

小鼠 PD-1 基因启动子克隆鉴定及转录调控分析*

郑花鸯^{1)**} 汤必奎^{1, 2)**} 王培伟¹⁾ 高方健¹⁾ 胡晓波¹⁾ 龚立¹⁾ 朱乃硕^{1)***}

⁽¹⁾ 复旦大学生命科学学院微生物感染与分子免疫学实验室, 遗传学国家重点实验室, 生物医学研究院, 上海 200433;

⁽²⁾ 蚌埠医学院生物科学系, 蚌埠 233030)

摘要 PD-1 分子是一种重要的免疫调控因子, 目前对其自身表达调控尚未有系统的研究. 对 PD-1 启动子区域进行分析, 克隆构建了含 PD-1 基因上游约 2 kb 范围内含 4 种不同长度调控序列的双荧光素酶表达载体. 通过 FACS 检测发现, 小鼠 T 淋巴瘤 EL4 细胞稳定表达 PD-1, 而骨髓瘤 Sp2/0-Ag 细胞则在佛波酯(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)和离子霉素(ionomycin, IO)诱导后才表达 PD-1. 4 种双荧光素酶报告系统在上述两种细胞中检测 PD-1 启动子各区段活性显示, -227~+49 bp 区域含有 PD-1 核心启动子, 上游-1 127~-716 bp 含有较强正性调节元件, 而在-1 685~-1 128 bp、-715~-228 bp 两个区域含有负性调节元件, 这种正负调控区交错的启动子活性现象说明了 PD-1 基因表达调控的复杂性, 这些结果为 PD-1 基因的表达调控提供了结构基础和依据.

关键词 PD-1, 启动子鉴定, 转录调控分析

学科分类号 Q7, R3

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00664

PD-1(programmed cell death 1)分子是通过差减杂交技术从受凋亡刺激的 T 细胞中分离得到的免疫负调控因子^[1], 由胞外的 IgV 样基序、跨膜区、胞内的 ITIM(immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif)和 ITSM(immunoreceptor tyrosine-based switch motif)基序组成, 与 CTLA-4 同属于 CD28 家族^[2], 主要表达于活化的 T 细胞、B 细胞和髓样细胞表面^[3]. 受抗原刺激后, PD-1 与其配体 PD-L1(亦称 B7-H1, 表达于 B 细胞、T 细胞、巨噬细胞)和 PD-L2(亦称 B7-DC, 表达于 DC 细胞表面)结合后通过招募 SHP-1(src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase)和 SHP-2 到其 ITSM 基序上, 启动下游效应分子磷酸化, 发挥其免疫调控作用^[4-5].

已有研究显示, PD-1/PD-L 通路在机体免疫耐受、肿瘤免疫逃逸、寄生虫感染、慢性病毒感染等都发挥着极为重要的作用. 如 APC 上的 PD-Ls 与 PD-1 相互作用抑制自体反应性 T 细胞, 诱导免疫耐受. 肿瘤细胞通过上调其表面的 PD-Ls 与表达于 CD8⁺T 细胞上的 PD-1 相互作用, 抑制 CD8⁺T 细胞的杀伤活性, 进而逃逸机体免疫系统的监视, 而阻断该通路则有助于抑制肿瘤的转移、减弱病情

的严重程度对于肿瘤病人的预后^[6]. 慢性病毒感染如 HBV 患者中 CD8⁺T 细胞表面 PD-1 表达显著上调, 且伴随着 CD8⁺T 细胞功能的减弱^[7-9]. 此外 PD-1 基因还和 Treg 细胞的功能相关^[10].

虽然 PD-1 在免疫调控中的重要作用已有众多文献报道, 但是对于其自身的转录调控机制研究还未见系统报道. 转录调节作为基因表达调控最主要的内容, 启动子在此相当重要. 因此分析 PD-1 基因启动子的特征对于研究 PD-1 基因的表达调控具有重要的意义. 本实验克隆了小鼠 PD-1 基因启动子不同长度的片段, 通过双荧光素酶表达载体在两种不同背景表达的细胞株中进行活性分析以了解 PD-1 启动子的结构和元件, 为进一步的免疫调控研究打下基础.

* 国家自然科学基金资助项目(30571650, 30901315), 国家重点基础研究发展计划(973)资助项目(2006CB504304)和国家高技术研究发展计划(863)资助项目(2006AA02Z462).

** 共同第一作者.

*** 通讯联系人.

Tel/Fax: 021-65641215, E-mail: nszhu_1@sina.com

收稿日期: 2009-11-08, 接受日期: 2010-01-11

1 材料和方法

1.1 质粒、菌株、试剂和动物

pGL3-Basic、pRL-SV40 质粒购自 Promega 公司；构建的含不同长度 PD-1 启动子片段的载体为 pGL3-A(-1 685~+49 bp)、pGL3-B(-1 127~+49 bp)、pGL3-C(-714~+49 bp)、pGL3-D(+27~+49 bp)；*E. coli* DH5 α 菌株本室保藏；Cell Line Nucleofector Kit L 购自 Amaxa 公司；DMRIE-C Reagent 购自 Invitrogen 公司；*Hind* III、*Sac* I 限制性内切酶、Prime STAR HS DNA Polymerase、T4 DNA Ligase、pMD19-T Simple Vector system 试剂盒购自 Takara 公司；PCR 产物回收试剂盒、胶回收试剂盒、质粒抽提试剂盒、基因组 DNA 抽提试剂盒均购于 Axygen 公司；超纯质粒小抽试剂盒购自 Qiagen 公司；RPMI-1640 细胞培养基、胎牛血清、青霉素和链霉素双抗购自 Gibco 公司；Dual-Luciferase Reporter Assay System 购自 Promega 公司；12- 肉豆蔻酰 -1, 3- 乙酸(PMA)购自上海基康生物有限公

司；离子霉素(IO)购自上海生工生物工程有限公司；Phycoerythrin(PE)anti-mouse-PD-1(CD179)购自 eBioscience 公司；C57BL/6J 小鼠购自中国人民解放军第二军医大学。

1.2 细胞与细胞培养

小鼠 T 淋巴瘤细胞 EL4 和小鼠骨髓瘤细胞 Sp2/0-Ag 细胞培养于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱，培养基为 RPMI-1640 含 10%胎牛血清及 100 U/ml 青霉素和 100 g/L 链霉素。生长至对数期将其接种至 24 孔板，用于后期 FACS 分析和瞬时转染实验。

1.3 引物设计

C57BL/6J 小鼠 PD-1 基因(GenBank 登录号：NC_000067) -3 000~+770 bp 区域用启动子在线预测软件 Proscan(<http://thr.cit.nih.gov/molbio/proscan/>)分析，根据结果设计 4 对 PCR 引物(如表 1 所示)，其中 r-Pd1 为共用下游引物，5'端和 3'端分别引入 *Sac* I 和 *Hind* III 的酶切位点(划线部分)，所有引物均由 Invitrogen 公司合成。

Table 1 Primers for PCR Amplification

Primers	Sequence(5'→3')	Position
Pd1-A(sense)	gAAggAgCTCCAgCAACAgCCTTgCTCCTCAC	-1 685~-1 663 bp
Pd1-B(sense)	gAAggAgCTCgTggCTgAggCAGTTgCCAgAT	-1 127~-1 105 bp
Pd1-C(sense)	gAAggAgCTCgggCAGCAGATCCAgCATCTTg	-714~-692 bp
Pd1-D(sense)	gAAggAgCTCCTCTCACTAgTCCCTTACCTgC	-227~-205 bp
r-Pd1(antisense)	CCCAAgCTTgCAGTgTgCCTTCAGTAGCAG	+27~+49 bp

1.4 PCR 扩增和荧光素酶表达载体的构建

用 C57BL/6J 小鼠尾静脉血提取基因组，以此为模板用所列引物分别扩增不同长度的 4 段启动子序列，扩增片段分别为 PD1-A(1 734 bp)、PD1-B(1 176 bp)、PD1-C(763 bp)、PD1-D(249 bp)，产物均用 PCR 产物回收试剂盒回收纯化。用 *Sac* I 和 *Hind* III 双酶切 PCR 纯化产物及 pGL3-Basic 载体，回收产物后按目的片段和载体摩尔比 3 : 1 用 T4 DNA Ligase 16℃ 连接过夜，转化感受态 *E. coli* DH5 α 细胞，阳性克隆抽取质粒经双酶切和测序验证。

1.5 FACS 鉴定细胞系 PD-1 表达

EL4 和 Sp2/0-Ag 细胞生长至对数生长期收集细胞，按 1×10⁵ 细胞每孔加至 24 孔板中用 PMA (10 μ g/L) 和 IO (500 μ g/L)刺激，于 12 h、24 h 后分别离心收集细胞，加 100 μ l PBS 重悬细胞后，

加 1 μ l PE-anti-mouse-PD-1(0.2 g/L)在暗处室温孵育 30 min，终止反应洗涤后重悬细胞，流式细胞仪检测刺激前后细胞表面 PD-1 蛋白的表达情况。

1.6 细胞转染和荧光素酶活性的检测

含 PD-1 不同启动子片段的 luciferase 报告载体 pGL3-X 和内参照 pRL-SV40 质粒按 20 : 1 的比例转染细胞。EL4 细胞按照 Cell Line Nucleofector Kit 操作说明书转染，Sp2/0-Ag 细胞按照 DMRIE-C 操作说明书转染。转染后 4 h 加入 PMA(10 μ g/L)和 IO(500 μ g/L)刺激，48 h 后按照 Dual-Luciferase Reporter Assay System 操作说明书，化学发光仪检测荧光素酶的活性。启动子活性用相对荧光素酶值(萤火虫荧光素酶激发底物释放荧光的数值 *M1* 与内参照海肾荧光素酶释放荧光的数值 *M2* 的比)表示。

1.7 序列分析

C57BL/6J 小鼠 PD-1 基因序列和 Blast 分析结果在 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)获得, 转录起始点及上游启动子调控区转录元件及转录因子在 <http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess> 和 http://mbs.cbrc.jp/research/db/TFSEA_RCH.html 进行在线分析.

1.8 统计学分析

所有实验均 3 次重复, 数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 应用 SPSS10.5 软件进行组间 *t* 检验, 统计学分析 *P* < 0.05 为有显著性差异, *P* > 0.05 为无显著性差异.

2 结 果

2.1 小鼠 PD-1 基因启动子的克隆

以 C57BL/6J 小鼠基因组为模板, 用合成的 4 对引物 PCR. 产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 可见

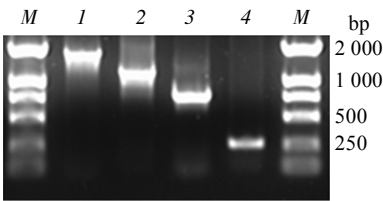


Fig. 1 PCR products of different fragments of PD-1 gene promoter

1: PD1-A; 2: PD1-B; 3: PD1-C; 4: PD1-D; M: DL2000 DNA marker.

成功扩增出 4 段 PD-1 启动子片段, 与预计设计的大小一致(图 1), 说明成功扩增了不同区域的 PD-1 启动子片段.

2.2 报告基因表达载体的构建

将上述 PCR 得到的 4 个片段和 pGL3-Basic 载体分别用 *Sac* I 和 *Hind* III 双酶切连接后转化 *E. coli* DH5 α 菌株感受态, 经菌落 PCR 鉴定后挑选阳性克隆质粒双酶切鉴定(图 2), 测序验证和预期序列一致, 说明成功构建了 4 种含 PD-1 启动子不同区域的双荧光素酶报告载体.

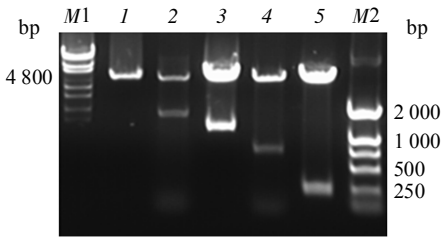


Fig. 2 Identification of pGL3-X by *Hind*III and *Sac* I double digestion

1: pGL3-Basic; 2: pGL3-A; 3: pGL3-B; 4: pGL3-C; 5: pGL3-D; M1: λ -EcoT14 I digest DNA marker; M2: DL2000 DNA marker.

2.3 表达 PD-1 蛋白的细胞系的鉴定

用 PMA+IO 刺激 EL4 细胞 12 h、24 h 后分别流式细胞仪检测刺激前后细胞表面 PD-1 蛋白的表达情况. 从图 3 中可以看到, 无 PMA+IO 刺激组

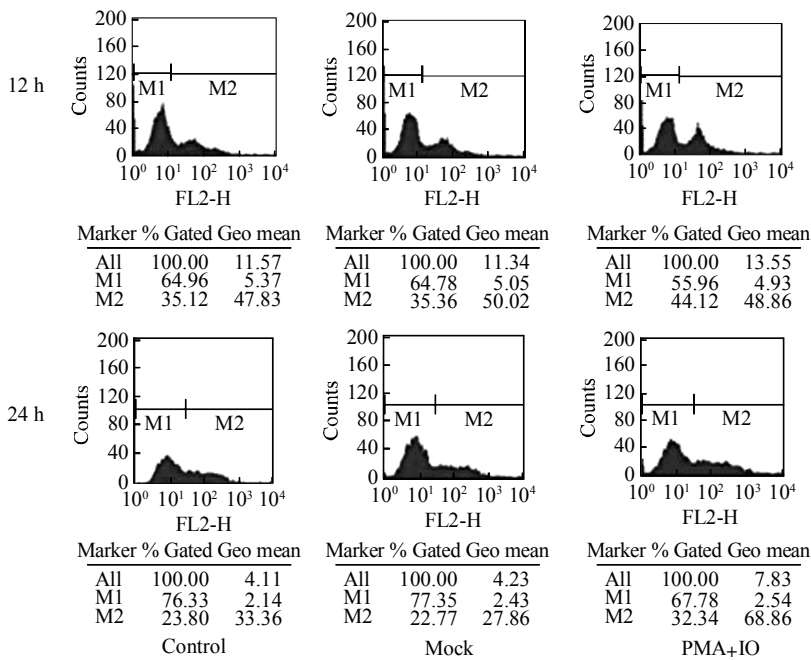


Fig. 3 FACS analysis of PD-1 protein expression in EL4 cell after stimulation with PMA and IO for 12 h and 24 h

Data are representative of three independent experiments. Control: Groups without stimulation; Mock: Groups stimulated with DMSO plus alcohol; PMA+IO: Groups stimulated with PMA plus IO.

与 PMA+IO 刺激组均高表达 PD-1 蛋白, 且两者的表达差异不大, 刺激 12 h 和 24 h 的表达水平也无显著性差异, 据此可得知 EL4 是稳定表达 PD-1 蛋白的细胞系.

用同样的方法检测 Sp2/O-Ag 细胞 PD-1 蛋白的

表达情况, 从图 4 中可以看到, PMA+IO 刺激组的表达水平显著高于无刺激组, 刺激 24 h 组的表达也高于刺激 12h 组的表达, 可推断 Sp2/O-Ag 细胞为 PD-1 蛋白诱导表达细胞系.

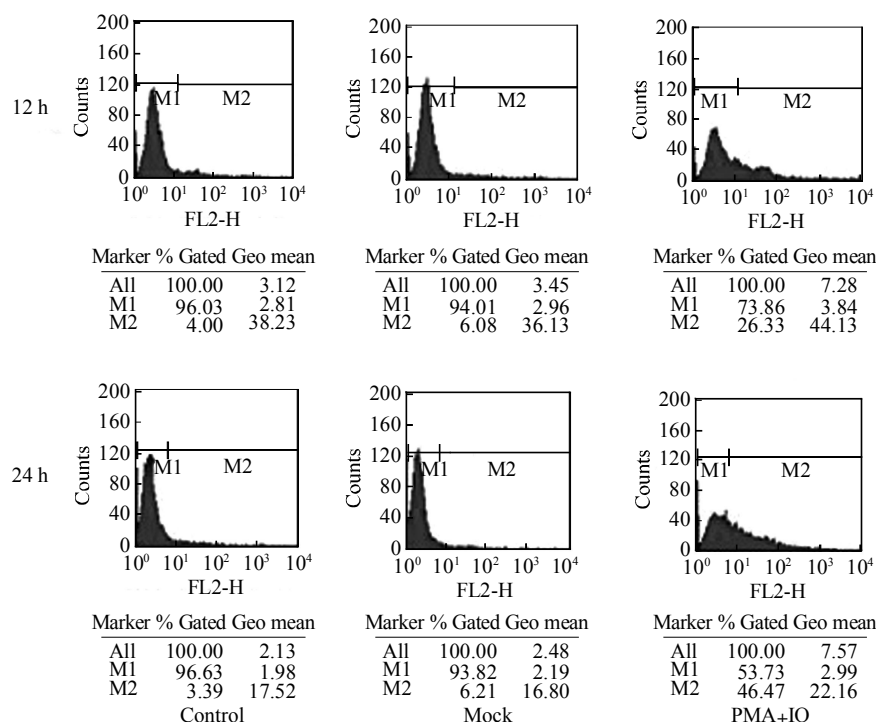


Fig. 4 FACS analysis of PD-1 protein expression in Sp2/O-Ag cell after stimulation with PMA and IO for 12 h and 24 h

Data are representative of three independent experiments. Control: Groups without stimulation; Mock: Groups stimulated with DMSO plus alcohol; PMA+IO: Groups stimulated with PMA plus IO.

2.4 PD-1 基因启动子活性的检测

将含 PD-1 不同长度启动子的荧光素酶报告载体 pGL3-A、pGL3-B、pGL3-C、pGL3-D 与用作内参照的海肾荧光素酶 pRL-SV40 载体分别共转染细胞, 以 pGL3-Basic 和 pRL-SV40 组共转染为空白对照, 分 PMA+IO 刺激和无 PMA+IO 刺激两组检测不同启动子活性. 结果发现, 在 EL4 细胞中 pGL3-B 活性最强, pGL3-D 次之, pGL3-A 和 pGL3-C 活性均很弱, 其中 pGL3-B 的活性约为 pGL3-C 的 20 倍左右, 提示在 -1 685~-1 128 bp、-714~-228 bp 两个区域间存在转录负调控元件, -1 127~-715 bp 区域含有增强子或顺式作用元件序列, 而 -227~+49 bp 含有 PD-1 基因启动子活性所必需的基本元件, 包含了其核心启动子区域 (图 5). 在 Sp2/O-Ag 细胞中 PD-1 基因启动子不同区域的活性变化趋势和在 EL4 细胞中一样, 同时可见 Sp2/O-Ag 细胞中无刺激组的活性小于 EL4 细胞, 但刺激组的活性大于 EL4 细胞. 虽然在两种

细胞中刺激组的活性均显著强于无刺激组 ($P < 0.05$), 但 Sp2/O-Ag 细胞中刺激组 / 无刺激组的比值 (约 8~10) 高于 EL4 细胞 (约 2~3), 说明在 EL4 细胞中本底表达较高, Sp2/O-Ag 细胞中本底表达低但诱导效果高于 EL4 细胞, 这和前面 FACS 检测的两种细胞系不同的 PD-1 表达状态一致 (图 6). 本实

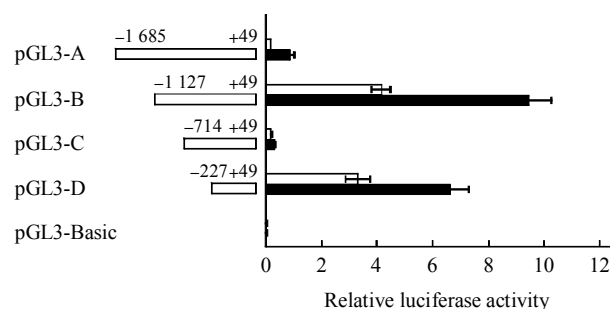


Fig. 5 Activity analysis of different fragments of PD-1 promoter in EL4 cell with or without stimulation with PMA plus IO

□: Unstimulated; ■: Stimulated.

验经过 3 次独立重复, 结果趋势一致. 上述结果显示 PD-1 启动子存在正负调控区交替排列的现象, 这些元件的交替排列给调控复杂性和多样性提供了结构基础.

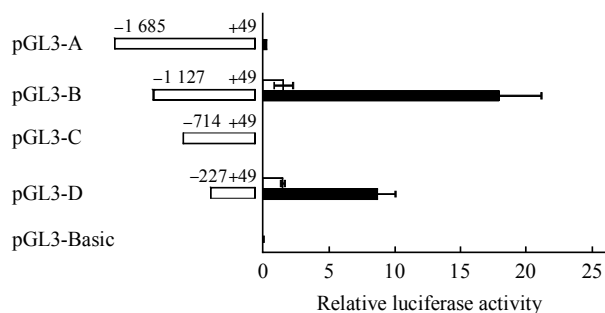


Fig.6 Activity analysis of different fragments of PD-1 promoter in Sp2/0-Ag cell with or without stimulation with PMA plus IO
□: Unstimulated; ■: Stimulated.

2.5 PD-1 启动子区域转录调控元件及转录因子分析

根据上述的启动子活性分析结果可知 PD-1 基因上游存在着不同的调控功能区域, 我们使用 <http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess> 和 http://mbs.cbrc.jp/research/db/TFSEA_RCH.html 两种在线分析 PD-1 启动子 -1 685~+49 bp 区域发现有大量的转录因子结合位点, 不同的功能区域转录因子结合位点的分布有所差异(图 7), 其中含有核心启动子区 -227~+49 bp 的分析结果如图 8, 可见该区域缺乏经典的 TATA、CAAC 保守序列但有 Sp1、PEA3、C/EBP alpha/beta/delta、CAC-binding protein 等重要转录因子的结合位点. 从分布图可知负调控区域出现的转录因子结合位点在正调控区域均有出现, 而在核心启动子和正调控区域均有的 Sp1 结合位点却在两个负调控区域都没有, 提示转录因子 Sp1 可能在 PD-1 的表达调控中起着关键的作用.

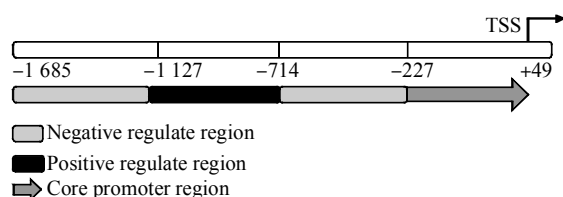


Fig. 7 Schematic map of the PD-1 upstream region
Negative regulate region: -1 685~-1 127 bp, -714~-227 bp; Positive regulate region: -1 127~-714 bp; Core promoter region: -227~+1; TSS: Transcription start site.

-227 CTCTCACTAGTCCCTTACCTGCTCTCCAGGCATCGTTCCCTC
C/EBP alpha
CCACTCCCCTCCCCCTTCCATGCCCTCCCCCACCTCTAGTTGCCTGTTC
CAC-binding protein
TCCCACCCTTGTGGAGGTGGAGGAAGAGGGGCGGGAGCCAAGAACAGGT
C-ETS-2(h) PEA3 C/EBP β/δ SP1
CTCCTCCCTCCAACATGACCTGGGACAGTTTCCTTCCGCTACAGACAAC
TCTGCCTGAGCAGCGGGAGGAGGAAGAGGAGACTGCTACTGAAGGCGAC
TSS(transcription start site)
CACTGC +49

Fig. 8 Transcriptional factor binding sites analysis of PD-1 core promoter

The underlined sequences were the binding sites for transcriptional factors, the underlined and italic sequence were the transcription start site.

3 讨 论

作为重要的免疫调控因子, PD-1 作用已被广泛研究, 但是其自身的调控机制尚未见系统研究报道, 本文首次对 PD-1 基因的启动子进行了活性分析. 首先利用流式细胞仪筛选检测了多种细胞系, 结果显示, EL4 细胞稳定表达 PD-1 蛋白, 而 Sp2/0-Ag 细胞为抗原可诱导表达, 后期实验中的 PD-1 基因启动子检测分别在这两种细胞系中进行, 希望利用这两种固有表达特征不同的细胞系能发现一些细胞调控 PD-1 基因表达的机制. 双荧光素酶报告系统检测结果显示 4 种不同长度的启动子片段在两种细胞中的活性趋于一致: pGL3-B 活性最强, pGL3-D 次之, pGL3-C 活性最弱. 说明 -227 bp~+49 bp 区域内含有核心启动子, -1 685~-1 128 bp 和 -714~-228 bp 区域内可能存在较强的转录负调控元件, 而 -1 127~-715 bp 区域内则可能存在正调控性作用的顺式作用元件, 这些元件的交替排列给调控复杂性和多样性提供了结构基础.

从已有的研究报道可知, PD-1 作为一种抑制性的共刺激分子, 主要表达于活化的 CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞、B 细胞以及髓样细胞和胸腺细胞上, 然后通过 PD-1/PD-L1 途径发挥其免疫抑制作用, 在病毒(HBV、HIV)的慢性感染、自身免疫疾病(SLX)、肿瘤发生中的免疫逃逸或抑制中均可见一些淋巴细胞表面的 PD-1 因子的高表达^[11-15]. 我们的结果也发现了类似的现象, 在小鼠 T 淋巴瘤细胞 EL4 和小鼠骨髓瘤细胞 Sp2/0-Ag 细胞中刺激组的 PD-1 启动子活性均显著强于无刺激组, 说明

PD-1 启动子活性和 PD-1 蛋白在细胞活化前后的表达趋势一致。

用两个线数据库对-1 685~+49 bp 区域进行生物信息学分析发现很多转录因子结合位点, 如 CAC-binding protein、PEA3/PU.1、GATA-1、C/EBP 和 Sp1 等重要转录因子^[16-18]。在-1 127~-715 bp 和-227~+49 bp 两个区域存在紧密靠近的 Ets 家族 PEA3、PU.1、C/EBP 转录因子结合位点。同时发现在-1 685~-1 128 bp 和-714~-228 bp 负调控区域出现的转录因子结合位点在正调控区域均有出现, 而在核心启动子-227~+49 bp 和正调控区域-1 127~-715 bp 均存在的 Sp1 结合位点在两个负调控区域都没有, 提示转录因子 Sp1 可能在 PD-1 的表达调控中起着关键的作用。在后继的研究中拟使用电泳迁移率变动分析(EMSA)实验分析这些转录因子在两种不同表达细胞株中的结合差异, 试图寻找出对 PD-1 蛋白表达起关键作用的关键的调控因子。

综上所述, 本研究鉴定了 PD-1 蛋白表达的细胞系, 分析了不同长度 PD-1 基因启动子在不同细胞系中的活性和可能存在的转录因子结合位点。初步揭示了 PD-1 基因启动子的结构功能特征, 为进一步系统研究 PD-1 基因的表达调控打下了良好的基础。

参 考 文 献

- [1] Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, *et al.* Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *The EMBO J*, 1992, **11**(11): 3887-3895
- [2] Greenwald R J, Freeman G J, Sharpe A H. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol*, 2005, **23**: 515-548
- [3] Agata Y, Kawasaki A, Nishimura H, *et al.* Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int Immunol*, 1996, **8**(5): 765-772
- [4] Okazaki T, Maeda A, Nishimura H, *et al.* PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology-domain-containing tyrosinephosphatase to phosphotyrosine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**(24): 13866-13871
- [5] Chemnitz J M, Parry R V, Nichols K E, *et al.* SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *J Immunol*, 2004, **173**(2): 945-954
- [6] Okazaki T, Honjo T. The PD-1-PD-L pathway in immunological tolerance. *TRENDS in Immunology*, 2006, **27**(4): 195-201
- [7] Peng G P, Li S P, Wua W, *et al.* PD-1 upregulation is associated with HBV-specific T cell dysfunction in chronic hepatitis B patients. *Mol Immunol*, 2008, **45**(4): 963-970
- [8] Pian Ye, Weng Z H, Zhang S L, *et al.* Programmed death-1 expression is associated with the disease status in hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol*, 2008, **14**(28): 4551-4557
- [9] Zhang Z, Zhang J Y, Wherry E J, *et al.* Dynamic programmed death 1 expression by virus-specific CD8⁺T cells correlates with the outcome of acute hepatitis B. *Gastroenterology*, 2008, **134**(7): 2168-2171
- [10] Yang Z, Wang S G, Zhang J B. Expression of PD-1 is up-regulated in CD4⁺CD25⁺ FoxP3⁺ regulatory T cell of non-responders after hepatitis B surface antigen vaccine immunization. *Clin Immunol*, 2008, **129**(1): 176-177
- [11] Khoury S J, Sayegh M H. The roles of the new negative T cell co-stimulatory pathways in regulating autoimmunity. *Immunity*, 2004, **20**(5): 529-534
- [12] Ebelt K, Babaryka G, Frankenberger B, *et al.* Prostate cancer lesions are surrounded by FOXP3⁺, PD-1⁺ and B7-1⁺ lymphocyte clusters. *Eur J Cancer*, 2009, **45**(9): 1664-1672
- [13] Day C L, Kaufmann D E, Kiepiela P, *et al.* PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature*, 2006, **443**(7109): 350-354
- [14] Hirano F, Kaneko K, Tamura H, *et al.* Blockade of B7-1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity. *Cancer Res*, 2005, **65**(3): 1089-1096
- [15] Ding H, Wu X, Wu J, *et al.* Delivering PD-1 inhibitory signal concomitant with blocking ICOS co-stimulation suppresses lupuslike syndrome in autoimmune BXSB mice. *Clin Immunol*, 2006, **118**(2-3): 258-267
- [16] Eckert R L, Crish J F, Banks J F, *et al.* The epidermis: genes-on-genes off. *J Invest Dermatol*, 1997, **109**(4): 501-509
- [17] McNagny K M, Sieweke M H, Döderlein G, *et al.* Regulation of eosinophil-specific gene expression by a C/EBP-Ets complex and GATA-1. *EMBO J*, 1998, **17**(13): 3669-3680
- [18] Merika M, Orkin S H. Functional synergy and physical interactions of the erythroid transcription factor GATA-1 with the kruppel family proteins Sp1 and EKLf. *Mol Cell Biol*, 1995, **15**(5): 2437-2447

Identification and Characterization of The Promoter and Upstream Regulation Region of Mouse PD-1*

ZHENG Hua-Yang^{1)**}, TANG Bi-Kui^{1,2)**}, WANG Pei-Wei¹⁾, GAO Fang-Jian¹⁾,
HU Xiao-Bo¹⁾, GONG Li¹⁾, ZHU Nai-Shuo^{1)***}

⁽¹⁾ *Laboratory of Molecular Virology and Immunology, State Key Laboratory of Genetic Engineering, Department of Microbiology, School of Life Sciences, Institute of Biomedical Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China;*

⁽²⁾ *Department of Life Science, Bengbu Medical College, Bengbu 233030, China)*

Abstract Extensive studies have been performed on function of PD-1 in immunological regulation, while as so far, studies on the exact regulation mechanism of PD-1 expression have not been reported. PD-1 expression in EL4 and Sp2/0-Ag cell lines was detected with PE-Anti Mouse-PD-1 antibody through FACS. Genomic DNA from C57BL/6J mouse was used to produce different lengths of PD-1 promoter fragments. The PCR products were cloned into the luciferase reporter vector pGL3-Basic and co-transfected with pRL-SV40 into EL4 and Sp2/0-Ag cell lines to investigate the PD-1 promoter activity. FACS results showed that EL4 cells express PD-1 protein constitutently, while Sp2/0-Ag cells express high level of PD-1 after stimulation with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) plus ionomycin (IO). Luciferase assays revealed that the activity of different lengths of PD-1 promoter region was very alterable. This staggering negative-positive-negative arrangement indicates the complex regulation of PD-1 expression and provides important clues for elucidating the mechanisms of the PD-1 gene transcriptional regulation.

Key words PD-1, promoter identification, transcriptional regulation

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00664

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30571650, 30901315), Hi-Tech Research and Development Program of China (2006AA02Z462) and National Basic Research Program of China (2006CB504304).

**Zheng Hua-Yang and Tang Bi-Kui contributed equally to this work.

***Corresponding author.

Tel/Fax: 86-21-65641215, E-mail: nszhu_1@sina.com

Received: November 8, 2009 Accepted: January 11, 2010