



УДК 577.214.622

ЭКСПРЕССИЯ СИНТЕТИЧЕСКОГО ГЕНА АНГИОГЕНИНА ЧЕЛОВЕКА В СОСТАВЕ ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ

© 1995 г. Н. А. Нетесова[#], В. С. Петров, Н. В. Чешенко, Н. А. Чикаев*,
Э. Г. Малыгин, Н. П. Мертвецов*

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии "Вектор" –
Институт молекулярной биологии, 633159, пос. Кольцово Новосибирской обл.;

*Институт биоорганической химии СО РАН, 630090, Новосибирск

Поступила в редакцию 10.06.94 г. После доработки 03.10.94 г.

Ген ангиогенина человека клонирован в составе генома вируса осповакцины. Получен рекомбинантный вирус, экспрессирующий ангиогенин. Уровень синтеза белка, направляемого рекомбинантным вирусом, анализировали реакцией иммуноблотинга с моноклональными антителами к ангиогенину человека.

Ключевые слова: ангиогенин, клонирование, вирус осповакцины, экспрессия.

Ангиогенин человека является фактором роста, вызывающим пролиферацию эндотелия капилляров и, как следствие, рост кровеносных сосудов [1, 2]. Совокупность литературных данных позволяет рассматривать ангиогенин как препарат, весьма перспективный для обработки ран, ожогов, язв, а также сердечно-сосудистых патологий, лечение которых остается весьма серьезной проблемой [2].

Крайне низкое содержание ангиогенина в природных тканях, возможно, обусловлено мощной функциональной активностью этого белка, поэтому история определения его аминокислотной последовательности была достаточно трудной, но имела успешное завершение. Применение наиболее высокоэффективных методик позволило установить его полную первичную структуру [3]. Было также показано, что ангиогенин не содержит углеводной части, т.е. не является гликопротеином [4].

Изучение регуляции экспрессии и механизмов действия ангиогенина, равно как и возможностей его медицинского использования, сдерживается незначительным количеством этого белка в природных источниках. Отсюда естественны попытки получения его генно-инженерных продуцентов. Здесь имели место как успешные эксперименты, позволившие путем направленных мутаций получить усиление ангиогенной активности [5], так и эксперименты, которые, несмотря на их внешнюю безупречность, не дали ожидаемых результатов [6].

До сих пор экспрессию гена ангиогенина пытались реализовать в *E. coli*, основываясь на том, что этот белок не требует гликозилирования для проявления функциональной активности [4]. В этом контексте необходимо отметить, что в бактериальных системах экспрессии ангиогенин продуцировался в виде химерного белка и соответственно имел на N-конце довесок, состоящий из бактериальных аминокислот, что, возможно, является причиной снижения его функциональной активности. С учетом данного обстоятельства основной целью нашего исследования было получение рекомбинантного продуцента, обеспечивающего биосинтез ангиогенина в чистом виде. В качестве экспрессирующего вектора был использован вирус осповакцины, который имеет ряд преимуществ перед бактериальными векторами, так как при его использовании процессы модификации аминокислотной цепи и способ укладки продуцируемого белка проходят по эукариотическому типу и дополнительно к этому продуцируемый белок должен быть наиболее близок к природному аналогу за счет отсутствия бактериальных аминокислот на N-конце.

В настоящей работе клонировали синтетический ген ангиогенина человека, ранее экспрессированный в *E. coli* [6, 7] в составе эукариотического вектора на основе вируса осповакцины. Экспрессия такого варианта гена в *E. coli* привела к получению белка, обладающего сравнительно небольшой ангиогениновой активностью [6]. Используя в качестве вектора вирус осповакцины, способный к множественным модификациям синтезируемых белков, можно сопоставить

[#] Автор для переписки.

ангиогениновую активность продуктов экспрессии гена ангиогенина в составе *E. coli* и в этой системе, а также выявить ограничения, накладываемые системой *E. coli* на функциональную активность синтезируемого ангиогенина.

Представляемая работа является начальным этапом в решении данной задачи и посвящена клонированию гена ангиогенина человека в составе генома вируса осповакцины и получению рекомбинантного вируса, направляющего синтез ангиогенина.

В настоящей работе ген ангиогенина клонировали в составе плазмиды pVAR 15, несущей последовательность гена тимидинкиназы и промотор p7.5K вируса осповакцины [8] (см. схему). Чужеродный ген встраивали по уникальному сайту рестрикции *Sma*I, находящемуся в полилинкере векторной плазмиды.

ДНК фага M13 со встроенным геном ангиогенина (M13 Ang) гидролизовали рестриктазами *Eco*RI и *Hind*III. Незаполненные 3'-концы ДНК достраивали фрагментом Кленова в присутствии четырех dNTP в концентрации 1 мМ, затем с помощью препаративного электрофореза в 5% ПААГ выделяли фрагмент ДНК размером 410 п. о. После этого линейаризованную эндонуклеазой *Sma*I векторную плазмиду pVAR 15 обрабатывали в присутствии пятикратного молярного избытка клонируемого фрагмента ДНК-лигазой фага T4.

Для исключения фона исходных кольцевых плазмид pVAR 15, образующихся при такой обработке, реакционную смесь гидролизовали эндонуклеазой *Sma*I и полученным препаратом трансформировали клетки *E. coli* штамма JM 103. Рестрикционным анализом отбирали клоны *E. coli*, содержащие рекомбинантные плазмиды. Ориентацию встроенного фрагмента также определяли рестрикционным анализом.

На следующем этапе ген ангиогенина встроили в тимидинкиназную область вируса осповакцины. При проведении трансфекции применяли кальцийфосфатный метод с последующей селекцией рекомбинантных вариантов вируса осповакцины в культуре клеток Hum143 (TK⁻). В качестве селектирующего агента использовали бромдезоксисуридин в концентрации 50 мкг/мл культуральной среды (см. "Экспер. часть").

Нами были получены варианты вируса осповакцины, способные расти в присутствии бромдезоксисуридина в культуральной среде, что свидетельствует об успешном введении в тимидинкиназный район ДНК вируса осповакцины гена ангиогенина.

Наличие встройки гена ангиогенина в рекомбинантный вирус осповакцин проверяли методом блот-гибридизации. По описанной ниже методике был приготовлен ³²P-меченый зонд, содержащий ген ангиогенина, и проведена гибридизация его с ДНК рекомбинантного вируса, иммобилизованной на нитроцеллюлозном фильтре. Было

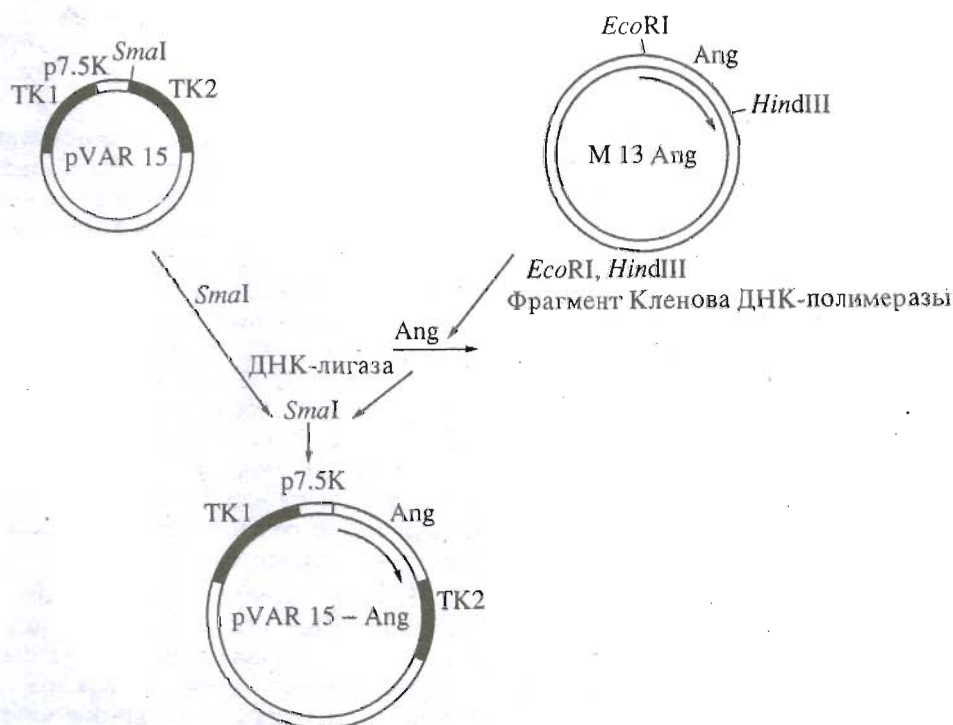


Схема клонирования гена ангиогенина человека в плазмиду pVAR 15. Затемнены фрагменты гена тимидинкиназы вируса осповакцины (TK1 и TK2).



Иммуноблоттинг белков клеток, инфицированных рекомбинантным вирусом осповакцины с моноклональными антителами к ангиогенину. 1, 2 – отобранные клоны рекомбинантного вируса осповакцины; 3 – лизат клеток Hum143 (TK⁻), инфицированных вирусом осповакцины (штамм WR).

показано, что полученный зонд гибридизуется с рекомбинантной ДНК вируса осповакцины.

Отобранные клоновые варианты вируса осповакцины анализировали в реакции иммуноблоттинга с моноклональными антителами к ангиогенину человека. В реакции иммуноблоттинга выявлялся белок с мол. массой 14.5 кДа, соответствующей мол. массе ангиогенина человека. При этом из 12 клонов 3 реагировали с моноклональными антителами (рисунок). Клоны пассировали далее на клетках Hum143 (TK⁻). Показано, что отобранные клоны реагируют с моноклональными антителами к ангиогенину человека после пяти пассажей на культуре клеток Hum143 (TK⁻). Этот результат свидетельствовал о стабильности встроенного гена ангиогенина в составе рекомбинантного вируса осповакцины.

Таким образом, в настоящей работе ген ангиогенина человека был клонирован в составе генома вируса осповакцины и получен рекомбинантный вирус, направляющий синтез ангиогенина.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали вирус осповакцины штамма WR, культуру клеток Hum143 (TK⁻) из коллекции НПО “Вектор”, моноклональные ан-

титела к рекомбинантному ангиогенину (“Ферментас”, Литва), рестриктазы, ДНК-лигазу фага T4, фрагмент Кленова ДНК-полимеразы *E. coli* (ТОО “Сибэнзим”, Новосибирск), дезоксинуклеозидтрифосфаты (dNTP) (Sigma, США).

Плазмидная ДНК pVAR 15, несущая последовательность гена тимидинкиназы и промотор p7.5K вируса осповакцины, предоставлена И.П. Дмитриевым (НПО “Вектор”). ДНК фага M13, содержащая ген ангиогенина, получена от С.П. Коваленко (Институт терапии СО РАМН, Новосибирск).

Клонирование ДНК, выделение плазмидных ДНК, гидролиз рестриктазами, репарацию концов фрагмента ДНК, циклизацию ДНК-лигазой, трансформацию клеток *E. coli* JM103 проводили стандартными методами [9].

Вирус нарабатывали на роллерной культуре клеток Hum143 в соответствии с условиями, описанными в работе [10]. Выделение вируса из инфицированных клеток проводили по методу [11].

Эксперименты по получению рекомбинантных вариантов вируса осповакцины осуществляли на культуре клеток Hum143 (TK⁻) по методикам, предложенным в работах [12, 13]. Клонирование проводили трижды предельными разведениями по методу, описанному в работе [10].

Пассирование рекомбинантного вируса осуществляли на монослойной культуре клеток Hum143 (TK⁻), используя вносимую множественность заражения 1 БОЕ/кл. Время инкубации зараженных клеток на каждом пассаже составляло 24 ч при 37°C. Содержание 5-бром-2-дезоксигуанидина в среде во время селекции и пассирования составляло 50 мкг/мл. Проведено 5 пассажей рекомбинантного вируса.

Выделение ДНК вируса осповакцины. К 2 мл очищенного препарата рекомбинантного вируса (в 48% сахарозе) добавляли лауроилсаркозилат натрия до концентрации 4% и 2-меркаптоэтанол до конечной концентрации 10%. Полученную смесь инкубировали 3 ч при 37°C. Затем добавляли 500 мкг протеиназы К и инкубировали еще 1 ч, после чего добавляли 2 мл фенола, насыщенного буфером (0.02 М трис-НСl (рН 7.6), 0.01 М EDTA), осторожно встряхивали и центрифугировали 5 мин при 3000 об/мин. Верхнюю фазу (фенол) убирали, а к нижней добавляли еще 2 мл фенола, центрифугировали, убирали фенол. Раствор ДНК дважды экстрагировали равным объемом хлороформа и осаждали 2.5 объема этанола.

Приготовление радиоактивно меченого зонда. ДНК фага M13, содержащую ген ангиогенина, гидролизовали рестриктазами *EcoRI* и *PstI* и обрабатывали затем экзонуклеазой III для образования протяженных одноцепочечных участков [14]. После инактивации экзонуклеазы прогреванием при 65°C в течение 15 мин проводили репаративный синтез ДНК с помощью фрагмента

Кленова в присутствии [^{32}P]ТТР [9]. Полученный радиоактивный зонд гибридизовали с препаратом ДНК рекомбинантного вируса, иммобилизованным на нитроцеллюлозном фильтре [9]. Электрофорез белков в ПААГ и иммуноблоттинг проводили так, как описано ранее [15].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Fett J.M., Strydom D.J., Lobb R.R., Alderman E.M., Bethune J.L., Riordan J.F., Vallee B.L.* // *Biochemistry*. 1985. V. 24. P. 5480 - 5486.
2. *Folkman J., Klagsbrun M.* // *Science*. 1987. V. 235. P. 442 - 447.
3. *Strydom D.J., Fett W., Lobb R.R., Alderman E.M., Bethune J.L., Riordan J.F., Vallee B.L.* // *Biochemistry*. 1985. V. 24. P. 5486 - 5492.
4. *Shapiro R., Riordan J.F., Vallee B.L.* // *Biochemistry*. 1986. V. 25. P. 3527 - 3534.
5. *Harper J.W., Vallee B.L.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1988. V. 85. P. 7139 - 7143.
6. *Коваленко С.П., Лисняк Н.А., Мертвецов Н.П.* // *Биоорганич. химия*. 1989. Т. 15. С. 492 - 498.
7. *Коваленко С.П., Горн В.В., Каргинов В.А., Морозов П.В., Зарытова В.Ф., Мертвецов Н.П.* // *Биоорганич. химия*. 1988. Т. 14. С. 910 - 915.
8. *Фодор И.И., Чернос В.И., Бендукидзе К.А., Альштейн А.Д.* // *Биотехнология*. 1987. Т. 3Б. С. 302 - 306.
9. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. С. 10 - 386.
10. *Петров В.С., Распопин В.В., Пак В.И., Урманов И.Х., Черный Н.Б., Бачинский А.Г.* // *Вопр. вирусологии*. 1991. С. 235 - 238.
11. *Joklik W.K.* // *Virology*. 1962. V. 18. P. 918.
12. *Mackett M., Smith G.L., Moss B.* // *J. Virol.* 1984. V. 49. P. 857 - 864.
13. *Клонирование ДНК. Методы.* // Ред. Д. Гловер. М.: Мир, 1988. С. 235 - 238.
14. *Чикаев Н.А., Назаренко И.А., Богачев С.С., Мalygin Э.Г.* // *Биохимия*. 1987. Т. 52. Вып. 9. С. 1454 - 1460.
15. *Муравлев А.И., Нетесова Н.А., Тихонов В.Я., Мalygin Э.Г.* // *Молекуляр. генетика, микробиол. и вирусол.* 1989. С. 1924.

Expression of the Synthetic Gene for Human Angiogenin in Recombinant Vaccinia Virus

N. A. Netesova*,¹ V. S. Petrov*, N. V. Cheshenko*, N. A. Chikaev**,
E. G. Malygin*, and N. P. Mertvetsov**

* *Vector State Scientific Center for Virology and Biotechnology, Institute of Molecular Biology, pos. Kol'tsovo, Novosibirskaya oblast', 633159 Russia*

** *Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Siberian Division, Novosibirsk, 630090 Russia*

Abstract – The gene for angiogenin was cloned into vaccinia virus genome. The recombinant virus expressing angiogenin was obtained. The level of protein synthesis directed by the recombinant virus was analyzed by immunoblotting using monoclonal antibodies against human angiogenin.

Key words: angiogenin, gene cloning; vaccinia virus, expression.

¹ To whom correspondence should be addressed.