



## Mysia rekombinowana interleukina 2 – ustalenie optymalnych warunków wytwarzania i oznaczania aktywności *in vitro*

Paweł Krzywiński, Henryka Długońska

Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej, Instytut Mikrobiologii  
i Immunologii, Uniwersytet Łódzki, Łódź

### Mouse recombinant interleukin 2 – determining optimal conditions of production and activity evaluation *in vitro*

#### Summary

Interleukin 2 (IL-2) is the fundamental growth factor for T lymphocytes, both *in vivo* and *in vitro*. At our department, specific mouse T lymphocyte clones are used for the examination of antigenic structure of *Toxoplasma gondii*. Their culturing *in vitro* requires big amounts of IL-2. That is why we determined optimal conditions for producing crude IL-2 preparation, using recombinant myeloma line X63/0 IL-2 as the producer of IL-2 and cytotoxic T lymphocyte line CTL-L as the indicator of IL-2 activity.

#### Key words:

recombinant mouse IL-2, production, activity evaluation.

#### Adres do korespondencji

Henryka Długońska,  
Katedra Immunologii  
i Biologii Infekcyjnej,  
Instytut Mikrobiologii  
i Immunologii,  
Wydział Biologii i Ochrony  
Środowiska,  
Uniwersytet Łódzki,  
ul. Banacha 12/16,  
90-237 Łódź;  
e-mail:  
hdlugo@biol.uni.lodz.pl

#### biotechnologia

1 (64) 284–290 2004

### 1. Wprowadzenie

Interleukina 2 (IL-2) została opisana w 1976 r. jako czynnik wzrostowy limfocytów grasiczozależnych T (TCGF – *T cell growth factor*), co trafnie określa rolę, jaką pełni w systemie odpornościowym. Limfocyty T rozpoznają swoisty antygen, przetworzony i prezentowany na komórkach APC (*antigen presenting cell*), przy udziale receptorów (TCR – *T cell receptor*). Efektywne pobudzenie TCR prowadzi do wytworzenia funkcjonalnych (pre-

wodzących sygnał) receptorów dla IL-2 (IL-2R, IL-2 receptor) oraz syntezy IL-2. Wiąże się ona z receptorami IL-2R na tych samych limfocytach, które ją wytworzyły (reakcja autokrynną), ułatwiając ich podział i stymulując uwalnianie mediatorów, np. interferonu  $\gamma$ , czynnika martwicy nowotworu  $\beta$  (TNF $\beta$  – *tumor necrosis factor*  $\beta$ ) i samej IL-2. Interleukina 2 wspomaga również proliferację i różnicowanie limfocytów B w komórki plazmatyczne, produkujące swoiste przeciwciała. Komórkami docelowymi jej działania są także monocyty i naturalne komórki zabijające (NK – *natural killer*); IL-2 wzmacnia ich aktywność cytotoksyczną i wydzielanie cytokin (1-3). Głównymi producentami IL-2 są limfocyty pomocnicze T CD4+ (Th1 – *T helper* 1) oraz limfocyty cytotoksyczne T CD8+ (Tc1 – *T cytotoxic* 1) (4,5). Swoista i silnie wyrażona aktywność biologiczna IL-2 pozwala wykorzystywać ją jako czynnik immunopotencjalizujący i immunomodulujący w terapii u chorych z nowotworami złośliwymi (6-9), nawracającymi zakażeniami i przewlekłymi chorobami zakaźnymi, m.in. gruźlicą, trądą czy malarią (10) oraz z niedoborami odpornościowymi pierwotnymi i nabytymi, np. AIDS (11).

Oprócz tych, zasygnalizowanych, zastosowań terapeutycznych i profilaktycznych bardzo często używa się IL-2 do badań podstawowych z zakresu immunologii zarówno nieinfekcyjnej (12), jak i infekcyjnej (13). W Zakładzie Immunoparazytologii naszej Katedry prowadzi się od niedawna hodowle ciągle ustabilizowanych klonów mysich limfocytów T rozpoznających antygeny pasożytniczego pierwotniaka *Toxoplasma gondii* (14). Klony te są namnażane *in vitro* poprzez restymulację swoistym antygenem pasożyta w obecności komórek APC oraz interleukiny 2. IL-2 dodawana jest począwszy od drugiego dnia po restymulacji, najpierw w wyższej, a potem w coraz niższej dawce (3-5 ng). Ponieważ ceny oczyszczonych komercyjnych preparatów rekombinowanej mysiej IL-2 (rmlIL-2) są wysokie, a do hodowli klonów nie potrzeba oczyszczonego preparatu IL-2, zdecydowano się otrzymywać preparat surowy, w postaci podłoża pochodzącego z kultur komórek szpiczaka myszy z wklonowanym genem kodującym mysią IL-2 (linia X63/0 IL-2). Mając na uwadze konieczność uzyskiwania porównywalnych pod względem aktywności preparatów postanowiono w prezentowanej pracy zoptymalizować warunki prowadzenia hodowli komórek-producentów IL-2 oraz opracować metodę miareczkowania aktywności otrzymanych partii interleukiny.

## 2. Materiały i metody badań

W badaniach wykorzystano komórki dwóch linii ciągłych, otrzymanych z Instytutu Mikrobiologii Lekarskiej i Wirusologii Uniwersytetu w Düsseldorfie:

a. Linia X63/0 IL-2 – została wyprowadzona z komórek nowotworu wysiękowego myeloma (szpiczak) jamy otrzewnowej, indukowanego olejem mineralnym u myszy szczepu BALB/c. Karasuyama i Melchers (15) wprowadzili do tych komórek gen kodujący mysią IL-2, za pomocą wektora ekspresyjnego pBV-1MTHA zawierającego sekwencje DNA bydłęcego wirusa brodawczaka (BPV – *bovine papilloma virus*).



b. Linia CTL-L – limfocyty T cytotoksyczne rozpoznające antygeny komórek białaczki mysiej, indukowanej wirusem Frienda (FLV – *Friend leukemia virus*). Zostały wyprowadzone ze śledziony myszy szczepu C57Bl/6 (haplotyp H-2<sup>b</sup>), szczepionych mysimi komórkami białaczkowymi (haplotyp H-2<sup>d</sup>), uprzednio traktowanymi mitomycyną, antybiotykiem hamującym podziały komórek (16). Limfocyty CTL-L proliferują wyłącznie w obecności IL-2 i dlatego mogą być używane jako bardzo czułe wskaźniki jej obecności.

Komórki obu wymienionych linii hodowano *in vitro* w butelkach do hodowli tkankowych 25 i 75 cm<sup>2</sup> (NUNC) w podłożu odżywczym o składzie: firmowe podłoże Iscove (SIGMA) + 5% surowicy płodowej bydłowej (FBS – *fetal bovine serum*) (CYTOGEN), 2 mM L-glutaminy (SIGMA),  $5 \times 10^{-5}$  M  $\beta$ -merkaptoetanolu (SIGMA), 100  $\mu$ g/ml gentamycyny (KRKA). Podłoże dla komórek CTL-L wzbogacano dodatkiem surowego wzorcowego preparatu IL-2, otrzymanego od dra Hansa-Georga Fischera z Uniwersytetu w Düsseldorfie, natomiast do podłoża dla komórek X63/0 IL-2 dodawano 100  $\mu$ g/ml genetycyny w celu utrzymania wysokiej ekspresji genu IL-2.

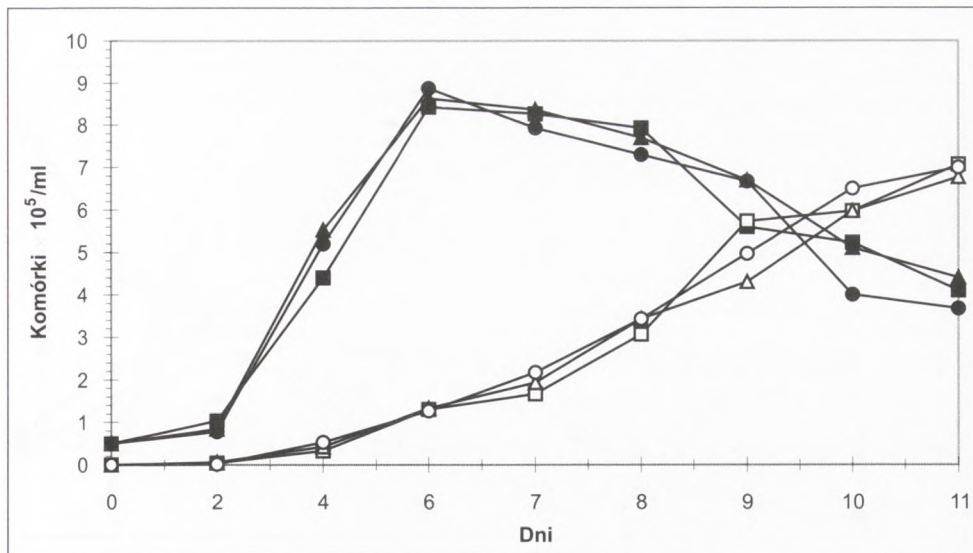
Gęstość i żywotność komórek w hodowli ustalano przez liczenie komórek w hemocytometrze Bürkera, po uprzednim dodaniu błękitu trypanu.

Intensywność proliferacji limfocytów wskaźnikowych CTL-L, będącą odzwierciedleniem zawartości IL-2 w podłożu, oceniano na podstawie liczby żywych komórek w 4-dniowych hodowlach zakładanych w mikroplątkach hodowlanych 96-studzienkowych (NUNC):  $5 \times 10^3$  komórek CTL-L w 100  $\mu$ l podłoża + 100  $\mu$ l odpowiednio rozcieńczonego preparatu rmlL-2/studzienkę. Do kontroli zamiast rmlL-2 dodawano tylko podłoże hodowlane. Po zakończeniu hodowli mikroplątki wirowano, ściągano 150  $\mu$ l podłoża, dodawano 100  $\mu$ l błękitu trypanu (0,167 g/100 ml PBS) i liczone komórki w hemocytometrze Bürkera. Podane na wykresach wyniki stanowią każdorazowo średnią z 4 oznaczeń.

### 3. Omówienie wyników

Ponieważ preparat surowy rmlL-2 otrzymywany jest w postaci podłoża zebranego z hodowli komórek – producentów, to stan tej hodowli, tj. gęstość komórek oraz proporcja komórek żywych i martwych wpływa na jego aktywność i jakość. Większa gęstość skutkuje zwykle wyższym stężeniem IL-2, ale jednocześnie bardzo duże stężenie metabolitów oraz substancji uwalnianych z martwych komórek może hamować wzrost komórek w hodowlach wtórnych, do których dodaje się surowy preparat IL-2 jako czynnik wspierający wzrost limfocytów. Na podstawie danych z piśmiennictwa i własnych wstępnych doświadczeń wybrano inokulum  $5 \times 10^4$ /ml i określono kinetykę wzrostu komórek X63/0 IL-2 w 3 niezależnie zakładanych hodowlach.

Na rysunku 1 widać, że intensywny wzrost komórek X63/0 IL-2 obserwuje się do szóstego dnia hodowli, liczba żywych komórek osiąga wówczas wartość maksymalną



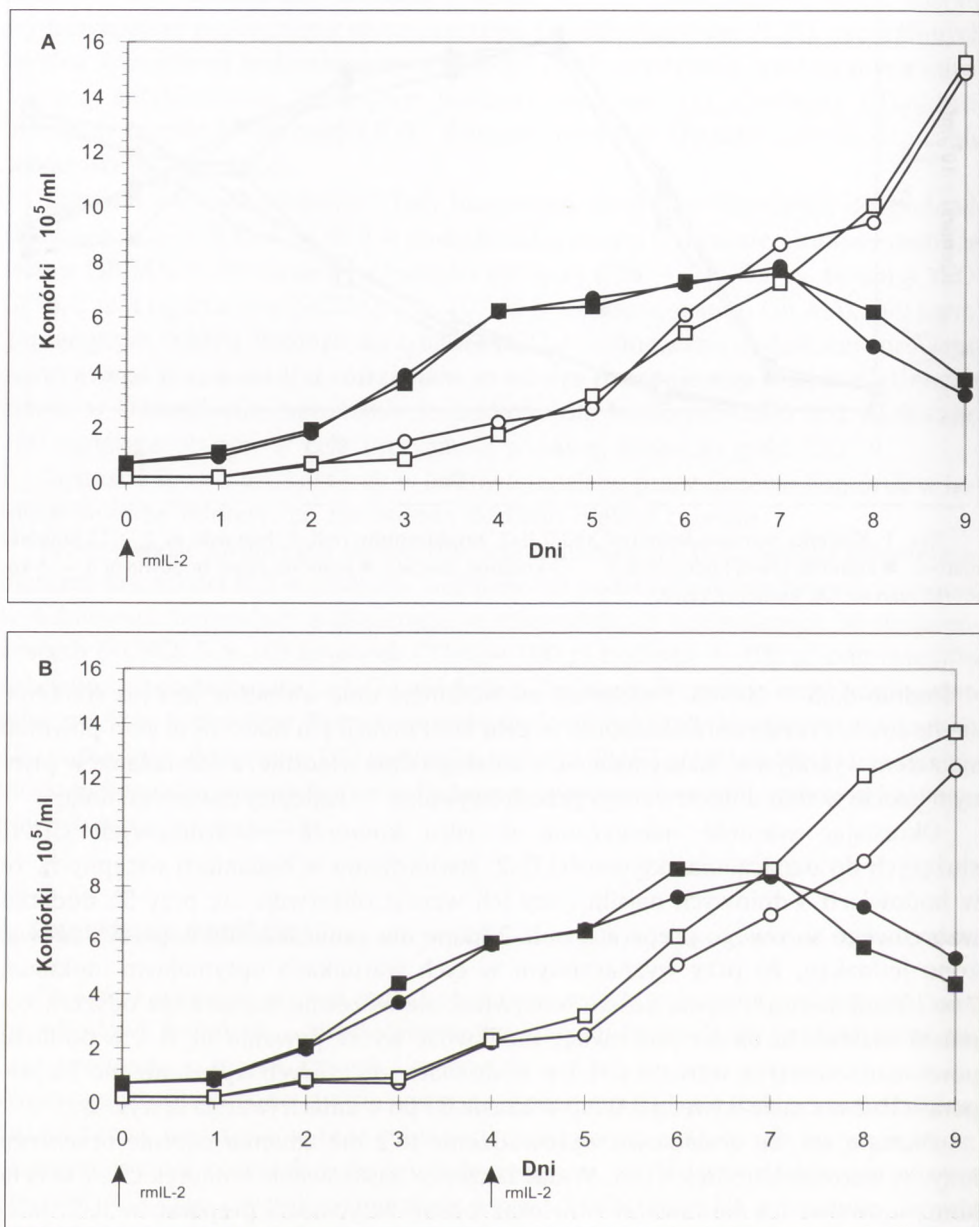
Rys. 1. Kinetyka wzrostu komórek X63/0 IL-2, producentów rmlL-2; hodowla nr 1 – □ komórki martwe, ■ komórki żywe; hodowla nr 2 – ○ komórki martwe, ● komórki żywe; hodowla nr 3 – △ komórki martwe, ▲ komórki żywe.

– średnio  $8,65 \times 10^5/\text{ml}$ . Począwszy od siódmego dnia widoczne jest już starzenie się hodowli. Przesiewanie komórek w celu kontynuacji ich hodowli *in vitro* powinno się zatem wykonywać maksymalnie do szóstego dnia włącznie, a zamrażanie w płynnym azocie w celu długotrwałego przechowywania – najlepiej czwartego dnia.

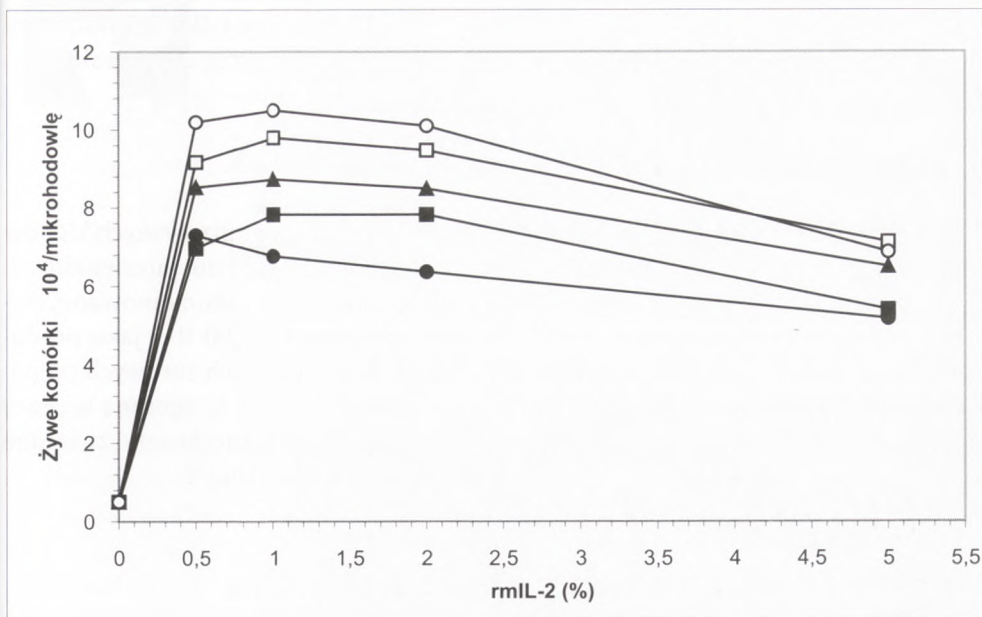
Określając warunki namnażania *in vitro* komórek wskaźnikowych CTL-L, służących do oznaczania aktywności IL-2, stwierdzono w badaniach wstępnych, że w hodowlach 4-dniowych najsilniejszy ich wzrost obserwuje się przy 5% dodatku wzorcowego surowego preparatu rmlL-2 (dane nie zamieszczone w pracy). Zauważono jednakże, że przy wyznaczonym w tych warunkach optymalnym inokulum  $7 \times 10^4/\text{ml}$  komórki rosną dość intensywnie, ale wcześniej wzrasta też odsetek komórek martwych. Biorąc pod uwagę możliwość wyczerpywania się IL-2 w podłożu porównano kinetykę wzrostu CTL-L w hodowlach, do których wprowadzono 5% preparatu IL-2 w czasie 0 (wersja A) lub w czasie 0 i po 4 dniach (wersja B) (rys. 2).

Okazało się, że dodatkowe wprowadzenie IL-2 nie zmienia istotnie przebiegu krzywej wzrostu komórek CTL-L. Widać także, że pasażowanie komórek CTL-L w celu kontynuowania ich hodowli *in vitro* oraz ocenę aktywności preparatów IL-2, mierzoną przez wzrost liczby CTL-L, najlepiej przeprowadzać 4 dni hodowli. Obserwuje się wówczas prawie 9-krotny wzrost liczby żywych komórek, a zawartość komórek martwych w hodowli jest jeszcze stosunkowo niska i wynosi około 26%. Na tej podstawie, do sprawdzania aktywności i jakości otrzymanych partii IL-2 zastosowano w dalszych eksperymentach 4-dniowy test proliferacyjny, przeprowadzany w mi-





Rys. 2. Kinetyka wzrostu komórek wskaźnikowych CTL-L; A – jednokrotne wprowadzenie rmlL-2 w dniu 0, B – dwukrotne wprowadzenie rmlL-2 w dniu 0 i 4; hodowla nr 1 – ○ komórki martwe, ● komórki żywe; hodowla nr 2 – □ komórki martwe, ■ komórki żywe.



Rys. 3. Kinetyka wzrostu komórek wskaźnikowych CTL-L w obecności preparatów rmlL-2 zebranych po 7-11 dniach hodowli komórek X63/0 IL-2; ● – 7 d, ■ – 8 d, ▲ – 9 d, □ – 10 d, ○ – 11 d.

kroplówkach hodowlanych 96-studzienkowych. Badano w nim aktywność surowych preparatów rmlL-2, zebranych z hodowli komórek X63/0 IL-2 prowadzonych w butelkach 75 cm<sup>2</sup> przez 7-11 dni, w podłożu bez dodatku genetycyny, aby jej nie przetransmitować do surowego preparatu rmlL-2 (rys. 3).

Z krzywych wzrostu komórek wskaźnikowych widać, że najbardziej aktywny preparat rmlL-2 pochodzi z 11-dniowej hodowli komórek X63/0 IL-2. Jego optymalne stężenie w podłożu, stymulujące najsilniejszą proliferację limfocytów wskaźnikowych CTL-L, mieści się w przedziale od 0,5 do 2%. Ze względu na stosunkowo niewielką różnicę w aktywności preparatu 11- i 10-dniowego oraz zaobserwowaną również we wcześniejszych badaniach (rys. 1) niższą żywotność komórek-producentów w hodowli 11-dniowej niż 10-dniowej, postanowiono zbierać surowe preparaty rmlL-2 po 10 dniach hodowli, biorąc pod uwagę, że będą one wprowadzane do hodowli wtórnych, tj. do hodowli swoistych klonów limfocytów, które nie tolerują dużych stężeń metabolitów i produktów lizy komórek.

Różne partie otrzymanych dotychczas 10-dniowych preparatów rmlL-2 przetestowano wielokrotnie wobec kilku swoistych ustabilizowanych klonów limfocytów T rozpoznających antygeny *T. gondii*, stwierdzając każdorazowo, że intensywnie pobudzają one wzrost i różnicowanie się limfocytów w limfoblasty, jeżeli są stosowane w stężeniu 2% bezpośrednio po restymulacji limfocytów swoistym antygenem



(faza proliferacyjna), natomiast w fazie stacjonarnej wystarczy tylko 0,5% dodatek do podłoża, aby utrzymać komórki w dobrej formie przez okres 2-3 miesięcy.

#### 4. Podsumowanie

W celu podtrzymania ciągłej hodowli *in vitro* swoistych ustabilizowanych klonów limfocytów T myszy, które potrzebują bezwzględnie do wzrostu interleukiny 2, opracowano warunki wytwarzania na małą skalę laboratoryjną rekombinowanej mysiej IL-2. Wykorzystano do tego celu linię szpiczaka myszy X63/0 IL-2 jako producenta tej limfokiny, zaś do oznaczania aktywności otrzymywanych surowych preparatów rml-2 użyto wskaźnikowych limfocytów mysich linii CTL-L. Opisana w pracy metoda otrzymywania rml-2 obniża w sposób istotny znaczne koszty związane z prowadzeniem długoterminowych hodowli klonów limfocytów T.

#### Literatura

1. Robak T., (1995), *Biologia i farmakologia cytokin*, red. Robak T., PWN, Warszawa-Łódź, 73-86.
2. Robak T., (1995), *Post. Hig. Med. Dośw.*, 49, 367-393.
3. Swain S. L., (1991), *Curr. Opin. Immunol.*, 3, 304-310.
4. Carter L. L., Dutton R. W., (1996), *Curr. Opin. Immunol.*, 8, 336-342.
5. Mosmann T. T., Sad S., (1996), *Immunol. Today*, 17, 138-146.
6. Brutok J. K., Koehler J. M., (1994), *Pharmacotherapy*, 6, 635-656.
7. Malaguarnera M., Ferlito L., Gulizia G., Fazio J., Pistone G., (2001), *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 57, 267-273.
8. Rosenberg S. A., (2001), *Nature*, 411, 380-384.
9. Vlasveld L. T., Rankin E. M., (1994), *Cancer Treat. Rev.*, 20, 275-311.
10. Smith K. A., (1993), *Blood*, 81, 1414-1423.
11. de Paoli P., (2001), *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 8, 671-677.
12. Masuszawa M., Mochida N., Amano T., Fujimura T., Hamada Z., Tamauchi H., Sakurai Z., Nshizama S., Katsuoka K., (2001), *J. Dermatol. Sci.*, 27, 88-94.
13. Reiner S. L., Locksley R. M., (1995), *Annu. Rev. Immunol.*, 13, 51-177.
14. Reichmann G., Długońska H., Fischer H.-G., (1997), *Med. Microbiol. Immunol.*, 186, 25-30.
15. Karasuyama H., Melchers F., (1988), *Eur. J. Immunol.*, 18, 97-104.
16. Gillis S., Smith K. A., (1977), *Nature*, 268, 154-156.