

ОДЕРЖАННЯ РЕКОМБІНАНТНОГО АНАЛОГА sHB-EGF ЛЮДИНИ З ВИКОРИСТАННЯМ ГЕНЕТИЧНОЇ СИСТЕМИ ТРАНСПОЗОН–ТРАНСПОЗАЗА

Н. В. Короткевич
А. Ю. Лабинцев
Д. В. Колибо
С. В. Комісаренко

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ

E-mail: gnr.nata@gmail.com

Отримано 24.06.2015

Метою роботи було одержання рекомбінантного аналога розчинної форми гепаринзв'язувального EGF-подібного ростового фактора sHB-EGF у клітинах евкаріотів із використанням генетичної системи на основі транспозонів. Застосовано методи рекомбінантних ДНК та одержання евкаріотичних клітин-продуцентів рекомбінантних протеїнів. У результаті отримали евкаріотичні клітини-продуценти рекомбінантного аналога секреторної форми гепаринзв'язувального фактора росту людини sHB-EGF на основі лінії HEK293. Для одержання генетичних конструкцій, що кодують ген sHB-EGF, використовували невірусну систему експресії на основі транспозонів. Експерименти на мишах виявили можливість застосування одержаних генетичних конструкцій для пошуку підходів до використання sHB-EGF у генній терапії різноманітних патологічних станів.

Ключові слова: гепаринзв'язувальний фактор росту людини HB-EGF, транспозаза, рекомбінантні протеїни, ростові фактори.

Гепаринзв'язувальний фактор росту, що подібний до епідермального фактора росту HB-EGF (від англ.: Heparin-Binding Epidermal growth factor-like Growth Factor), — це трансмембранний глікопротеїн, який синтезується багатьма типами клітин. Уперше HB-EGF було виявлено в культуральному середовищі клітин гістоцитарної лімфоми людини U937 [1]. Подібно до інших епідермальних факторів росту HB-EGF синтезується у формі трансмембранного попередника. Трансмембранна форма HB-EGF (proHB-EGF) складається з про-, гепаринзв'язувального, EGF-подібного, юкстамембранного, трансмембранного та цитоплазматичного фрагментів. ProHB-EGF злущується з клітинної поверхні під дією поверхневих матриксних протеїназ, що призводить до утворення його розчинної форми — sHB-EGF (від англ.: soluble HB-EGF). sHB-EGF є активним мітогеном і хемоатрактантом для багатьох типів клітин [2]. Трансмембранна та розчинна форми HB-EGF виконують свої біологічні функції через взаємодію з EGF-рецепторами 1 (EGFR, HER-1) і 4 (HER-4), які є регуляторами про-

ліферації, ангиогенезу, міграції та метастазування [3].

Після розщеплення молекули proHB-EGF утворюється не лише секреторний фрагмент — sHB-EGF, а й залишковий внутрішньоклітинний фрагмент CTF (від англ.: C-Terminal Fragment). За даними літератури, CTF разом із трансмембранним доменом транспортується ретроградним шляхом до ядра клітини [4]. Ядерний CTF взаємодіє з транскрипційними репресорами генів циклінів, що забезпечує так званий сигнал дерепресії. Водночас sHB-EGF взаємодіє з EGFR і через Ras-MAPK-сигнальні каскади сприяє прогресуванню G1-фази клітинного циклу шляхом регуляції експресії цикліну D1, c-Myc та ін. Дерепресійний вплив CTF і трансактиваційний EGFR-опосередкований вплив sHB-EGF спільно регулюють клітинний цикл у відповідь на зовнішньоклітинні чинники [5].

Особливістю proHB-EGF, що відрізняє його від інших факторів росту, є здатність формувати комплекси з іншими мембранними протеїнами. Показано, що proHB-EGF формує комплекс із CD9, CD44, CD63, CD81,

CD82, $\alpha\beta 1$ -інтегринами, антиапоптозним протеїном BAG-1, металопротеїназами типу ADAM та мембранно-асоційованими гепарансульфатпротеогліканами. Той факт, що комплекс локалізується в ділянках міжклітинних контактів, підтверджує думку, що HB-EGF відіграє важливу роль у міжклітинних взаємодіях [6].

Слід зазначити, що proHB-EGF та sHB-EGF також мають здатність взаємодіяти з дифтерійним токсином (ДТ) — основним фактором патогенності збудника *Corynebacterium diphtheriae*. Саме proHB-EGF виступає в ролі рецептора до ДТ, опосередковуючи проникнення та реалізацію його токсичних властивостей усередині клітини [7]. Рецепторна функція proHB-EGF є ще однією причиною інтенсивного дослідження біологічної активності цього протеїну та його ролі в механізмах патогенезу дифтерії.

Нещодавно було встановлено здатність HB-EGF сприяти загоєнню ран і перешкоджати перетворенню гострих ран на хронічні виразки [8]. Відомо, що sHB-EGF є активним мітогеном для кератиноцитів, фібробластів та міофібробластів і сприяє посиленню інфільтрації місця ушкодження тканинними макрофагами. Окрім того, sHB-EGF стимулює продукцію ростових факторів у мезенхімальних стовбурових клітинах і саме тому може відігравати вкрай важливу роль у процесах репарації тканин за фізіологічних та патологічних умов, зокрема опромінення, надлишок стероїдних гормонів, патології кровопостачання, цукровий діабет [9].

Суттєвою є роль HB-EGF у посиленні проліферації інсулінпродукувальних β -клітин. Припускають, що екзогенний HB-EGF здатен посилювати проліферативний потенціал інсулінпродукувальних β -клітин острівків підшлункової залози через активацію кінази рецептора EGF та внутрішньоклітинної кінази mTOR [10]. Надекспресія HB-EGF у клітинах підшлункової залози дорослих мишей посилює також проліферацію β -клітин і сприяє перетворенню дуктальних клітин на інсулінпродукувальні [11]. HB-EGF може виступати в ролі гепатопротектора за медикamentозної гепатотоксичності та посилювати проліферацію гепатоцитів за часткової гепатотомії [12].

З огляду на поліфункціональність молекули HB-EGF виникає потреба в розробленні генно-інженерних підходів, які б давали змогу отримувати рекомбінантну форму HB-EGF людини для подальшого застосування з терапевтичною метою на клітинному та організменому рівнях: стимулювання проце-

сів загоєння ран, опіків, поверхневих виразок різної етіології, продукування інсуліну β -клітинами острівків підшлункової залози, а також для фундаментальних досліджень молекулярних механізмів реалізації біологічної активності HB-EGF.

У роботі вперше запропоновано використання генно-інженерних підходів на основі невірусних систем експресії транспозон-транспозаза для одержання HB-EGF у клітинах еукаріотів з подальшою можливістю застосування отриманих генетичних конструкцій для розроблення методів генної терапії низки захворювань (цукровий діабет, печінкова недостатність тощо) на тваринних моделях.

Отже, метою роботи було одержання еукаріотичних клітин-продуцентів sHB-EGF людини. Для цього необхідно було створити невірусні генетичні конструкції, використання яких забезпечувало б стабільну експресію гена sHB-EGF у клітинах еукаріотів і уможливлювало безпосереднє застосування таких конструкцій для генної терапії за експериментальних патологій тварин (цукровий діабет, токсичні ураження печінки) у майбутніх дослідженнях.

Матеріали і методи

У роботі використовували: культуральне середовище RPMI-1640 з L-глутаміном, фетальну сироватку великої рогатої худоби, пеніцилін-стрептоміцин, амфотерицин (антимікотик), G418, праймери, імідазол, живильне середовище LB (Sigma, США), $MgCl_2$, полімераза Taq, вільну від нуклеаз воду, ендонуклеази рестрикції BamHI, XhoI, HindIII, ApaI, XbaI, NcoI, NotI, ДНК-лігазу T4, лужну фосфатазу, набір для виділення ДНК, набір для виділення геномної ДНК Genomic DNA Purification Kit, ізопропіл- β -D-тіогалактопіранозид (IPTG), протеїнові маркери молекулярної маси (діапазон від 10 до 180 кДа), ДНК-маркери молекулярної маси в діапазоні від 100 до 10 000 п. н. (Fermentas, Литва), дезоксирибонуклеотидтрифосфати (dNTPs) (Amersham, США), Lipofectamine LTX (Invitrogen, USA), електроблотер Hoefer TE77 (Amersham, США) та електропоратор Eppendorf 2510 (Eppendorf, ФРН).

У дослідженнях застосовували рекомбінантну розчинну форму sHB-EGF людини, отриману нами раніше у бактерійній системі експресії [13]. Експресію та виділення рекомбінантного протеїну проводили згідно з протоколами та рекомендаціями, описаними у вищезазначеній публікації.

Генетичні конструкції *pT2/ВН* та *pCMV-SB11* були люб'язно надані prof. Perry Hackett (Addgene plasmid # 26556, # 26552) [14, 15].

Культивування клітин евкаріотів. Клітинні лінії *HEK293*, *U937*, *3T3* та *A431* отримали з банку клітинних ліній Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України. Клітини культивували за стандартних умов у культуральному середовищі RPMI-1640 з додаванням 5–10% сироватки ембріонів телят за 5% -ї концентрації CO_2 в атмосфері.

Одержання генетичної конструкції *pEF1 α -HB-EGF $\Delta_{149-208}$* та генетичних конструкцій *pT2/ВН-EF1 α* , *pT2/ВН-EF1 α -HB-EGF $\Delta_{149-208}$* на основі транспозона *pT2/ВН*. Як джерело нуклеотидної послідовності ділянки гена, що кодує HB-EGF $\Delta_{149-208}$ людини, використали κ ДНК, отриману з клітин гістоцитарної лімфоми людини *U937*. За допомогою ПЛР із застосуванням специфічної пари праймерів отримано нуклеотидну послідовність, яка кодує ген секреторної форми HB-EGF людини разом із сигнальним пептидом, що є необхідним для секреції в культуральне середовище. Генетичну конструкцію *pEF1 α -HB-EGF $\Delta_{149-208}$* було створено на основі вектора *pEGFP-N1* (Clontech, USA), де послідовність зеленого флуоресцентного протеїну (EGFP) замінено на промоторну ділянку гена фактора елонгації EF1 α . Джерелом нуклеотидної послідовності промоторної ділянки гена EF1 α слугував вектор *pcDEF3* (модифікація вектора *pcDNA3*, де промотор *CMV* замінено на промотор гена EF1 α). Таким чином, було отримано вектор *pEF1 α* , що містить усі необхідні регуляторні елементи, та ген стійкості до селективного антибіотика G418. Для проведення необхідних маніпуляцій ДНК вектора виділяли з клітин *E. coli DH10B* методом лужного лізису [16]. З метою одержання генетичної конструкції *pEF1 α -HB-EGF $\Delta_{149-208}$* вектор *pEF1 α* послідовно обробляли ендонуклеазами рестрикції HindIII та NotI і лужною фосфатазою. Отриману в ході проведення ПЛР послідовність гена, що кодує HB-EGF $\Delta_{149-208}$, обробляли відповідними рестриктазами для подальшого об'єднання з векторною ДНК. Лінійну послідовність вектора та послідовність гена, що кодує HB-EGF $\Delta_{149-208}$, об'єднували в єдину генетичну конструкцію за допомогою ДНК-лігази фага T4. Клонування виконували за «липкими» кінцями. Усі вищезазначені маніпуляції з ДНК здійснювали, дотримуючись рекомендацій виробника. Клітини *E. coli* штаму *DH10B* трансформували отри-

маною генетичною конструкцією *pEF1 α -HB-EGF $\Delta_{149-208}$* за методом електропорації [17] з наступним висіванням на тверде живильне середовище LB (триптон — 10 г/л, дріжджового екстракту — 5 г/л, NaCl — 10 г/л, агару — 15 г/л), що містило як селективний антибіотик 0,005% -й канаміцин. Одержані після описаних маніпуляцій колонії перевіряли на наявність нуклеотидної послідовності вставки гена *HB-EGF $\Delta_{149-208}$* у складі вектора за допомогою ПЛР із використанням специфічної пари праймерів. Під час проведення ПЛР 25 мкл суміші містили: 0,6 мМ кожного з праймерів, 0,2 мМ кожного з dNTP, 0,8 мМ MgCl_2 , 1x буфер для Taq-полімерази, 1 одиницю активності Taq-полімерази. Продукти ПЛР аналізували в 1% -му агарозному гелі. Результатом цієї маніпуляції був ПЛР-продукт, що містив нуклеотидну послідовність *HB-EGF $\Delta_{149-208}$* . Колонії, що містили вектор *pEF1 α* , у складі якого є ген *HB-EGF $\Delta_{149-208}$* , нарощували в рідкому живильному середовищі з додаванням селективного антибіотика й далі використовували для напрацювання генетичної конструкції *pEF1 α -HB-EGF $\Delta_{149-208}$* у кількостях, достатніх для подальшої трансфекції клітин евкаріотів.

Дослідження функціональної активності системи транспозонів *pT2/ВН-EF1 α -HB-EGF $\Delta_{149-208}$* (транспозон) та *pCMV-SB11* (транспозаза) *in vivo*. Дослідження проводили на мишах лінії Balb/c. ДНК вводили в організм тварин шляхом гідродинамічних ін'єкцій ДНК у розчині Рінгера (кількість рідини дорівнювала 10% від загальної маси тіла) у хвостову вену з розрахунку 25 мкг ДНК транспозона та 1,5 мкг ДНК транспозази на тварину. Контрольним тваринам вводили лише ДНК транспозона. Через 72 год тварин забивали. Аналіз наявності транспозона, що несе ген *HB-EGF $\Delta_{149-208}$* у клітинах печінки тварин, здійснювали шляхом ПЛР-ампліфікації маркерних ділянок «залишкової ДНК» транспозона (ДНК, що утворюється після вищеплення цільового гена транспозазою) із геномної ДНК клітин печінки. Для проведення ПЛР використовували пару праймерів: 5'—CTGGAACAACAACCTCAACCCCT—3' та 5'—CACACAGGAAACAGCTATGA—3'. Геномну ДНК виділяли, застосовуючи набір Genomic DNA Purification Kit. Усі маніпуляції виконували згідно з рекомендаціями виробника.

Для зворотного вищеплення «корової» частини транспозона геномну ДНК обробляли ендонуклеазами рестрикції HindIII, ApaI та XbaI з наступним самолігуванням.

Отриманою сумішшю трансформували компетентні клітини *E. coli* штаму *DH10B*, висіваючи далі на селективне середовище (ген стійкості до антибіотика містився в «коровій» ДНК).

Трансфекція клітин евкаріотів. Трансфекцію клітин проводили за умов 70% -ї конфлюентності на наступний день після пересіву клітин. Як трансфікувальний реагент було використано катіонний полімер поліетиленімін (PEI). Готували трансфікувальну суміш: плазмідну ДНК розчиняли у безсироватковому середовищі RPMI, потім розчин плазмідної ДНК змішували з розчином PEI (1 мкг/мкл) та інкубували 15 хв за кімнатної температури. Середовище в клітинах замінювали на свіже і додавали трансфікувальну суміш. Клітини інкубували протягом 5–6 год, відмивали забуференим фосфатним розчином (ЗФР), додавали повне свіже середовище. Через 2 доби до клітин додавали селективний антибіотик неоміцин G418 з розрахунку від 0,3 до 0,5 мг/мл залежно від типу клітин. Наступні 7–10 діб спостерігали масову загибель нетрансфікованих клітин. Після такого періоду селекції поодинокі трансфіковані клітини росли на чашці Петрі впродовж 2–3 тижнів до моменту утворення поодиноких колоній. Відбір окремих клонів здійснювали з використанням колодазів. Окремі колонії переносили в лунки 24-лункового планшета, далі пересівали на чашки Петрі. Підтримувальна концентрація G418 становила від 0,2 до 0,4 мг/мл.

Електрофорез протеїнів у ПААГ. Електрофорез протеїнів проводили у блоках 10%-го поліакриламідного гелю за присутності ДСН у трис-трипсиновій буферній системі. Для електрофоретичного розділення наносили 100 мг протеїнів клітинного та 20 мл кондиційованого лізатів культурального середовища протягом 2 діб. Електрофорез проводили за сили струму 25 мА на пластину та напруги 100 В протягом 2 год. Отримані гелі використовували для наступного імуноблот-аналізу. Для визначення молекулярної маси протеїнів застосовували маркери молекулярної маси.

Отримання імунної сироватки мишей проти sHB-EGF людини. Імунізацію мишей лінії Balb/c здійснювали одержаним раніше рекомбінантним аналогом sHB-EGF людини з використанням повного й неповного ад'юванту Фрейнда [18].

Вестерн-блот-аналіз. В основу методу покладено перенесення протеїнів в електричному полі з ПААГ на нітроцелюлозну мембрану з наступним обробленням отриманих блотів

антитілами. Протеїнові зони, з якими зв'язувались антитіла, виявляли за допомогою підсиленої хемілюмінесценції (ECL-детекція).

Протеїни після розділення в ПААГ переносили на нітроцелюлозну мембрану (Amersham Hybond-ECL — GE Healthcare). Процедура проводили протягом 3 год за сили струму 250 мА у буфері, що містив: 25 мМ трис-HCl, pH 8,3, 20% -й метанол, 192 мМ гліцин. Вільні центри зв'язування на мембрані блокували протягом 1 год 5% -м сухим знежиреним молоком у ЗФРТ (ЗФР, 1% -й Твін-20). Мембрану інкубували з першими антитілами у блокувальному буфері упродовж ночі за 4 °C з наступним промиванням блокувальним буфером 3 рази по 10 хв. Як другі антитіла застосовували антитіла кози проти Fc-фрагментів імуноглобулінів миші (розведення 1:30 000), кон'юговані з пероксидазою хрому. Інкубацію з другими антитілами проводили за кімнатної температури протягом 1 год, після чого мембрану відмивали ЗФРТ 3 рази по 10 хв. Для імуноблот-аналізу культурального середовища клітин-продуцентів використовували поліклональні антитіла до рекомбінантного аналогу розчинної форми sHB-EGF людини, виділеної із клітин-продуцентів *E. coli*. Для аналізу брали однакову кількість середовища, отриманого під час культивування однакової кількості клітин.

Для візуалізації результатів імуноблотингу застосовували метод підсиленої хемілюмінесценції. Мембрану експонували на рентгенівській плівці (Kodak, Китай). Час експозиції оброблених мембран на рентгенівській плівці залежав від інтенсивності хемілюмінесценції і тривав 5–30 хв. Плівки проявляли у стандартному фенідонгідрокіноновому проявнику та фіксували кислим фіксажем.

Результати та обговорення

Отримання генетичної конструкції pEF1α-HB-EGFΔ₁₄₉₋₂₀₈ і генетичних конструкцій pT2/BH-EF1α та pT2/BH-EF1α-HB-EGFΔ₁₄₉₋₂₀₈ на основі транспозона pT2/BH. Використана в роботі система транспозонів Sleeping Beauty (SB) є двокомпонентною системою, що складається із транспозази SB та певної специфічної нуклеотидної послідовності (IR/DR, inverted repeat/direct repeat) у складі транспозона (pT2/BH), за допомогою якої відбувається цілеспрямована інтеграція нуклеотидної послідовності певного гена в місцях ТА-повторів у структурі генома клітини. Транспозаза, що входить до

складу системи, здатна забезпечувати інтеграцію цільової нуклеотидної послідовності певного гена за рахунок повторів IR/DR, що її фланкують, забезпечуючи довготривалу експресію цільового гена [14]. Схематично роботу системи зображено на рис. 1.



Рис. 1. Схематичне зображення принципу дії системи транспозонів Sleeping beauty

У роботі використано систему транспозонів *pCMV-SB11* та *pT2/BH*, де *pCMV-SB11* — вектор, що забезпечує експресію транспозази Sleeping Beauty, а *pT2/BH* — вектор, що містить специфічні нуклеотидні послідовності (IR/DR, inverted repeat/direct repeat), які розпізнаються транспозазою, і це забезпечує їх послідовне «вирізання» та інтеграцію в геном у місцях ТА-повторів. При цьому утворюється «залишкова» ДНК транспозона та «основна» частина, яка несе специфічну нуклеотидну послідовність цільового гена і безпосередньо інтегрується в геном (рис. 2). Оскільки інтеграція відбувається випадково і може мати різну ефективність (кількість інтегрованих копій), це може певним чином впливати на рівень експресії цільового гена у клітині. Проте безумовними перевагами такого підходу є стабільна й довготривала експресія цільового гена, а також можливість використання отриманих генетичних конструкцій для досліджень *in vivo*. Адже система є повністю сумісною з живим організмом і може виступати як альтернатива вірусних систем експресії.

На початкових етапах роботи було одержано генетичну конструкцію *pEF1α-HB-EGFΔ₁₄₉₋₂₀₈*, що несе в собі вставку гена, яка кодує секреторну форму HB-EGF (разом із сигнальним пептидом, проте позбавлену юкстамембранного, трансмембранного та цитоплазматичного доменів *HB-EGFΔ₁₄₉₋₂₀₈*)

і міститься в єдиній рамці зчитування із промоторною ділянкою евкаріотичного фактора елонгації *EF1α* (рис. 3, 4). Колонії бактеріальних клітин, що несли в собі генетичну конструкцію *pEF1α-HB-EGFΔ₁₄₉₋₂₀₈*, були згодом використані для її напрацювання, перевірки на наявність цільової нуклеотидної послідовності *HB-EGFΔ₁₄₉₋₂₀₈*, а також як джерело об'єднаної в єдину рамку зчитування нуклеотидної послідовності *HB-EGFΔ₁₄₉₋₂₀₈* та промоторної ділянки *EF1α* для подальшого субклонування у вектор *pT2/BH*.

Генетичну конструкцію *pEF1α-HB-EGFΔ₁₄₉₋₂₀₈* отримали на основі вектора *pEF1α* й перевірили на наявність специфічної нуклеотидної послідовності *HB-EGFΔ₁₄₉₋₂₀₈* шляхом проведення рестриктного аналізу з використанням ендонуклеази рестрикції *NcoI* (рис. 4). Наявність фрагмента ДНК розміром ≈ 700 п. н. вказує на присутність у складі *pEF1α* нуклеотидної послідовності *HB-EGFΔ₁₄₉₋₂₀₈*. Таким чином, було одержано й перевірено генетичну конструкцію *pEF1α-HB-EGFΔ₁₄₉₋₂₀₈*, яку далі використано для отримання транспозона на основі вектора *pT2/BH*.

З метою одержання генетичної конструкції транспозона обидва вектори, *pEF1α-HB-EGFΔ₁₄₉₋₂₀₈* та *pT2/BH*, обробляли ендонуклеазою рестрикції *HindIII* з подальшим лігуванням (рис. 5). Отриманою сумішшю трансформували компетентні клітини *E. coli DH10B* з подальшим висіванням на живильне селективне середовище. Слід зазначити, що оскільки обидва плазмідні вектори несуть у своїй структурі точку початку реплікації — оріджин (Ori), у разі їх поєднання в єдину генетичну конструкцію має утворюватися генетична конструкція, не здатна реплі-

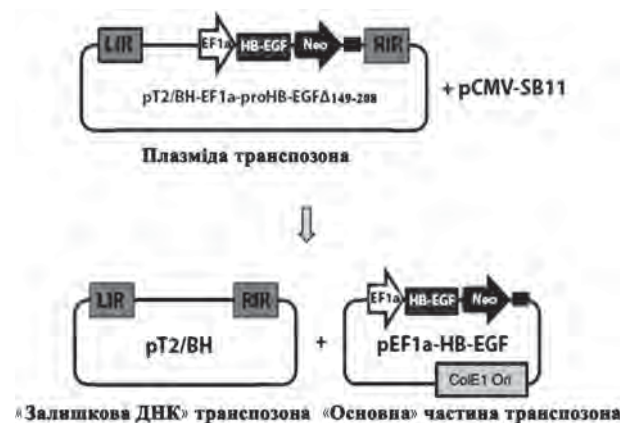


Рис. 2. Схематичне зображення функціонування системи транспозон-транспозаза на основі отриманої генетичної конструкції *pT2/BH-EF1α-HB-EGFΔ₁₄₉₋₂₀₈*

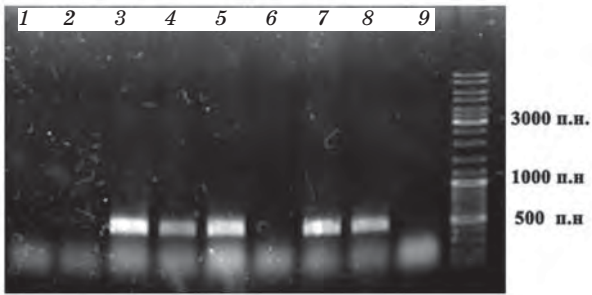


Рис. 3. Результати ПЛР-аналізу бактерій *E. coli* DH10B, проведеного з використанням специфічної пари праймерів, які фланкують ген HB-EGF $\Delta_{149-208}$ і дають змогу одержувати ПЛР-продукт (≈ 500 п. н.), що вказує на наявність цільової нуклеотидної послідовності (гена HB-EGF $\Delta_{149-208}$) у складі вектора pEF1 α : колонії 3–5 та 7, 8 несуть у собі цільову нуклеотидну послідовність гена HB-EGF $\Delta_{149-208}$ у складі вектора pEF1 α

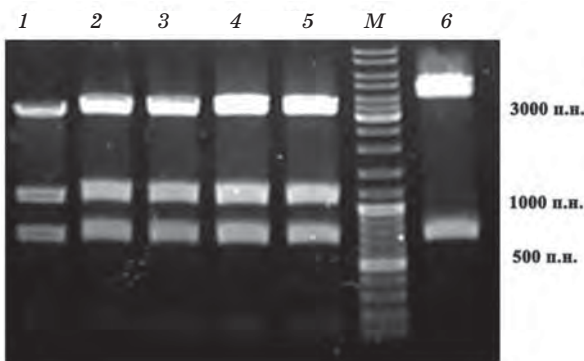


Рис. 4. Рестрикційний аналіз плазмідного вектора pEF1 α -HB-EGF $\Delta_{149-208}$ на наявність специфічної нуклеотидної послідовності гена HB-EGF $\Delta_{149-208}$ за допомогою ендонуклеази рестрикції NcoI:

1–5 — генетична конструкція pEF1 α -HB-EGF $\Delta_{149-208}$, гідролізована ендонуклеазою рестрикції NcoI після виділення з попередньо відібраних колоній *E. coli*; M — маркери молекулярної маси (пар нуклеотидів); 6 — вектор pEF1 α , що не несе цільової нуклеотидної послідовності гена HB-EGF $\Delta_{149-208}$

куватись усередині бактеріальних клітин через внутрішню конкуренцію кожного з двох оріджинів. Тому було проведено попередній етап, що передбачав видалення ділянки, яка відповідає оріджину pT2/BH, з наступним самолігуванням (дані не наведено).

У результаті трансформації електрокомпетентних клітин *E. coli* DH10B з подальшим висіванням на селективне живильне середовище було отримано транспозон pT2/BH-EF1 α -HB-EGF $\Delta_{149-208}$, що мав здатність реплікуватись у клітинах та забезпечувати стійкість до селективного антибіотика — канаміцину (рис. 6).

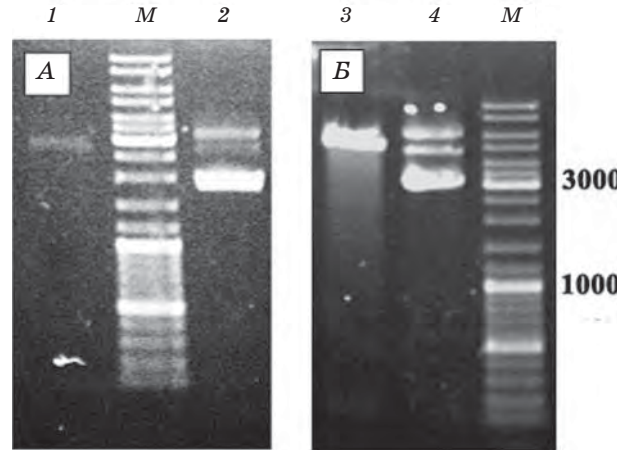


Рис. 5. Електрофореграми плазмідних векторів pT2/BH (А) та pEF1 α -HB-EGF $\Delta_{149-208}$ (Б), гідролізованих ендонуклеазою рестрикції HindIII:

1, 3 — гідролізований вектор;
2, 4 — не гідролізований вектор;
M — маркери молекулярної маси (пар нуклеотидів)

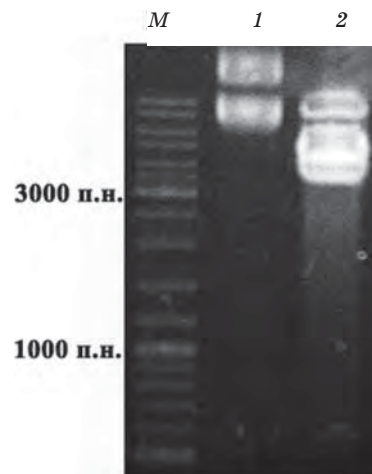


Рис. 6. Електрофореграма отриманого плазмідного вектора pEF1 α -HB-EGF $\Delta_{149-208}$ (2) і транспозона pT2/BH-EF1 α -HB-EGF $\Delta_{149-208}$ (1): M — маркери молекулярної маси (пар нуклеотидів)

Дослідження здатності системи транспозонів pT2/BH-EF1 α -HB-EGF $\Delta_{149-208}$ (транспозон) та pCMV-SB11 (транспозаза) спричинювати інтеграцію цільового гена, що кодує секреторну форму HB-EGF людини, в геном миші. Наступним етапом роботи була перевірка здатності одержаного транспозона pT2/BH-EF1 α -HB-EGF $\Delta_{149-208}$ забезпечувати інтеграцію гена HB-EGF людини в геном еукаріотичних клітин за участю транспозази SB11. Для перевірки роботи системи транспозонів існують два підходи: такий, що базується на детектуванні «залишкової»

ДНК транспозона (рис. 2), та/або який ґрунтується на зворотному «вищепленні» «основної» ДНК транспозона, інтегрованої в геном.

У наших дослідженнях ми використали 2 експериментальні групи мишей лінії Balb/c (по 4 тварини) та одну інтактну (2 тварини). Експериментальним тваринам шляхом гідродинамічних ін'єкцій у хвостову вену вводили необхідну кількість ДНК-вектора транспозона (І група) або ДНК-вектора транспозона разом із ДНК-вектором транспозази (ІІ група) у розчині Рінгера. Інтактним тваринам вводили відповідний об'єм розчину Рінгера (ІІІ група). Через 72 год тварин забивали і проводили забір проб печінки для подальшого виділення геномної ДНК, яку використовували для аналізу роботи системи транспозонів.

Дослідження здатності системи транспозонів *pT2/BH-EF1 α -HB-EGF $\Delta_{149-208}$* (транспозон) та *pCMV-SB11* (транспозаза) спричинювати інтеграцію цільового гена, що кодує секреторну форму HB-EGF людини, у геном миші, виходячи з наявності «залишкової ДНК» транспозона. Метод оцінювання роботи системи транспозонів з урахуванням наявності «залишкової ДНК» транспозона базується на проведенні ПЛР з використанням специфічної пари праймерів, що фланкують регіон із цільовою нуклеотидною по-



Рис. 7. Схематичне зображення методу оцінювання здатності системи транспозонів спричинювати інтеграцію цільового гена в геном з урахуванням наявності у клітинах «залишкової ДНК» транспозона та/або ампліфікації залишкового ПЛР-продукту

слідовністю всередині транспозона. Зазвичай розмір такої ділянки є достатньо великим (від 1 000 п. н.). Однак у разі інтеграції цільової нуклеотидної послідовності в геном із подальшою репарацією «залишкової» ДНК транспозона стає можливою ампліфікація невеликої за розміром ділянки ДНК так званого «залишкового» ПЛР-продукту (рис. 7). Наявність такого ПЛР-продукту дає змогу визначити, чи відбулась інтеграція цільової нуклеотидної послідовності ДНК у геном, чи ні.

Таким чином, геномну ДНК із печінки інтактних та експериментальних тварин було використано для оцінювання функціональної активності системи транспозонів детектуванням «залишкового» ПЛР-продукту. У результаті проведення ампліфікації виявлено продукт ПЛР необхідної молекулярної маси (≈ 450 п. н.) лише у тварин групи ІІ (рис. 8), що є свідченням утворення «залишкової» ДНК транспозона внаслідок інтеграції цільової нуклеотидної послідовності в геном.

Дослідження здатності системи транспозонів *pT2/BH-EF1 α -HB-EGF $\Delta_{149-208}$* (транспозон) та *pCMV-SB11* (транспозаза) спричинювати інтеграцію цільового гена, що кодує секреторну форму HB-EGF людини, у геном миші зворотним вищепленням «основної» ДНК. Метод оцінювання роботи системи транспозонів зворотним вищепленням «корової» ДНК базується на обробленні геномної ДНК відповідними ендонуклеазами рестрикції з наступним самолігуванням. Отриману суміш фрагментів геномної ДНК використовують для трансформації клітин *E. coli DH10B* з подальшим висіванням на селективне живильне середовище. У результаті утворюються колонії клітин, що несуть репаровану «основну» частину транспозона.

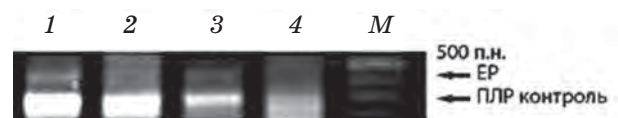


Рис. 8. Електрофореграма ПЛР-продуктів після ампліфікації «залишкової ДНК» транспозона з геномної ДНК печінки мишей:

- 1, 3 — тварини, яким вводили ДНК системи транспозонів *pT2/BH-EF1 α -HB-EGF $\Delta_{149-208}$* (транспозон) та *pCMV-SB11* (транспозаза);
 2, 4 — тварини, яким вводили ДНК лише транспозона *pT2/BH-EF1 α -HB-EGF $\Delta_{149-208}$* ;
 EP — «залишковий» ПЛР-продукт;
 ПЛР контроль — ПЛР-продукт фрагмента гена β -глюкоронідази;
 M — маркери молекулярної маси (пар нуклеотидів)

Так, у результаті трансформації клітин *E. coli* DH10В геномною ДНК з печінки мишей групи II, обробленої ендонуклеазами рестрикції *HindIII*, *ApaLI* та *XbaI* з подальшим самолігуванням, утворювалися колонії, що мали здатність рости на селективному середовищі (ген стійкості до антибіотика несе «основна» частина транспозона). Відповідно у разі групи I можна було детектувати лише поодинокі колонії (рис. 9).

Надалі було обрано декілька випадкових колоній бактеріальних клітин, що утворилися за трансформації геномною ДНК миші з групи II, для подальшого виділення плазмідної ДНК. Електрофоретичне розділення виділеної плазмідної ДНК свідчить про зниження молекулярної маси векторів, що наближалася до вектора *pEF1 α -HB-EGF Δ ₁₄₉₋₂₀₈* і була значно нижчою за молекулярну масу вихідного транспозона (рис. 10).

Отримані результати свідчать про здатність системи транспозонів *pT2/BH-EF1 α -HB-EGF Δ ₁₄₉₋₂₀₈* (транспозон) та *pCMV-SB11* (транспозаза) спричинювати інтеграцію цільового гена, що кодує секреторну форму HB-EGF людини, у геном клітин печінки миші.

Одержання еукаріотичних клітин-продукентів секреторної форми HB-EGF людини на основі клітинної лінії HEK293. З метою отримання еукаріотичних клітин-продукентів рекомбінантної секреторної форми sHB-EGF людини було використано клітинну

лінію HEK293, що була трансфікована системою транспозонів з подальшим проведенням процедури селекції для одержання окремих клонів клітин. Для порівняння використовували клітини, трансфіковані лише ДНК транспозона.

Оскільки створена генетична конструкція *pT2/BH-EF1 α -HB-EGF Δ ₁₄₉₋₂₀₈* дає змогу експресувати рекомбінантний sHB-EGF у культуральне середовище, для аналізу його продукції застосували культуральне середовище після культивування окремих клонів клітин. Детектування наявності sHB-EGF у культуральному середовищі еукаріотичних клітин-продукентів проводили за допомогою вестерн-блот-аналізу з використанням імунної поліклональної сироватки мишей, імунізованих рекомбінантним sHB-EGF, який було експресовано у клітинах *E. coli* Rosetta DE3. Результати вестерн-блот-аналізу засвідчили наявність цільового протеїнового продукту в культуральному середовищі клітин, трансфікованих системою транспозонів. Натомість рівень продукції цільового протеїнового продукту був значно нижчим за умов трансфікування клітин лише ДНК транспозона (рис. 11).

Отже, в результаті проведеної роботи було отримано еукаріотичні клітини-продукенти рекомбінантного аналога секреторної форми гепаринзв'язувального фактора росту людини sHB-EGF на основі лінії HEK293.

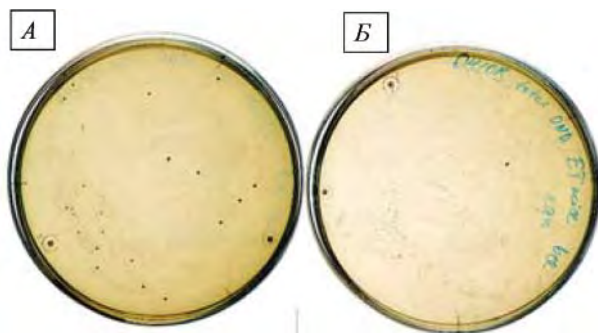


Рис. 9. Фотографічне зображення типового результату тесту зі зворотним вищепленням «корової» ДНК:

- А — колонії клітин *E. coli* DH10В після трансформації геномною ДНК з печінки миші групи II, обробленої ендонуклеазами рестрикції *HindIII*, *ApaLI*, *XbaI* з подальшим самолігуванням;
Б — колонії клітин *E. coli* DH10В після трансформації геномною ДНК з печінки миші групи I, обробленої ендонуклеазами рестрикції *HindIII*, *ApaLI*, *XbaI* з подальшим самолігуванням

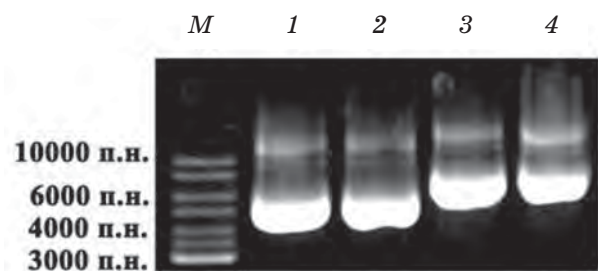


Рис. 10. Результати тесту зі зворотним вищепленням «корової» ДНК:

- М — маркери молекулярної маси (пар нуклеотидів);
1, 2 — плазмідна ДНК, виділена з двох випадкових колоній клітин *E. coli* DH10В після трансформації геномною ДНК з печінки миші за ін'єкції системи транспозонів *pT2/BH-EF1 α -HB-EGF Δ ₁₄₉₋₂₀₈* (транспозон) та *pCMV-SB11* (транспозаза);
3, 4 — плазмідна ДНК транспозона *pT2/BH-EF1 α -HB-EGF Δ ₁₄₉₋₂₀₈*

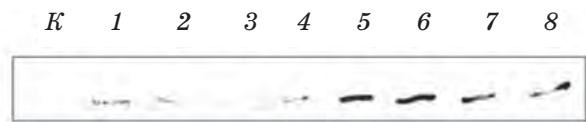


Рис. 11. Вестерн-блот-аналіз вмісту рекомбінантної секреторної форми sHB-EGF людини в культуральному середовищі клітин HEK293:

- K — контроль (клітин, які не трансфікували);
 1–4 — культуральне середовище клонів клітин, трансфікованих генетичною конструкцією pT2/BH-EF1α-HB-EGF Δ ₁₄₉₋₂₀₈ (без додавання транспозази);
 5–8 — культуральне середовище клонів клітин, котрансфікованих системою транспозонів pT2/BH-EF1α-HB-EGF Δ ₁₄₉₋₂₀₈ (транспозон) та pCMV-SB11 (транспозаза)

REFERENCES

- Higashiyama S., Abraham J. A., Miller J., Fiddes J. C., Klagsbrun M. A heparin-binding growth factor secreted by macrophage-like cells that is related to EGF. *Science*. 1991, 251(251), 936–939. doi:10.1126/science.1840698
- Raab G., Klagsbrun M. Heparin-binding EGF-like growth factor. *Biochimica et biophysica acta*. 1997, 1333(3): F179–199. doi:10.1016/S0304-419X(97)00024-3
- Higashiyama S., Nanba D. ADAM-mediated ectodomain shedding of HB-EGF in receptor cross-talk. *Biochim Biophys Acta*. 2005, 1751(1), 110–117. doi:10.1016/j.bbapap.2004.11.009
- Hieda M., Isokane M., Koizumi M., Higashi C., Tachibana T., Shudou M., Taguchi T., Hieda Y., Higashiyama S. Membrane-anchored growth factor, HB-EGF, on the cell surface targeted to the inner nuclear membrane. *The Journal of Cell Biology*. 2008, 180(4), 763–769. doi:10.1083/jcb.200710022
- Higashiyama S., Iwabuki H., Morimoto C., Hieda M., Inoue H., Matsushita N. Membrane-anchored growth factors, the epidermal growth factor family: beyond receptor ligands. *Cancer Science*. 2008, 99(2), 214–220. doi:10.1111/j.1349-7006.2007.00676.x.
- Harris R. C., Chung E., Coffey R. J. EGF receptor ligands. *Experimental cell research*. 2003, 284(1), 2–13. doi:10.1016/S0014-4827(02)00105-2
- Naglich J., Metherall E., Russell D., Eidels L. Expression cloning of a diphtheria toxin receptor: identity with a heparin-binding EGF-like growth factor precursor. *Cell*. 1992, 69(6), 1051–1061. doi:10.1016/0092-8674(92)90623-K
- Shirakata Y., Kimura R., Nanba D., Iwamoto R., Tokumaru S., Morimoto C., Yokota K., Nakamura M., Sayama K., Mekada E., Higashiyama S., Hashimoto K. Heparin-binding EGF-like growth factor accelerates keratinocyte migration and skin wound healing. *Journal of Cell Science*. 2005, 118(11), 2363–2370. doi:10.1242/jcs.02346
- Singh B., Tsukada T., Zent R., Harris C. Membrane-associated HB-EGF modulates HGF-induced cellular responses in MDCK cells. *Journal of Cell Science*. 2004, 117(8), 1365–1379. doi:10.1242/jcs.01037
- Zarrouki B., Benterki I., Fontès G., Peyot M., Seda O., Prentki M., Poitout V. Epidermal growth factor receptor signaling promotes pancreatic β -cell proliferation in response to nutrient excess in rats through mTOR and FOXM1. *Diabetes*. 2014, 63(3), 982–993. doi:10.2337/db13-0425
- Kozawa J., Tokui Y., Moriwaki M., Li M., Ohmoto H., Yuan M., Zhang J., Iwahashi H., Imagawa A., Yamagata K., Tochino Y., Shimomura I., Higashiyama S., Miyagawa J. Regenerative and therapeutic effects of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor on diabetes by gene transduction through retrograde pancreatic duct injection of adenovirus vector. *Pancreas*. 2005, 31(1), 32–42. doi:10.1097/01.mpa.0000163177.59920.f8
- Kiso S., Kawata S., Tamura S., Inui Y., Yoshida Y., Sawai Y., Umeki S., Ito N., Yamada A., Miyagawa J., Higashiyama S., Iwawaki T., Saito M., Taniguchi N., Matsuzawa Y., Kohno K. Liver regeneration in heparin-binding EGF-like growth factor transgenic mice after partial hepatectomy. *Gastroenterology*. 2003, 124(3), 701–707. doi:10.1053/gast.2003.50097
- Korotkevych N. V., Kolybo D. V., Labyntsev A. Yu., Romaniuk S. I., Komisarenko S. V. Obtaining of recombinant human heparin-binding EGF-like growth factor and perspectives of its application in biotechnology. *Biotechnologia*. 2010, 3(4), 44–54. (In Ukrainian).

Для одержання генетичних конструкцій, що кодують ген sHB-EGF для експресії в клітинах евкаріотів, було використано новітній генно-інженерний підхід із застосуванням невірусної системи експресії на основі транспозонів. Експерименти на мишах також виявили можливість застосування отриманих генетичних конструкцій для досліджень *in vivo*, спрямованих на розроблення підходів до застосування sHB-EGF у терапії різноманітних патологічних станів.

Роботу частково виконано за рахунок гранту Президента України докторам наук для здійснення наукових досліджень, Проект № Ф50/059 «Одержання рекомбінантного аналога гепаринзв'язувального ростового фактора в клітинах евкаріотів».

14. Aronovich E., McIvor R., Hackett P. The Sleeping Beauty transposon system: a non-viral vector for gene therapy. *Human Molecular Genetics*. 2011, 20(R1), R14–R20. doi: 10.1093/hmg/ddr140
15. Bell J., Podetz-Pedersen K., Aronovich E., Belur L., McIvor S., Hackett P. Preferential delivery of the Sleeping Beauty transposon system to livers of mice by hydrodynamic injection. *Nature protocols*. 2007, 2(12), 3153–3165. doi: 10.1038/nprot.2007.471
16. Green M., Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual. N.-Y.: Cold Spring Harbor Laboratory. 2012, 726 p.
17. Dower J., Miller F., Ragsdale W. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research*. 1988, 16(13), 6127–6145.
18. Harlow E., Lane D. Antibodies: a laboratory manual. N.-Y.: Cold Spring Harbor Laboratory. 1988, 720 p.

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО АНАЛОГА SHB-EGF ЧЕЛОВЕКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ТРАНСПОЗОН–ТРАНСПОЗАЗА

Н. В. Короткевич
А. Ю. Лабынцев
Д. В. Колибо
С. В. Комисаренко

Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины,
Киев

E-mail: gnr.nata@gmail.com

Целью работы было получение рекомбинантного аналога растворимой формы гепаринсвязывающего EGF-подобного ростового фактора sHB-EGF в клетках эукариот с использованием генетической системы на основе транспозонов. Использованы методы рекомбинантных ДНК и получения эукариотических клеток-продуцентов рекомбинантных протеинов. В результате были получены эукариотические клетки-продуценты рекомбинантного аналога секреторной формы гепаринсвязывающего фактора роста человека sHB-EGF на основе линии HEK293. Для получения генетических конструкций, кодирующих ген sHB-EGF, применяли невирусную систему экспрессии на основе транспозонов. Эксперименты на мышах показали возможность использования полученных генетических конструкций для поиска подходов применения sHB-EGF в генной терапии разнообразных патологических состояний.

Ключевые слова: гепаринсвязывающий фактор роста человека HB-EGF, транспозаза, рекомбинантные протеины, ростовые факторы.

OBTAINING OF RECOMBINANT ANALOGUE OF HUMAN SHB-EGF BY TRANSPOSON–TRANSPOSASE GENETIC SYSTEM

N. V. Korotkevych
A. Yu. Labyntsev
D. V. Kolybo
S. V. Komisarenko

Palladin Institute of Biochemistry
of the National Academy of Sciences of Ukraine,
Kyiv

E-mail: gnr.nata@gmail.com

The goal of work was obtaining of recombinant soluble form of heparin-binding EGF-like growth factor sHB-EGF in eukaryotic cells based on transposon genetic system. We used methods of recombinant DNA and obtaining of eukaryotic cells for producing of recombinant proteins. We have obtained stable eukaryotic producer of recombinant analogue of soluble form of human heparin-binding EGF-like growth factor sHB-EGF based on HEK293 cells. We used transposon based non-viral expression system for sHB-EGF expression. Moreover, studies in mice have shown the possibility of using sHB-EGF expressing genetic constructs for gene therapy of various pathological conditions.

Key words: heparin-binding EGF-like growth factor HB-EGF, transposase, recombinant proteins, growth factors.