

Л. Г. Глушакова, Е. Н. Ковальчук, В. И. Прима, В. А. Кордюм

ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ИНТЕРЛЕЙКИНА-2 (iL-2) ЧЕЛОВЕКА, ПОЛУЧЕННОГО МЕТОДОМ МИКРОБНОГО СИНТЕЗА В КИШЕЧНОЙ ПАЛОЧКЕ НА ОСНОВЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ κДНК-го ВАРИАНТА ГЕНА iL-2

На основе коммерческой векторной системы pET, разработанной W. Studier et al. для экспрессии генов в кишечной палочке, созданы конструкции с прямой и инвертированной ориентациями κДНК-го варианта гена iL-2 человека.

Оценена биологическая активность препаратов iL-2, полученных методом микробного синтеза в *Escherichia coli*.

Введение. Пристальное внимание к iL-2 обусловлено его ключевой ролью в иммунном ответе [1, 2]. В последние годы развиваются исследования по возможности использования генно-инженерных препаратов iL-2 человека для коррекции различных патологических состояний, при которых нарушения иммунной системы определяют патогенез заболевания [3—6], в том числе и для адаптивной иммунотерапии онкозаболеваний [7—9].

Исходя из этого, значительный интерес представляют разработки для получения генно-инженерных препаратов iL-2 как в *Escherichia coli*, так и в клетках животных и человека. Не лишены привлекательности и идеи коррекции различных иммунопатологий путем введения активного гена iL-2 непосредственно в организм животных или человека в составе подходящих молекулярных конструкций.

Исследованием особенностей экспрессии такого трансгена в культивируемых клетках человека и животных мы предполагаем посвятить последующие работы, где в качестве трансгена будет использован κДНК-й вариант полноразмерного зрелого гена iL-2 человека.

В настоящем предварительном сообщении приводятся данные по оценке биологической активности препаратов iL-2, полученных при экспрессии κДНК-го варианта гена iL-2 в кишечной палочке.

Материалы и методы. Плазмида pAA1213-23, содержащая зрелый полноразмерный ген iL-2 человека, предоставлена Э. Я. Греном (Латвия) [10].

Набор плазмид серии pET-3 для высокоэффективной экспрессии чужеродных генов в *E. coli* под контролем регуляторных элементов фага T7, а также клеточные штаммы *E. coli* K12 HMS174 (*F*-*recA*-*r*_{K12}*m*⁺*r*_{K12} Rif^R), *E. coli* В BL21 (*F*-*ompT**r*_β-*m*_β⁻), а также BL21(DE3), содержащий дефектный профаг с областью иммунитета фага T7, с фрагментом ДНК *lacI* гена, *lacUV5* промотором, началом *lacZ* гена и геном РНК-полимеразы фага T7 (*polT7*) получены от Studier [11].

Транскрипция гена *polT7* (ген I фага T7) контролируется *lacUV5* промотором, индуцируемым IPTG (изопропил-β-D-тиоигалактопиранозид). Лизогенный рекомбинантный фаг λ*polT7*, содержащий ген I фага T7, получен нами ранее [12].

Плазмида pLZ56, любезно предоставленная В. Г. Коробко (Москва, Ин-т биоорг. химии РАН им. Шемякина), служила источником гена Z (ген β-галактозидазы *E. coli*). Активность β-галактозидазы определяли по [13].

© Л. Г. Глушакова, Е. Н. Ковальчук, В. И. Прима, В. А. Кордюм, 1994

Бактерии выращивали в среде LB (жидкой и агаризованной) с добавлением, когда это необходимо, ампициллина (30 мкг/мл) и IPTG (конечная концентрация 0,4 мМ).

В работе использованы эндонуклеазы рестрикции, ДНК-лигаза фага T4, фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I производства НПО «Фермент» (Вильнюс) и «Вектор» (Новосибирск), ³²P-меченные dNTP производства ОП «Радиопрепарат» (Ташкент).

Выделение плазмидной ДНК и все этапы клонирования, а также гибридизацию бактериальных колоний *in situ* и dot-гибридизацию осуществляли по Маниатису и др. [14].

ДНК-зонд для гибридизации метили либо с помощью рассеянной затравки, либо методом ник-трансляции с использованием фрагмента

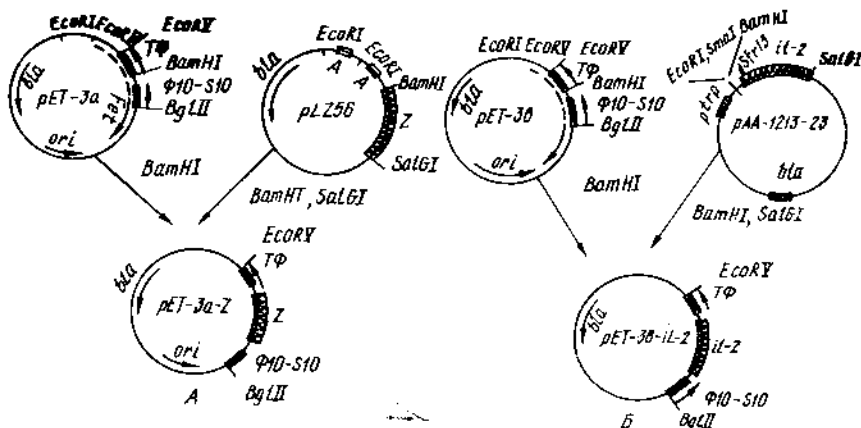


Схема конструирования рекомбинантных плазмид: а — *pET-3a-Z*; б — *pET-3b-iL-2*. Обозначения: $\Phi 10$ — промотор гена 10 фага T7; S10 — последовательность SD; TP — терминатор того же гена

Кленова ДНК-полимеразы I. Удельная радиоактивность ДНК, меченой α -³²P-dNTP, в среднем составляла 10^8 имп·мин⁻¹·мкг⁻¹. Для иммобилизации ДНК в работе применяли нитроцеллюлозные и нейлоновые мембраны фирмы («Amersham», Англия), а также капроновые мембраны производства экспериментальной лаборатории р/к «Хийу Калур» (Таллинн).

Биологическую активность *iL-2* человека определяли по [15]. Метод основан на способности *iL-2* совместно с ConA восстанавливать пролиферативный ответ тимоцитов мышей линии C₅₇BL/6, предварительно обработанных низкими дозами гидрокортизона (10^{-6} моль/л), которые полностью блокировали ConA-индуцированную пролиферацию тимоцитов. Пролиферативный ответ тимоцитов на индукцию *iL-2* оценивали по включению ³H-тимидина в их ДНК. Радиоактивность фильтров с препаратами клеток измеряли на жидкостном сцинтилляционном счетчике 1219 Rack Beta («LKB», Швеция) в толуоловом сцинтилляторе.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента [16].

Результаты и обсуждение. Для получения продукта кДНК-го полноразмерного зрелого гена *iL-2* мы воспользовались *pET-3* вектором, содержащим регуляторные элементы гена 10 фага T7 (промотор, SD-последовательность, терминатор) (рисунок). Эффективная экспрессия целевого гена в этой системе осуществляется с помощью высокоспецифичной РНК-полимеразы фага T7 [17, 18].

Авторы системы предлагают два способа введения гена *polT7* в клетку кишечной палочки: а) при литической инфекции рекомбинантным фагом λ *polT7*; б) при индукции экспрессии гена *polT7* в хромосоме *E. coli*, где он находится под контролем *lacUV5* промотора в составе дефектного профага λ .

Чтобы посмотреть, как работает эта система и оценить ее возможности, воспользовались модельным геном *Z* (вследствие его доступности, стабильности продукта в кишечной палочке и простоты тестирования). Ген был субклонирован в векторную плазмиду *pET-3a* с открытой рамкой считывания (рисунок). Для этого *BamHI-SalGI* фрагмент плазмиды *pLZ56*, содержащий *Z* ген, лигировали с гидролизованной по *BamHI* сайту векторной ДНК. Лигирование осуществляли в два этапа: по липкому концу (восстанавливая исходный *BamHI* сайт), а затем достраивали 5'-концы и лигировали полученную линейную молекулу по тупым концам. Лигазной смесью трансформировали штамм HMS174. Трансформанты, содержащие рекомбинантную плазмиду *pET-3a-Z*, отбирали с помощью гибридизации *in situ*, используя в качестве зонда тот же фрагмент *pLZ56*, включающий ген *Z*. Из 30 взятых произвольно из одной чашки Петри трансформантов, давших положительный сигнал при гибридизации, выделяли ДНК, дополнительно анализировали препараты на наличие *Z* гена с помощью dot-гибридизации и трансформировали штамм BL21(DE3). Трансформанты выращивали при интенсивной аэрации до ОП₅₄₀=0,6—0,8, вносили IPTG. Спустя 3—4 ч определяли активность β-галактозидазы в среде. Из 30 отобранных трансформантов у 14 (~1/2 — правильная ориентация гена *Z*) обнаружена положительная реакция на наличие β-галактозидазы. Активность фермента колебалась от 200 до 300 ед/мл. Эти значения достаточно высоки и сопоставимы с теми, которые получают в штаммах-суперпродукентах.

Ген *iL-2* был субклонирован в векторной плазмиде *pET-3b* (с открытой рамкой считывания) по *BamHI* сайту. В полученной конструк-

Включение ³H-тимидина (имп/мин) в стимулированные препаратами интерлейкина-2 тимоциты ($M \pm m$)

Вариант опыта	Аликвоты препаратов в реакционной смеси (мкл)	
	10 (P)	25 (P)
а) HMS174 <i>pET-3b-iL-2</i> , инфекция <i>λproIT7</i>	708,52±7,49 (<0,001)	1257±231,69 (<0,01)
б) BL21(DE3)- <i>iL-2</i> , индукция IPTG	292,83±88,82 (>0,05)	391,66±64,98 (<0,01)
в) (контроль 1) BL21(DE3)- <i>iL-2</i> _{инв.} , индукция IPTG	284,04±38,77 (>0,05)	313,18±71,62 (>0,05)
г) (контроль 2) HMS174 <i>pET-3b</i> ; инфекция <i>λproIT7</i>	216,73±16,72 (>0,05)	196,83±44,34 (>0,05)
д) Контроль тест системы: тимоциты, обработанные ConA и гидрокортизоном	$M \pm m$ 220,84±15,52	

Вариант опыта	Аликвоты препаратов в реакционной смеси (мкл)	
	50 (P)	100 (P)
а) HMS174 <i>pET-3b-iL-2</i> , инфекция <i>λproIT7</i>	1070,66±334,11 (<0,001)	1077,83±53,23 (<0,001)
б) BL21(DE3)- <i>iL-2</i> , индукция IPTG	455,6±0,72 (<0,001)	878,12±415,69 (<0,05)
в) (контроль 1) BL21(DE3)- <i>iL-2</i> _{инв.} , индукция IPTG	—	284,56±36,32 (>0,05)
г) (контроль 2) HMS174 <i>pET-3b</i> ; инфекция <i>λproIT7</i>	—	209,46±3,14 (>0,05)
д) Контроль тест системы: тимоциты, обработанные ConA и гидрокортизоном	$M \pm m$ 220,84±15,52	

ции кодирующая последовательность (ген *iL-2*) будет транслироваться в виде слитного белка, где первые 11 аминокислотных остатков принадлежат белку 10 фага T7. BamHI-SalGI фрагмент плазмиды pAA1213-23 размером 0,5 тыс. п. н. выделяли из агарозного геля и лигировали с гидролизованной векторной ДНК так же, как это описано для предыдущего конструирования. Лигазной смесью трансформировали штамм HMS174. pET-3b-iL-2 трансформанты отбирали методом гибридизации колоний *in situ* с помощью полноразмерного гена *iL-2* в качестве зонда. Используя уникальный сайт SfrI3 в начале *iL-2* гена, проводили рестрикционное картирование, позволившее дискриминировать прямую и инвертированную ориентации гена *iL-2* в конструкции. Препаратами рекомбинантных плазмид как в прямой, так и в инвертированной ориентации трансформировали штамм BL21(DE3). При получении препаратов *iL-2* пользовались двумя способами введения РНК-полимеразы фага T7 в клетку: а) при литической инфекции штамма HMS174pET-3b-iL-2 фагом λ polT7; б) при индукции гена *polT7* в хромосоме клетки (таблица, варианты а и б соответственно).

В биологических контролях использованы: а) конструкция с инвертированной ориентацией гена *iL-2* (pET-3b-iL-2_{инв}, при трансляции такой матрицы образуется продукт, отличный от интерлейкина-2); б) исходная векторная плаزمида pET-3b (таблица, варианты в и г соответственно).

Трансформированные бактерии выращивали при интенсивной аэрации до ОП₅₄₀ = 0,6—0,8. На этом этапе в случае вариантов б и в проводили индукцию, а и б — трансформанты инфицировали фагом λ polT7 с множественностью 6—10 корпускул на клетку.

Известно [18], что РНК-полимераза фага T7 более чем в 5 раз активнее индуцирует транскрипцию целевых генов по сравнению с РНК-полимеразой *E. coli*. В T7-системах для экспрессии целевых генов транскрибируются фактически только последовательности, попадающие под контроль T7-промотора. Спустя 3—4 ч после индукции транскрипции синтез целевого продукта практически прекращается, а бактерии в этот период часто лизируют [11, 12]. Поэтому в указанные сроки отбирали аликвоты культуральной среды для реакции стимуляции тимоцитов мыши.

В таблице представлены данные эксперимента, свидетельствующие о том, что в вариантах а и б (правильная ориентация гена *iL-2* в конструкции) наблюдается 4—6-кратное усиление пролиферативной активности тимоцитов по сравнению с контролем (вариант д). Различия контрольных и опытных вариантов достоверны. Для варианта а — $P < 0,001$, для варианта б — $P < 0,05$.

В тех случаях, когда трансформанты содержали ген *iL-2* в инвертированной ориентации или этот ген отсутствовал в векторной плазмиде (биологические контроли эксперимента), приведенные данные не отличаются от контроля тест-системы (д).

Таким образом, в работе представлены статистически достоверные данные, указывающие на то, что препараты интерлейкина-2, полученные методом микробного синтеза в *E. coli* при использовании рекомбинантной плазмиды с кДНК-копией гена *iL-2* человека, стимулируют пролиферацию тимоцитов мышей *in vitro*, то есть обладают биологической активностью.

В дальнейшем планируются оптимизация системы получения интерлейкина-2 человека и количественная оценка ее продуктивности.

Л. Г. Глушакова, О. М. Ковальчук, В. І. Прима, В. А. Кордюм

ОЦІНКА БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ ІНТЕРЛЕЙКІНА-2 (iL-2) ЛЮДИНИ,
ОДЕРЖАНОГО МЕТОДОМ МІКРОБНОГО СИНТЕЗУ в ESCHERICHIA COLI
НА ОСНОВІ ВИКОРИСТАННЯ «ДНК-ГО ВАРІАНТУ ГЕНА iL-2

Резюме

На основі комерційної векторної системи pET, розробленої W. Studier et al. для експресії генів у кишковій паличці, створено конструкції з прямою та інвертованою орієнтаціями «ДНК-го варіанту гена iL-2 людини. Оцінено біологічну активність препаратів iL-2, одержаних методом мікробного синтезу в *E. coli*.

L. G. Glushakova, E. N. Kovalchuk, V. I. Prima, V. A. Kordyum

DETECTION OF BIOLOGICAL ACTIVITY OF HUMAN
INTERLEUKIN 2 WHICH OBTAINED BY MICROBIOLOGICAL
SYNTHESIS IN E. COLI DIRECTED BY C-DNA GENE

Summary

The constructions with direct and inverse orientations of c-DNA interleukin 2 gene has been obtained by the use of commercial vector system (pET) created by W. Studier et al. for *E. coli*. The detection of biological activity of interleukin 2 produced by microbiological synthesis in *E. coli* has been carried out.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Чередуев А. Н., Ковальчук Л. В. Клеточные и молекулярные аспекты иммунных процессов // Итоги науки и техники.— М.: ВИНТИ, 1989.— 238 с.
2. Смит К. А. Интерлейкин-2 // В мире науки.— 1990.— № 5.— С. 16—24.
3. Rees R. C., Wiltrout R. H. The biology and clinical applications of interleukin 2 // Immunol. Today.— 1990.— 11, N 2.— P. 36—37.
4. Volberding P., Moody D. J., Beardslee D. et al. Therapy of acquired immune deficiency syndrome with recombinant interleukin 2 // AIDS Res. and Hum. Retroviruses.— 1987.— 3, N 2.— P. 115—124.
5. Lizawa Yuji. Protective effect of recombinant human interleukin 2 against lethal injection causes by *Klebsiella pneumoniae* // Microbiol. and Immunol.— 1990.— 34, N 2.— P. 185—195.
6. Shen Su, Ning Yao, Xinyuan Liu. Therapeutic effect of interleukin 2 on hepatitis B disease // J. Interferon Res.— 1991.— 11, Suppl. 1, N 1.— P. 247.
7. Mule J. J., Rosenberg S. A. Successful adoptive immunotherapy established metastases with lymphokine activated killer cells and recombinant interleukin-2 // Immune Responses to Metastases.— 1987.— 11.— P. 69—94.
8. Розенберг С. А. Адоптивная иммунотерапия рака // В мире науки.— 1990.— № 7.— С. 26—34.
9. Sherry R. M., Rosenberg S. A., Yong J. C. Relapse after response to interleukin-2-based immunotherapy: Patterns of progression and response to retreatment // J. Immunother.— 1991.— 10, N 5.— P. 371—375.
10. Авог А. Я., Романчикова Н. В., Скривелис В. А., Янкевиц Э. К. Экспрессия гена зрелого интерлейкина-2 человека в клетках *E. coli* // 9 Конф. мол. ученых: Тез. докл.— Рига: Ин-т орг. синтеза АН Латв. ССР, 1987.— С. 68.
11. Studier W. F., Rosenberg A. H., Dunn J. J., Dubendorff J. W. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes // Meth. Enzymol.— 1990.— 185.— P. 60—89.
12. Глушакова Л. Г., Романовская О. Р., Кордюм В. А. Сравнение эффективности использования раннего и позднего промоторов фага T7 для экспрессии гена β-галактозидазы в *Escherichia coli* // Биополимеры и клетка.— 1990.— 6, № 1.— С. 110—113.
13. Миллер Дж. Определение ферментов лактозного оперона // Эксперименты в молекуляр. генетике.— М.: Мир, 1976.— 436 с.
14. Манкатиус Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1984.— 479 с.
15. DeVos C., Libert W. A simple rapid method for detection of iL-2 in a physiological medium // J. Immunol. Meth.— 1984.— 74, N 2.— P. 374—384.
16. Плохичский Н. А. Биометрия.— М.: Изд-во Моск. ун-та, 1979.— 367 с.
17. Tabor J., Richardson C. A bacteriophage T7 RNA polymerase / promoter system for controlled exclusive expression of specific genes // Proc. Nat. Acad. Sci USA.— 1985.— 82, N 6.— P. 1074—1078.
18. Studier W., Moffnatt B. Use of bacteriophage T7 polymerase to direct selective high level expression of cloned genes // J. Mol. Biol.— 1986.— 189, N 1.— P. 113—130.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН Украины, Киев

Получено 23.11.93

Ин-т эксперим. онкологии, патологии и радиологии
им. Р. Е. Кавецкого АН Украины, Киев