



УДК 577.113.4

**КЛОНИРОВАНИЕ И НУКЛЕОТИДНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
5'-ФЛАНКИРУЮЩЕЙ ОБЛАСТИ ГЕНА
ИНТЕРЛЕЙКИНА-2 ЧЕЛОВЕКА***Янкевич Э. Б., Макаренкова Г. И., Романчикова Н. В.*,
Муйжниеке И. О., Циманис А. Ю.*, Грен Э. Я.***Латвийский государственный университет им. П. Стучки, Рига;*** Институт органического синтеза Академии наук ЛатвССР, Рига*

Клонирован хромосомный ген интерлейкина-2 человека и установлена нуклеотидная последовательность 5'-фланкирующей области (от -1940 до -936). Обнаружено несколько участков, имеющих значительную гомологию с промоторной областью этого гена.

Гуморальная регуляция иммунной системы наряду с циркулирующими антителами осуществляется с помощью растворимых медиаторов межклеточного взаимодействия — лимфокинов, группы веществ белковой природы с широким спектром биологической активности. Интерлейкин-2 (фактор роста Т-лимфоцитов) является ключевым лимфокином, участвующим в регуляции высококонсервативных процессов дифференцировки и пролиферации Т-клеток.

Недавно были клонированы кДНК [1, 2], хромосомные копии гена интерлейкина-2 человека из библиотеки лимфоцитарной ДНК в λ gt WES [3], из космидной библиотеки лимфоцитарной ДНК методом гомологичной рекомбинации *in vivo* [4], из библиотеки плацентарной ДНК в векторе Харона 4А [5]. Определена полная нуклеотидная последовательность гена, в том числе последовательность 5'- и 3'-фланкирующих районов гена [3, 6].

Изучение структуры клонированного хромосомного гена интерлейкина-2 позволило локализовать основные функционально важные элементы промотора, терминатора, энхансерную последовательность и индуцибельный гиперчувствительный к ДНКазе I район [7—9], а также *Kpn* I- и *Ali* I-повторы в очень отдаленных 5'- и 3'-фланкирующих областях [10].

Регуляторные области эукариотических генов могут располагаться на значительном расстоянии от точки инициации транскрипции, так что известная последовательность может оказаться недостаточно репрезентативной для полного выявления возможных регуляторных областей гена интерлейкина-2. Поэтому из библиотеки генов человека, полученной в векторе Харон 4А, мы извлекли клон, обозначенный Х4А-ИЛ32 и содержащий полный ген интерлейкина-2 с 5'-фланкирующим районом. Сравнительный анализ рестрикционных карт позволяет сделать вывод, что ген интерлейкина-2 в клоне Х4А-ИЛ32 имеет наибольшее сходство с геном интерлейкина-2, описанным в работах [3, 7]. Карта 5'-фланкирующего района сходна с физической картой, опубликованной Нишино с соавт. [10], но популяция рекомбинантных фагов гетерогенна по числу *Xba*I-сайтов; кроме того, отсутствует *Bam*HI-сайт (рис. 1). Для более подробного картирования фрагменты 5'-фланкирующего района субклонировали в плазмиде рUC19.

В нашей работе приводятся новые данные о первичной структуре 5'-фланкирующего района гена интерлейкина-2 человека. В области инициации транскрипции по сравнению с последовательностью, опубликованной в работе [6], нами обнаружена вставка двух нуклеотидов, Т и С, в положении +14 и +15; кроме того, в районе от -1362— до -936 наблюдаются еще 9 изменений: 4 делеции, 4 вставки и одна замена.

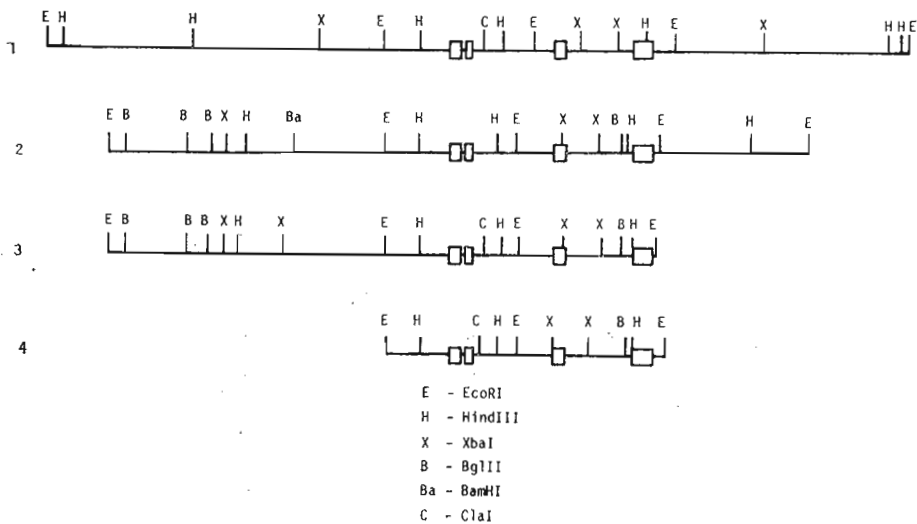


Рис. 1. Рестрикционные карты клонированных хромосомных генов интерлейкина-2 человека: 1 - Холбрук с соавт. [6]; 2 - Нишино с соавт. [10], 3 - данная работа, 4 - Фуджита с соавт. [3] и Ливдмейер с соавт. [4]

```

-1940  TTCCATTCTG GAAGGGTAAA GGCCTGAGTG ATGATGCTGG GATTAGACAC
-1890  TGAAACTCTT TAGAGAAGCA AAACAAGTAT AATAAAGCTG TACTTTATTA
-1840  TATTAATAAA ATAACACACA GACTACCAA TAGCCTGCC CTTATAACAG
-1790  CGTTAATGTG ATTTTGATCT GAAATGTATA GAGACATTTT GCATTTTTTC
-1740  GGTATAAAAA GTTCATGAGA TTTGGCCCTA ATCTGGACCT TTTCTTCATT
-1690  TTTTTTCTA CTTGAGGGAC TATAATCTTT ATTTTTAAAT TTGTTTTATA
-1640  TTCTCCGAAC ATTACCTAAC GCATAGAAAA CTCTTCTTGA ACCATTTTTC
-1590  TCTGTTCTTT GTAAAATATT ACATTTGACT GTTCCTTAGA CTGCTTTAAT
-1540  CATTCTCGCC TATGCACCST CCTCAAATC CAGTTTAAAT TAATTGTTCC
-1490  TTATTTCAAG TTTCTTATAT CCACCTCCCT TGGGGCAGCA ATCACSTATC
-1440  ACCCAGGACT ACACCTTGTT ATGTACATAT CTTCCCTATT ACAAATCAGG
-1390  TTCTTTGAAA AAATACAAAT GGTAAGAGAG TGGATTTTTG GAGTCAGTAC
-1340  ATTCTCTTTT CAAATCCTTC TTCTGCCCTT TACTGGCAAT AAGGGCTGAG
-1290  TGACCTAGAG CAAATTACTT AACTTCTCTG AGCCTCAGTT TTCTAATCTG
-1240  CAAAATAGGA GCCACTACTT CACAAGTCTG TAAGACTTAT ATTAGACTAA
-1190  GTGCCCTGCC GTACACTGTT CTCTTTTCTC TCTTTCTATA TACCTGAAGG
-1140  CATTATAGGT GCTAGATGTC TGTTTAAAGA CCAGACAATA TTGTCTTAAA
-1090  AAAACAAACA AAAACACAGA CAATACCATC TTTAAAAAAA AAAAAAAGTC
-1040  CAGGTAAGAA ATAATAAGG CCATAGAATG GAAGCTTTAC AAGGACTCTC
-990   TGTGAGACAG GATCTCCTCA AGTGTCCCA GGTAAATTA GAAGTATATA
-940   TCCGT
  
```

Рис. 2. Нуклеотидная последовательность 5'-фланкирующей области гена интерлейкина-2

На рис. 2 также приведена структура ранее неизвестного района 5'-фланкирующей области (от -1940 до -1363) гена длиной 578 нуклеотидов. Основной задачей машинного анализа этого района было выявление возможных регуляторных областей гена интерлейкина-2, в частности структур, ответственных за регуляцию транскрипции: промотора(ов), терминатора(ов) и энхансера.

Один из главных элементов терминаторов РНК-полимеразы II — сильно выраженная вторичная структура. При анализе инвертированных повторов было обнаружено несколько участков, способных образовывать шпильчатые структуры: от -1868 до -1840 ($\Delta G = -11,7$ ккал/моль), от -1323 до -1293 ($\Delta G = -12,3$ ккал/моль), от -458 до -431 ($\Delta G = -11,9$ ккал/моль) и от -170 до -141 ($\Delta G = 10,1$ ккал/моль), возможно, выполняющие функцию терминации РНК-полимеразы.

В анализируемой последовательности нами обнаружено несколько участков ДНК, имеющих весьма выраженную гомологию с промоторной

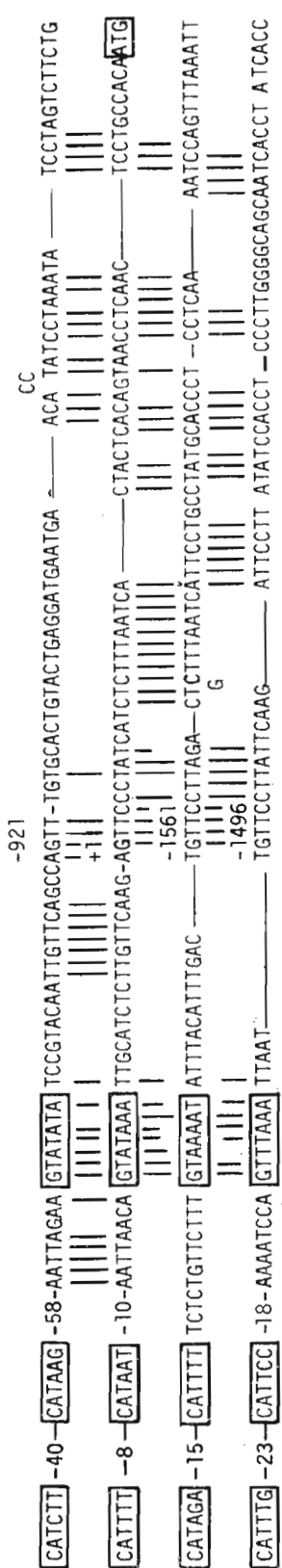


Рис. 3. Участки ДНК, имеющие выраженную гомологию с промоторной областью гена интерлейкина-2. Прямоугольниками обозначены элементы промотора и инициирующей кодон, вертикальными линиями — участки гомологии с истинным промотором гена интерлейкина-2

-1561 -1484 -921 +1



Рис. 4. Предполагаемые и известные из литературы регуляторные области гена интерлейкина-2, расположенные в 5'-фланкирующей области гена. Точками отмечены места начала транскрипции, черными прямоугольниками — терминаторы, стрелками — промоторы (P), заштрихованным прямоугольником — энхансер

областью гена интерлейкина-2. На рис. 3 приведены четыре района, имеющие схожую последовательность. Все эти участки ДНК имеют близкую по сравнению с функциональными элементами промотора структуру: ТАТА-бокс, САТ-бокс и Сар-сайт. Несмотря на некоторые различия в расстоянии между теми или другими промоторными структурами, они расположены в теоретически допустимых для РНК-полимеразы пределах.

На рис. 4 приведены регуляторные области, как известные из литературных источников, так и предполагаемые нами, которые расположены в 5'-фланкирующем районе хромосомного гена интерлейкина-2.

Экспериментальная часть

Для создания геномной библиотеки человека использовали ДНК из лейкоцитов периферической крови человека, в качестве вектора — фаг Харрон 4А [11]. Электрофоретическое разделение фрагментов ДНК, выделение их из геля, клонирование и картирование рекомбинантных плазмид проводилось по методикам, описанным в книге [12].

Первичная структура клонированных фрагментов была определена методом Сенгера [13] на двухцепочечной матрице. Анализ нуклеотидной последовательности 5'-фланкирующей области проводился на вычислительной машине «Искра-226» с использованием программ для обработки ДНК, полученных из Института молекулярной генетики АН СССР.

Мы приносим искреннюю благодарность В. М. Берзиню за любезно предоставленный препарат лейкоцитарной ДНК человека.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Taniguchi T., Matsui H., Fujita T., Takaoka G., Kashima N., Yoshimoto R., Hamuro J. // Nature. 1983. V. 302. № 5906. P. 305–310.
2. Devos R., Plaetink G., Cheroutre H., Simons G., Degraeve W., Tavernier J., Remaut E., Fiers W. // Nucl. Acids Res. 1983. V. 11. № 13. P. 4307–4323.
3. Fujita T., Takaoka G., Matsui H., Taniguchi T. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1983. V. 80. № 24. P. 7437–7441.
4. Lindenmaier W., Dittmar K. E., Hauser H., Neckes A., Sebald W. // Gene. 1985. V. 39. № 1. P. 33–39.
5. Mita S., Maeda S., Obaru K., Nishino N., Shimada K., Hirano T., Onoue K., Ogawa T., Ogawa H. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1983. V. 117. № 1. P. 114–121.
6. Holbrook N. L., Smith K., Fornace A., Comeau C. M., Wiskocil R. L., Crabtree G. R. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. № 6. P. 1634–1638.
7. Holbrook N., Lieber M., Crabtree G. // Nucl. Acids Res. 1984. V. 12. № 12. P. 5003–5013.
8. Durand D. B., Bush M. R., Morgan J. G., Weiss A., Crabtree G. R. // J. Exp. Med. 1987. V. 165. № 2. P. 395–407.
9. Fujita T., Shibuya H., Ohashi T., Yamanishi K., Taniguchi T. // Cell. 1986. V. 46. № 3. P. 401–407.
10. Nishino N., Obaru K., Maeda S., Shimada K., Onoue K. // Biomed. Res. 1985. V. 6. № 4. P. 197–205.
11. Sternberg N., Tiemeier D., Enguist L. // Gene. 1977. V. 1. № 3–4. P. 255–280.
12. Мануарс Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 480 с.
13. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. № 12. P. 5463–5467.

Поступила в редакцию
28.III.1989

CLONING AND NUCLEOTIDE SEQUENCE OF THE 5'-FLANKING REGION OF THE HUMAN INTERLEUKIN-2 GENE

JANKEVICS E., MAKARENKOVA G., ROMANTCHIKOVA N.*, MUIZNIERS I.,
TSIMANIS A.*, GREN E*.

Latvian State University, Riga; *Institute of Organic Synthesis,
Academy of Sciences of the Latvian SSR, Riga

We have cloned human interleukin-2 gene and sequenced its 5'-flanking region (–1940 to –936). The region contains promoter-like structures having a high degree of homology with the real promoter.