (изображена согласно работе [17]). Светлые прямоугольники — 3'-нетранслируемая область. S, P, B — участки узнавания рестриктаз *SalI*, *PstI* и *BamHI* соответственно. Остальные обозначения и сокращения аналогичны рис. 1

Рис. 3. Зависимость уровня продукции IL-2 от времени культивирования клеток клона VIIIE6/E7. Клетки ($2 \cdot 10^6$) помещали в 1 мл свежей среды (в 24-луночной планшете) и инкубировали в течение определенного периода времени, после чего определяли биологическую активность IL-2 в культуральной жидкости

лином А или фитогемагглютинином. Клетки, котрансфицированные плазмидами pPVneo и pE7IL2, содержащими соответственно ген *neo* и ген IL-2 с фланкирующими областями, также не секретируют IL-2.

Не исключено, что конститутивная экспрессия хромосомного гена IL-2, входящего в состав этих плазмид, блокируется на уровне транскрипции с помощью регуляторных элементов 5'-концевой области гена. Действительно, после удаления фланкирующих областей (pPSMSIL2), когда ген IL-2 находится под контролем только ретровирусных регуляторных элементов, наблюдалась конститутивная продукция IL-2. Индуцированная экспрессия, вероятно, не наблюдается из-за отсутствия в В-клеточной системе необходимых факторов регуляции транскрипции, имеющих в Т-клетках.

При сохранении части 5'-фланкирующей области гена от —164 до АТГ-кодона экспрессия также была конститутивной. Уровень экспрессии не зависел от наличия или отсутствия 3'-фланкирующей области, хотя, согласно литературным данным [16], делеция этой области в последовательности кДНК IL-2 из-за повышения стабильности мРНК ведет к значительному (на 1—2 порядка) увеличению количества секретируемого продукта.

Экспрессия IL-2 в трансфицированных клетках не зависела от стимуляции митогенами.

Таким образом, экспрессия хромосомного гена IL-2 в гетерологичной системе при использовании неамплифицированных векторных систем дает низкий уровень конститутивной экспрессии. Эти данные согласуются с ранее опубликованными [10, 11]. Причем в нашей системе характер экспрессии и ее уровень не изменяются при удалении 5'- и 3'-регуляторных участков гена IL-2.

Для экспрессирующих клонов уровни продукции IL-2 незначительно отличались друг от друга, что не позволило достоверно оценить влияние 5'- (в конструкциях pPSDSIL2 и pPMSIL2) и 3'-фланкирующих областей (в конструкциях pPSDIL2 и pPSDSIL2) на уровень экспрессии гена IL-2.

Ономичи с соавторами показали, что амплифицированный хромосомный ген IL-2 эффективно экспрессируется в гетерологичной (не Т-клеточной) системе под своим собственным промотором [4]. Неясно, является ли конститутивная секреция IL-2 в этом случае результатом перегруппировки некоторой части последовательностей гена во время амплификации, или сама амплификация приводит к нарушению механизма регуляции экспрессии гена IL-2. С этой точки зрения было бы интересно использовать полученные в данной работе варианты гена для экспрессии в векторной системе с высокой копийностью.

Для получения индивидуальных линий клеток первичные клоны 3.1B3, 4.2C2, 4.2C4 и 4.3B3, продуцирующие биологически активный IL-2, дважды клонировали методом лимитирующих разведений. Полученные таким образом клеточные линии сохраняли способность продуцировать IL-2 в течение 4 мес. Для клеточной линии VIIaE6/E7, полученной из первичного клона 4.3B3, исследовали зависимость количества секретируемого IL-2 от времени культивирования клеток. Как следует из рис. 3, на 7-й день выращивания этой линии культуральная среда содержит около 200 ед./мл рекомбинантного IL-2, что сравнимо с количеством белка, получаемым после индукции митогенами Т-клеточной линии Jurkat. Отсутствие митогенов в среде позволяет использовать секретируемый IL-2 в культуральной работе.

Экспериментальная часть

Скрининг геномной библиотеки. Для получения зонда использовали фаг M13 с клонированным фрагментом кДНК IL-2 человека, любезно предоставленный Э. Я. Греном (Институт органического синтеза АН ЛатвССР). Зонд для скрининга библиотеки генов человека синтезировали по методике, описанной в работе [18]. Условия реакции подбирали таким образом, чтобы длина вновь синтезированной меченой цепи не превышала 500 п. о.

Скрининг геномной библиотеки человека, выделение и картирование рекомбинантных фагов, электрофоретическое разделение фрагментов ДНК проводили по стандартным методикам [19].

Конструирование рекомбинантных плазмид. pPSOIL2 и pPSEOL2. На первом этапе клонирования фрагмент гена IL-2 длиной 7,2 т.п.о., полученный частичным гидролизом рестриктазой *EcoRI* фагового клона, содержащего ген IL-2 с фланкирующими областями, встроили в *EcoRI*-сайт ДНК вектора pUC181 и получили плазмиду pEIL2. Плазмида pUC181 сконструирована на основе вектора pUC18 В. М. Росташовым и И. П. Черновым в Институте биоорганической химии АН СССР. Используя рестриктные сайты *BamHI* и *BglII* полилинкера pUC181, искомым фрагмент клонировали по *BamHI*-сайту полилинкера pPSneo. Ретровирусный вектор pPSneo (рис. 2) [17], использованный в нашей работе, был любезно предоставлен П. М. Чумаковым (Институт молекулярной биологии АН СССР).

pPSDIL2. Для удаления 5'-концевой области гена плазмиду pEIL2 гидролизовали рестриктазой *DraI* и фрагмент ДНК длиной около 800 п. о., содержащий N-концевую часть гена IL-2, клонировали в сайте *HincII* вектора pUC18. Полученную плазмиду pDNIL2 расщепляли рестриктазой *BamHI*, достраивали выступающие концы с помощью большого фрагмента ДНК полимеразы I *E. coli* (фрагмента Кленова) и после гидролиза рестриктазой *Clal* выделенный малый фрагмент лигировали с большим *HpaI/Clal*-фрагментом плазмиды pEIL2. Полученную в результате плазмиду pDIL2 гидролизовали рестриктазой *BamHI*, после чего искомым фрагмент гена IL-2 клонировали в векторе pPSneo по *BamHI*-сайту полилинкера.

pPSDSIL2. Для удаления 3'-фланкирующей области плазмиду pEIL2 расщепляли рестриктазой *SalI* и затем частично гидролизовали рестрикта-

зой *StuI*. После достраивания выступающих концов с помощью фрагмента Кленова полученные фрагменты ДНК клонировали в сайте *EcoRV* вектора pBluescript, в результате чего получили плазмиду pBSIL2, содержащую ген IL-2 с практически полностью удаленной 3'-нетранслируемой областью. Лигированием малого *PstI/ClaI*-фрагмента ранее описанной плазмиды pDNIL2 с большим *PstI/ClaI*-фрагментом плазмиды pBSIL2 мы получили плазмиду pDSIL2, содержащую необходимый фрагмент гена IL-2, который затем с частью полилинкера был клонирован в сайте *Sall* вектора pPSneo.

pPSMSIL2. Поскольку исходный фрагмент гена IL-2 содержит не менее 22 сайтов рестриктазы *MnII*, конструкцию pPSMSIL2 получали в несколько этапов. На первом этапе плазмиду pDNIL2 расщепляли рестриктазой *MnII* и фрагмент ДНК длиной 405 п.о., содержащий N-концевую часть гена IL-2, клонировали в векторе pUC18. Затем малый *PstI/Hinfi*-фрагмент полученной плазмиды pMNIL2 и *Hinfi/ClaI*-фрагмент плазмиды pDNIL2 лигировали с вектором pBluescript, предварительно гидролизованным рестриктазами *PstI* и *ClaI*. Скопструированную таким образом плазмиду pMCHIL2 расщепляли рестриктазой *BamHI*, достраивали выступающие концы фрагментом Кленова и гидролизовали рестриктазой *ClaI*, после чего выделенный малый фрагмент лигировали с большим *HpaI/ClaI*-фрагментом плазмиды pEIL2. Образованная в результате плазида pMIL2 содержала ген IL-2, лишенный 5'-фланкирующей области. Последнюю промежуточную конструкцию pBMSIL2 собирали, лигируя большой фрагмент pMIL2 с малым фрагментом pDSIL2 после гидролиза этих плазмид рестриктазами *EcoRI* и *KpnI*. Клонировав *Sall*-фрагмент гена IL-2 из плазмиды pBMSIL2 в векторе pPSneo, мы получили желаемую конструкцию pPSMSIL2.

Практически все фрагменты ДНК, необходимые для клонирования, выделяли из смеси рестриктных фрагментов с помощью электрофореза в 0,8% легкоплавкой агарозе с последующим замораживанием—оттаиванием вырезанных полос геля. Клоны, содержащие необходимые фрагменты гена IL-2, чаще всего идентифицировали гибридизацией с меченными ^{32}P синтетическими олигонуклеотидами из N- и C-концевой области гена (соответственно d(ACACAGCTACAAGTGGAGCAT) и d(ATTTTCTTTT·ATAGGGATCT)). Олигонуклеотиды синтезировали твердофазным фосфитамидным методом [20].

Рекомбинантные плазмиды и векторную ДНК очищали в градиенте CsCl [19]. Перед электропорацией плазмидную ДНК линейаризовали рестриктазой *PvuI*, проводили экстракцию фенолом и дважды пересаждали.

Трансфекция ДНК. Полученные рекомбинантные плазмиды электротрансфицировали в клеточную линию X63Ag8-653 по методике [21]. После электропорации клетки помещали в свежую среду (RPMI-1640 + 10% FCS) и рассевали в 24-луночные планшеты. Спустя 48 ч среду заменяли на свежую, содержащую генетин G-418 (400 мкг/мл). Культуральную среду меняли каждые три дня. Биологическую активность IL-2 в культуральной жидкости выросших клонов определяли после того, как клоны займут не менее $1/2$ поверхности лунок. Для получения индивидуальных клонов активные культуры клонировали методом лимитирующих разведений [22].

Определение биологической активности IL-2 в культуральной жидкости проводили по методу Джиллис с соавт. [23] с помощью IL-2-зависимой линии цитотоксических Т-лимфоцитов **мыши** (линия CTTL-2 была любезно предоставлена профессором А. Митчисоном). Уровень пролиферации оценивали путем окрашивания клеток бромидом 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия [24] и измерения оптического поглощения при 570 нм. Количественную оценку осуществляли сравнением активности тестируемых образцов IL-2 с международным стандартом (BRMP Reference Reagent) с уд. акт. $13,1 \cdot 10^6$ ед./мг [25].

Авторы выражают глубокую благодарность Е. Д. Свердлову (ИБХ АН СССР), О. В. Рохлину (ИМГ АН СССР) и В. А. Несмеянову (ИБХ АН СССР) за поддержку и обсуждение данной работы.

Авторы благодарят В. М. Росташова, Т. Л. Ажикину и И. П. Чернова (ИБХ АН СССР) за синтез олигонуклеотидных зондов; Л. В. Черномордика (Институт электрохимии им. А. Н. Фрумкина АН СССР) за проведение электротрансфекции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Smith A. // Science. 1988. V. 240. № 4856. P. 1169—1176.
2. Taniguchi T., Mamsui H., Fujita T., Hatakeyama M., Kashima N., Fuse A., Hamuro J., Nishi-Takaoka C., Yamado G. // Immunology Reviews. 1986. № 92. P. 121—133.
3. Smith G. E., Ju G., Ericson B. I., Moschera J., Lahm H.-W., Chizzonite R., Summers M. D. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. № 24. P. 8404—8408.
4. Onomichi K., Eto Y., Shibai H. // J. Biochem. 1987. V. 102. № 1. P. 123—131.
5. Karasuyama H., Melchers F. // Eur. J. Immunol. 1988. V. 18. № 1. P. 97—104.
6. Fujita T., Takaoka G., Matsui H., Taniguchi T. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1983. V. 80. № 24. P. 7437—7441.
7. Holbrook N. J., Smith K. A., Fornace A. J., Jr., Comeau C. M., Wiskocil R. L., Grubtree G. R. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. № 6. P. 1634—1638.
8. Degraeve W., Tavernier J., Duerinck F., Plaetinck G., Devos R., Fiers W. // EMBO J. 1983. V. 2. № 12. P. 2349—2353.
9. Nishino N., Obaru K., Maeda S., Shimada K., Onoue K. // Biomed. Res. 1985. V. 6. № 4. P. 197—205.
10. Lindenmaier W., Dittmar K. E. J., Hauser H., Necker A., Sebald W. // Gene. 1985. V. 39. № 1. P. 33—39.
11. Corbo L., Pizzano R., Scala G., Venuta S. // Eur. J. Biochem. 1987. V. 169. № 3. P. 669—674.
12. Fujita T., Shibuya H., Ohashi T., Yamanishi K., Taniguchi T. // Cell. 1986. V. 46. № 3. P. 401—407.
13. Durand D. B., Shaw J.-P., Bush M. R., Replogle R. E., Belagaje R., Grubtree G. R. // Mol. Cell. Biol. 1988. V. 8. № 4. P. 1715—1724.
14. Shaw J.-P., Utz P. J., Durand D. B., Toole J. J., Emmel E. A., Grubtree G. R. // Science. 1988. V. 241. № 4862. P. 202—205.
15. Nabel G. J., Gorka C., Baltimore D. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1988. V. 85. № 9. P. 2934—2938.
16. Reeves R., Elton T. S., Nissen M. S., Lehn D., Johnson K. R. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. № 18. P. 6531—6535.
17. Прасолов В. С., Турецкая Р. Л., Недоспасов С. А., Чумаков П. М., Шаров А. Н. // Докл. АН СССР. 1988. Т. 300. № 6. С. 1498—1502.
18. Church G. M., Gilbert W. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. № 7. P. 1991—1995.
19. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 480С.
20. Gait M. J. Oligonucleotide Synthesis. A Practical Approach. Oxford: Irl. press, 1984. P. 45—49.
21. Агаркова И. Т., Серов С. М., Прасолов В. С., Черномордик Л. В. // Биол. мембраны. 1987. Т. 4. № 12. С. 1289—1295.
22. Goding J. C. Monoclonal Antibodies: Principle and Practice. London, Orlando, New York, Tokio: Acad. Press, 1983. 275 p.
23. Gillis S., Ferm V. V., Ou W., Smith K. A. // J. Immunology. 1978. V. 120. P. 2027—2034.
24. Mosmann T. // J. Immunol. Methods. 1983. V. 65. № 1—2. P. 55—63.
25. Rossio J. L., Thurman G. B., Long C., Vargosko A., Pinsky C. // Lymphokine Research. 1986. V. 5. № 1. P. 13—18.

Поступила в редакцию
31.VII.1990

После доработки
14.XII.1990

N. N. ANIKEEVA, T. V. VINOGRADOVA, E. S. DEMENTYEVA, A. R. IBRAGIMOV INFLUENCE OF FLANKING REGIONS ON INTERLEUKIN-2 CHROMOSOME GENE EXPRESSION IN MOUSE MYELOMA CELLS

M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the USSR, Moscow;

* All-Union Research Institute of Biotechnology, Moscow;

** Institute of Molecular Genetics, Academy of Sciences of the USSR, Moscow

A human interleukin-2 (IL-2) gene was isolated from genomic DNA library. The isolated gene with 5'- and 3'-flanking sequences of various lengths was inserted into plasmids derived from the retroviral vector pPSneo. The recombinant plasmids were transfected into myeloma X63Ag8-653 cells. The transfected cells, harbouring the IL-2 gene with the shortened (to position —465) or totally deleted 5'-flanking sequence, constitutively expressed biologically active IL-2. Deletion of 3'-flanking region on did not affect the IL-2 expression.