ISSN 0233-7657. Біополімери і клітина. 2006. Т. 22. № 3

Вивчення транзиторної експресії гена *apoA-1* людини під регуляцією різних гібридних послідовностей у клітинах CHO-K1

Ю. М. Гільчук, О. М. Сухорада, Т. А. Рубан, О. К. Топорова, В. А. Кордюм

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

jukozel@yahoo.com

Сконструйовано рекомбінантні плазміди, які містять геномний варіант гена аполіпопротеїну A1 (apoA-1) людини під транскрипційним контролем гібридних послідовностей: енхансер середньораннього гена цитомегаловірусу людини/промотор гена β-актину курчати з першим інтроном гена β-актину курчати (CAG послідовність) та енхансер/промотор середньораннього гена цитомегаловірусу людини з інтроном А того ж гена (hCMVintronA послідовність). З використанням одержаних векторів і плазміди pTRapo досліджено транзиторну експресію гена apoA-1 людини в культурі клітин CHO-K1. Для клітин CHO-K1, трансфікованих векторами pTRapo і pTR-apohCMVintronA, показано експресію трансгена.

Ключові слова: транзиторна експресія, аполіпопротеїн А-1, CHO-K1.

Вступ. Спосіб доставки екзогенної ДНК у клітини ссавців відіграє важливу роль у вивченні функцій генів, а також в удосконаленні генної терапії. На даний момент існують різноманітні підходи до введення гетерологічної ДНК у клітини ссавців, серед них використання векторів, створених на базі вірусів ссавців, фізичні (зокрема електропорація) і хімічні (використання ліпосом, полікатіонів та ін.) методи тощо. Кожен з цих підходів допомагає вирішенню певних практичних завдань.

Вектори, сконструйовані на базі вірусів, завдяки своїй високій специфічності та ефективності при переносі генів *in vivo* набули найширшого розповсюдження у генній терапії [1]. Однак використання вірусних векторів у генній терапії пов'язано з такими проблемами, як токсичність, підвищена імуногенність, здатність активувати протоонкогени та індукувати утворення патогенних варіантів вірусів за рахунок рекомбінації з ендогенними вірусами. Саме тому перспективним напрямком у цій галузі є розробка невірусних систем введення генетичного матеріалу [2].

Так, плазмідні вектори, які можна використовувати при трансфекції клітин за допомогою фізичних або хімічних методів, не мають недоліків, властивих вірусним векторам, але характеризуються значно нижчою ефективністю трансфекції порівняно з останніми при їхньому застосуванні для переносу генів *in vivo* [3]. З іншого боку, легкість одержання та маніпулювання з рекомбінантними плазмідами зробили їх одним із основних векторів переносу генів для отримання стабільних трансформантів і транзиторних культур, які можуть бути використані при продукуванні рекомбінантних білків для терапевтичних цілей у клітинах ссавців *in vitro* [4].

© Ю. М. ГІЛЬЧУК, О. М. СУХОРАДА, Т. А. РУБАН, О. К. ТОПОРОВА, В. А. КОРДЮМ, 2006

Показано, що рівень експресії введених у клітини ссавців генів залежить від багатьох причин, у тому числі і від сили елементів регуляції транскрипції [5]. При корекції порушень, викликаних дефіцитом експресії певного гена в організмі, для досягнення фізіологічних концентрацій білка і відповідно терапевтичного ефекту часто потребен високий рівень експресії цільового трансгена. Тому однією з перспективних стратегій розв'язання проблеми, пов'язаної з низьким рівнем експресії трансгенів, є оптимізація уже відомих та пошук нових, більш сильних регуляторних послідовностей. Перевагою використання сильних регуляторних елементів є можливість зменшення кількості вектора, який вводиться *in vivo* для досягнення терапевтичного ефекту, або у разі виробництва рекомбінантних білків збільшення їхнього продукування. Це могло б частково вирішити проблему низької ефективності трансфекції клітин плазмідними векторами або зменшити можливі негативні наслідки при використанні векторів, створених на базі вірусів.

Метою цієї роботи було конструювання векторів експресії, які містять під транскрипційним контролем різних гібридних елементів геномний варіант гена аполіпопротеїну А-1 (*apoA-I*) людини, та дослідження з їхнім використанням транзиторної експресії АпоА-1 людини в клітинах CHO-K1.

Матеріали і методи. *Плазміди і бактеріальні штами.* Як трансген використано геномний варіант гена *apoA-I* людини, джерелом якого була рекомбінантна плазміда *pTRapo* [6].

Вектори експресії конструювали за допомогою плазмід *pTR-EGFP* [6], *pBacMam-1* («Novagen», США), *pTR-GT60* [7] і *pTRUF*, люб'язно наданої д-ром С. Золотухіним (Центр генної терапії, США), *pBluSKM* («Fermentas», Литва) та бактеріальний штам *Escherichia coli* DH10B (*F⁻mcrA Δ(mrr⁻hsdRMS-mcrBC) ϕ80dlacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK ⁻rpsL nupG*) («Invitrogen», США).

Роботи з бактеріальними культурами, трансформацію клітин *E. coli*, рестрикцію та лігування ДНК проводили за стандартними методами, як описано [8]. Отримані рекомбінантні плазміди перевіряли рестрикційним аналізом.

Виділення і очищення плазмідної ДНК. Плазмідну ДНК виділяли методом лужного лізису [8]. Додаткове очищення плазміди від домішок РНК та білків здійснювали за допомогою обробки препарату РНКазою А («USB», США), методом фенольно-хлороформної екстракції [8] та преципітацією PEG 8000 [9]. Концентрацію і чистоту ДНК визначали методом спектрофотометрії за співвідношенням A_{260}/A_{280} [8] на приладі Specord UV VIS («CARL ZELSS JENA», Німеччина), а також методом електрофорезу в 0,8 %-му агарозному гелі.

Культури клітин. У роботі використано лінію клітин китайського хом'яка CHO-K1, одержану з Російської колекції клітинних культур (Санкт-Петербург). Клітини культивували за температури 37 °С в атмосфері, що містить 5 % CO_2, в середовищі F10 («Sigma», США) з додаванням 10 % ембріональної телячої сироватки («Геном», Україна), 100 ОД/мл пеніциліну і 100 мг/мл стрептоміцину («Київмедпрепарат», Україна).

Трансфекція клітин. За дві доби до проведення трансфекції клітини висівали в кількості $8 \cdot 10^5$ у чашки Петрі діаметром 6 см. Трансфекцію проводили за допомогою розгалуженого поліетиленіміну (ПЕІ) (25 кДа, «Aldrich», США) за методом, описаним у роботі [10]. Препарат ДНК/ПЕІ готували в масовому еквіваленті 1:2. В процесі трансфекції у кожну чашку вносили по 3,5 мкг плазмідної ДНК. Час контакту клітин з трансформувальною сумішшю складав 1 год.

Ефективність трансфекції визначали за допомогою переносу в клітини CHO-K1 вектора *pTR-EGFP*, який містить маркерний ген зеленого флуоресцентного білка (egfp) [6].

Аналіз синтезу АпоА-1. Рівень накопичення АпоА-1 людини в культуральному середовищі визначали методами вестерн-блот- і дот-блот-аналізу. Для цього попередньо білки культурального середовища концентрували за допомогою трихлороцтової кислоти [11], преципітат відокремлювали від супернатанту центрифугуванням, осад розчиняли в буфері, який містив 4 М сечовину і 0,1 М трис. Проби для розділення білків в Ds-Na-ПААГ готували згідно з методом [8]. Білки розділяли в 12 %-му Ds-Na-ПААГ. Для імунодетекції білки з гелю переносили на PVDF мембрану («Amersham Biosciences», Швеція). Вільні місця посадки мембрани блокували 3 %-м розчином знежиреного сухого молока. Мембрану інкубували впродовж 1 год з моноклональними антитілами проти АпоА-1 людини (MGHLaa 1/500, «ИМТЕК», Росія). У наступному досліді мембрану інкубували протягом 1 год з антитілами проти імуноглобулінів G миші, кон'югованими з пероксидазою хрону (P-GAM

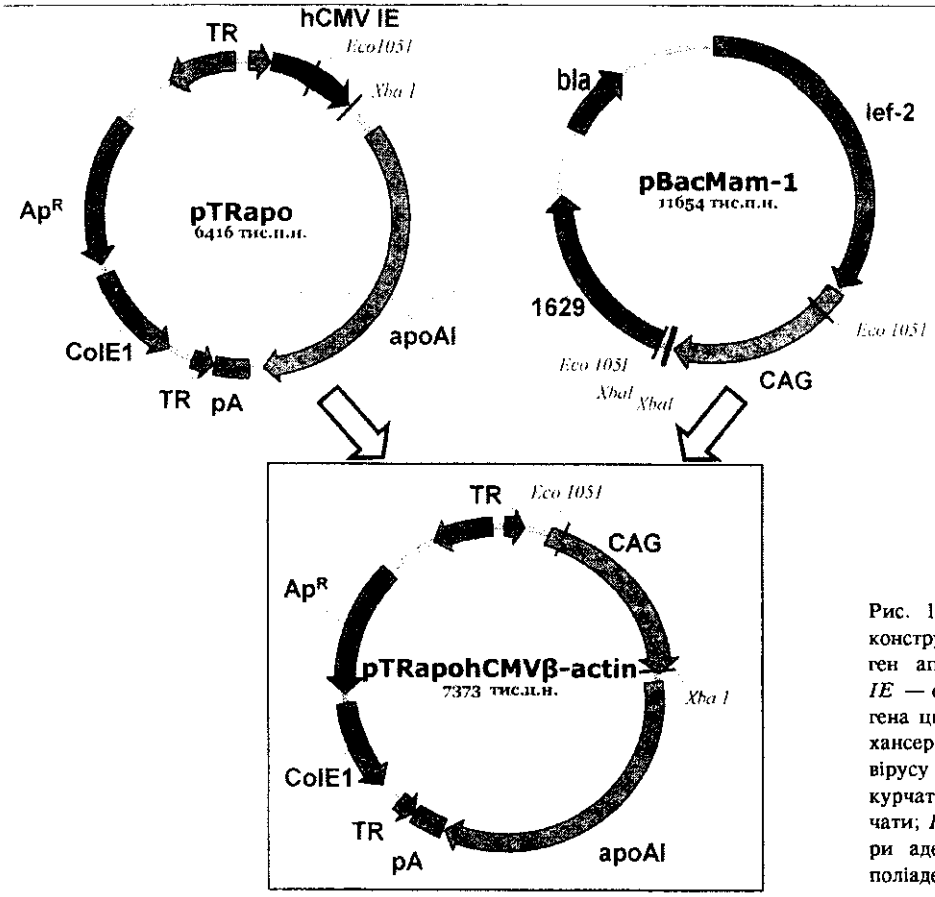

Рис. 1. Схема одержання рекомбінантної конструкції *pTRapohCMVβ-actin*: *apoA-1* — ген аполіпопротеїну А-1 людини; *hCMV IE* — енхансер/промотор середньораннього гена цитомегаловірусу людини; *CAG* — енхансер середньораннього гена цитомегаловірусу людини, промотор гена β-актину курчати, перший інтрон гена β-актину курчати; *ITR* — інвертовані термінальні повтори аденоасоційованого вірусу; *pA* — сайт поліаденілювання

1/1000, «ИМТЕК»). Імунні комплекси візуалізували за допомогою методу ECL [12], як субстрат використовували люмінол («Sigma»).

Реєстрацію хемілюмінесценції здійснювали за допомогою рентгенівської плівки Retina XBM («Лізоформ», Україна). Отримані зображення сканували та проводили кількісну оцінку інтенсивності сигналів з використанням програми Total Lab («Amersham Biosciences»). Стандартом молекулярної маси і концентрації слугував білок АпоА-1 людини («Sigma»).

Вміст білка АпоА-1 у культуральному середовищі визначали також методом непрямого твердофазного імуноферментного аналізу (ELISA).

Для імунодетекції застосовували такі реагенти: моноклональні антитіла проти АпоА-1 людини (MGHLaa 1/2700, «ИМТЕК») та антитіла проти імуноглобулінів G миші, кон'юговані з пероксидазою хрону (P-GAM 1/5000, «ИМТЕК»). Незайняті місця сорбції блокували 0,01 М фосфатно-солевим буфером (ФСБ), який містив 0,1 %-й твін-20. Як субстрат використовували ТМВ («Sigma»), екстинкцію вимірювали при довжині хвилі 450 нм на багатоканальному фотометрі Multiscan MCC/340 («Titertek», США).

Результати і обговорення. Як елемент регуляції транскрипції гетерологічних генів у клітинах ссавців найчастіше використовують промотор середньораннього гена цитомегаловірусу людини — hCMV-IE. Це зумовлено, в першу чергу, такими його характеристиками, як висока швидкість транскрипції, відсутність тканинної специфічності і в той же час компактність розміру (700 п. н.) [13, 14].

Показано, що введення деяких геномних елементів, зокрема, інтронів та 3′- і 5′-нетрансльованих послідовностей до кДНК цільових генів підвищує рівень експресії трансгена як *in vitro*, так і в трансгенних тваринах [15]. Механізм впливу таких послідовностей на рівень експресії трансгенів не в усіх випадках визначений, але його пов'язують з явищами підвищення швидкості транскрипції, зростання стабільності і транспорту і/або збільшення ефективності формування 3′-кінця мРНК при її дозріванні [16].

На даний момент створено велику кількість

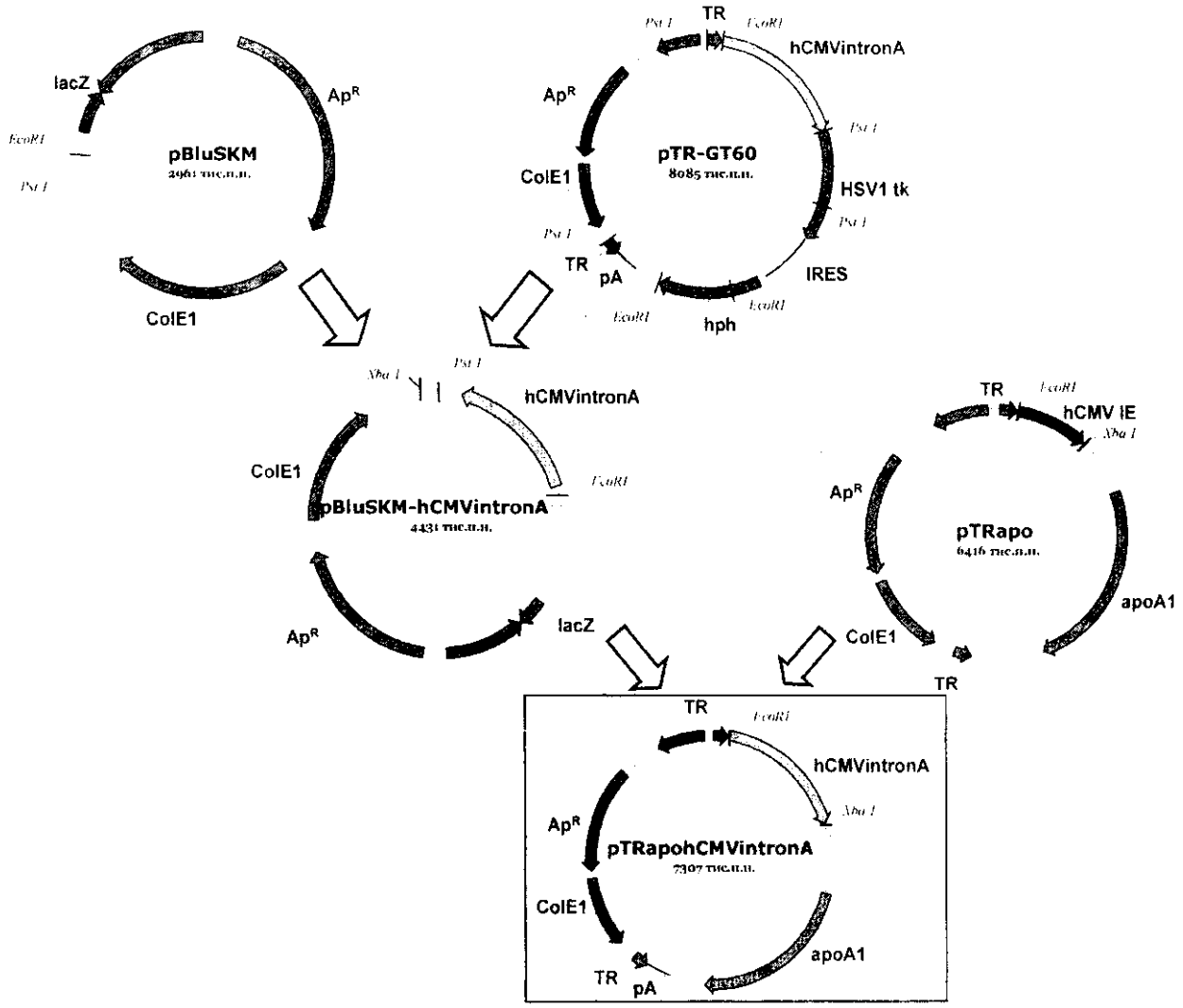

Рис. 2. Схема одержання рекомбінантної конструкції *pTRapohCMVintronA*: *apoA-1* — ген аполіпопротеїну А-1 людини; hCMV-IE — енхансер/промотор середньораннього гена цитомегаловірусу людини; hCMVintronA — енхансер/промотор середньораннього гена цитомегаловірусу людини та інтрон А середньораннього гена цитомегаловірусу людини; *ITR* — інвертовані термінальні повтори аденоасоційованого вірусу; *pA* — сайт поліаденілювання

гібридних елементів регуляції транскрипції [16—18]. У попередніх роботах [5, 19] за допомогою маркерних генів виявлено, що гібридні послідовності — енхансер середньораннього гена цитомегаловірусу людини/промотор гена β-актину курчати з першим інтроном гена β-актина курчати (CAG послідовність) та енхансер/промотор середньораннього гена цитомегаловірусу людини з інтроном А того ж гена (hCMV-intronA послідовність) забезпечують найвищий рівень експресії трансгена *in vitro* та *in vivo*. Тому перспективним є використання даних регуляторних елементів для збільшення рівня експресії цільового гена у клітинах ссавців.

Для оцінки впливу вищезазначених гібридних послідовностей на експресію гена *anoA-1* людини *in vitro* нами сконструйовано декілька плазмідних векторів.

При конструюванні вектора експресії *pTRapo-hCMVβ-actin* у плазміді *pTRapo* по сайтах рестриктаз *Eco1051-XbaI* було зроблено заміну промотору hCMV-IE на гібридну послідовність CAG (рис. 1).

Плазміду *pTRapohCMVintronA* створювали через проміжну конструкцію *pBluSKM-hCMVintronA*. Для отримання цієї плазміди гібридну послідовність hCMVintronA клонували по сайтах рестриктаз *EcoRI-PstI* з плазміди *pTR-GT60* у вектор

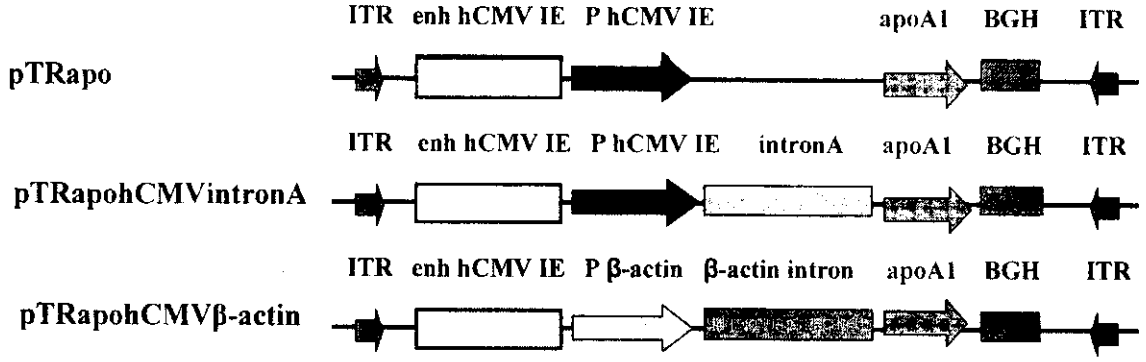

Рис. 3. Загальна схема розташування регуляторних елементів: *ITR* — інвертовані термінальні повтори аденоасоційованого вірусу; *pA* — сайт поліаденілювання; *enh hCMV IE* — енхансер середньораннього гена цитомегаловірусу людини; *P hCMV IE* — промотор середньораннього гена цитомегаловірусу людини; *intron A* — інтрон А середньораннього гена цитомегаловірусу людини; *P β-actin* — промотор гена β-актину курчати; β-actin intron — перший інтрон гена β-актину курчати; *BGH pA* — сайт поліаденілювання гена гормона росту бика; *apoA-I* — ген аполіпопротеїну А-1 людини

pBluSKM, який гідролізували рестриктазами *EcoRI-PstI*. Далі у плазміді *pTRapo* по сайтах рестрикції *EcoRI-XbaI* промотор hCMV IE було замінено на гібридну послідовність hCMVintronA (рис. 2).

У досліджуваних векторах ген *apoA-I* людини розміщено під контролем різних гібридних послідовностей: hCMVintronA, CAG і промотору hCMV IE. Ці елементи мають спільний енхансер — енхансер середньораннього гена цитомегаловірусу людини та різні промотори: промотор середньораннього гена цитомегаловірусу людини у разі hCMV IE і послідовності hCMVintronA та промотор гена β-актину курчати для елемента CAG. Крім того, гібридні послідовності hCMVintronA і CAG мають у своєму складі перші інтрони: середньораннього гена цитомегаловірусу людини і гена β-актину курчати (рис. 3).

Особливості експресії трансгена під контролем зазначених елементів вивчали *in vitro* при транзиторному синтезі АпоА-1 з використанням клітин CHO-K1. Перевагами використання транзиторних трансформантів для такого аналізу є те, що рівень експресії не залежить від «ефекту положення» (position effect), тобто на нього не впливають регуляторні хромосомні елементи, оскільки експресія трансгена відбувається з неінтегрованих векторних послідовностей. До того ж для проведення подібного дослідження необхідно значно менше часу, ніж на отримання та аналіз стабільних трансформантів [18].

Варто відмітити, що білок АпоА-1 людини є секреторним. До складу гена *apoA-I* входить послідовність, яка кодує власний сигнальний пептид, що забезпечує його секрецію у середовище. Зважаючи на це, АпоА-1 детектували безпосередньо у культуральному середовищі за такою схемою: через 1 добу після трансфекції середовище змінювали на безсироваткове, на наступну добу його повністю відбирали і заморожували, а до клітин додавали свіже. Таким чином були відібрані проби культурального середовища на 2—5-ту добу після трансфекції клітин.

На другу добу після трансфекції методом імунохімічного аналізу детектували наявність цільового білка в культуральному середовищі клітин, трансфікованих векторами експресії *pTRapo* і *pTRapohCMVintronA*.

Приклад експерименту представлено на рис. 4. Тестування культуральних середовищ за допомогою ELISA не дало позитивного результату (даних не наведено), що пов'язано з недостатньою чутливістю методу для детекції тієї кількості білка АпоА-1, яку синтезували клітини CHO-K1. Порівняння плазмід з різними елементами регуляції транскрипції показало, що конструкція *pTRapohCMVintronA* забезпечує вищий рівень експресії трансгена, ніж плазміда *pTRapo*.

За результатами імунодетекції встановлено, що рівень синтезу АпоА-1 клітинами, трансфікованими плазмідою *pTRapohCMVintronA*, складає близько ~3 нг білка на 1 мл середовища за добу, у той час як при трансфекції клітин плазмідою *pTRapo* — ~0,4 нг/мл. Невисокий рівень синтезу АпоА-1 за умов проведеного експерименту можна пояснити недостатньою ефективністю трансфекції клітин генетичним вектором.

При аналізі динаміки накопичення білка за

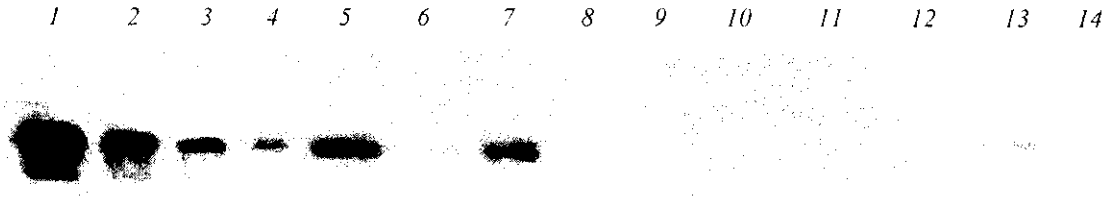

Рис. 4. Вестерн-блот аналіз секреції білка АроА-1 у культуральне середовище клітинами CHO-K1, трансфікованими різними векторами експресії: *5—7* — вектором експресії *pTRapohCMVintronA*; *8—10* — *pTRapohCMVβ-actin*; *11—13* — *pTRapo*; *14* — контроль, культуральне середовище, яке містить нетрансфіковані клітини CHO-K1. Внесена у лунку проба відповідає 280 мкл культурального середовища; *1—4* — стандарт молекулярної маси і концентрації білок — АпоА-1 людини («Sigma», США) (*1* — 5 нг; *2* — 1,67 нг; *3* — 0,55 нг; *4* — 0,18 нг)

допомогою дот-блотингу в пробах культурального середовища білок АпоА-1 не детектувався, починаючи з 3-ї доби. Для транзиторних культур описано експресію трансгенів з плазмідних векторів *in vitro* впродовж тижня, триваліша експресія є неможливою через втрату трансгена (при елімінації плазмідної ДНК, поділі або загибелі клітин).

Рівень експресії трансгена, контрольований гібридною послідовністю CAG, був нижчим за чутливість використаного методу аналізу (<0,2 нг/мл). Створені генетичні конструкції надалі будуть використані для одержання і аналізу експресії гена *anoA-1* людини стабільними трансформантами CHO-K1.

Висновки. Сконструйовано рекомбінантні плазміди, які містять геномний варіант гена *anoA-1* людини під транскрипційним контролем різних регуляторних елементів. Для клітин CHO-K1, трансфікованих плазмідами *pTRapo* і *pTRapohCMVintronA* на 2-гу добу після трансфекції, показано експресію гена *anoA-1* людини на рівні ~ 0,4 і ~ 3 нг білка на 1 мл середовища відповідно. Отримані дані із збільшення експресії гена *anoA-1* людини під контролем гібридної послідовності hCMVintronA в порівнянні з рівнем експресії трансгена під регуляцією промотору hCMV IE в цілому узгоджуються з результатами інших досліджень.

Yu. M. Gilchuk, O. M. Sukhorada, T. A. Ruban, O. K. Toporova, V. A. Kordyum

Study of transient expression of human *apoA-1* gene under control of various promoters in CHO-K1 cells

Summary

The recombinant plasmids containing the genomic human apoA-1 gene under the transcriptional control of hybrid promoters, namely, the cytomegalovirus immediate early enhancer/chicken β-actin promoter and first intron (CAG promoter) and cytomegalovirus immediate early enhancer/promoter with intron A (hCMVintronA promoter) have been constructed. The transient expression of human apoA-1 gene has been studied in CHO-K1 cells using designed and pTRapo vectors. The expression of the transgene for transfected with pTRapo and pTRapochCMVintronA CHO-K1 cells have been shown.

Key words: transient expression, apolipoprotein A-1, CHO-K1.

Ю. Н. Гильчук, Е. М. Сухорада, Т. А. Рубан, Е. К. Топорова, В. А. Кордюм

Изучение транзиторной экспрессии гена *anoA-1* человека под регуляцией различных гибридных последовательностей в клетках CHO-K1

Резюме

Сконструированы рекомбинантные плазмиды, содержащие геномный вариант гена аполипопротеина А-1 (апоА-1) человека под транскрипционным контролем гибридных последовательностей: энхансер среднераннего гена цитомегаловируса человека/промотор гена β-актина цыпленка с первым интроном гена β-актина цыпленка (CAG последовательность) и энхансер/промотор среднераннего гена цитомегаловируса человека с интроном А того же гена (hCMVintronA последовательность). С использованием полученных векторов и плазмиды pTRapo изучена транзиторная экспрессия гена апоА-1 человека в культуре клеток CHO-K1. Для клеток, трансфицированных векторами pTRapo и pTRapohCMVintronA, показана экспрессия трансгена.

Ключевые слова: транзиторная экспрессия, аполипопротеин А-1, CHO-K1.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Romano G., Micheli P., Pacilio C., Giordano A.* Latest developments in gene transfer technology: achievements, perspectives and controversies over therapeutic applications // Stem cells.—2000.—**18**.—P. 19—39.
2. *Богданенко Е. В., Свиридов Ю. В., Московцев А. А., Жданов Р. И.* Невирусный перенос генов *in vivo* в генной терапии // Вопр. мед. химии.—2003.—№ 3.—С. 226—245.
3. *Nishikawa M., Hashida M.* Nonviral approaches satisfying various requirements for effective *in vivo* gene therapy // Biol. Pharm. Bull.—2002.—25.—P. 275—283.
4. *Florian M.* Wurm production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells // Nat. Biotechnol.—2004.—22.—P. 1393—1398.
5. *Xia W., Bringmann P., McClary J., Jones P. P., Manzana W., Zhu Y., Wang S., Liu Y., Harvey S., Madlansacay M. R., McLean K., Rosser M. P., MacRobbie J., Olsen C. L., Ronald*

R. Cobb high levels of protein expression using different mammalian CMV promoters in several cell lines // Protein Exp. and Purif.—2006.—**45**.—P. 115—124.

6. *Топорова Е. К., Новикова С. Н., Лихачева Л. И., Сухорада, Рубан Т. А., Козел Ю. Н., Иродов Д. М.* Невирусная доставка гена *апоА-I* человека в клетки млекопитающих *in vitro* и *in vivo* // Біополімери і клітина.—2004.—№ 1—2.—С. 25—32.
7. *Кордюм В. А., Топорова Е. К., Окунев О. В., Похоленко Я. А., Сухорада Е. М., Рубан Т. А., Андриенко В. И., Иродов Д. М.* Новая множественно маркированная линия клеток — производная от CHO-K1 // Біополімери і клітина.—2003.—**19**, № 3.—С. 252—256.
8. *Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T.* Molecular cloning: a laboratory manual.—New York: Cold Spring Harbor Lab. press, 1989.—Vol. 1.
9. *Frederick M. Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A., Struhl K.* Current protocols in molecular biology.—New York: John Wiley and Sons, 1997.—Vol. 1.
10. *Boussif O., Lezoualch F., Zanta M. A., Mergny M. D., Scherman D., Demeneix B., Benr J.-P.* A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and *in vivo:* polyethylenimine // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1995.—**92**.—P. 7297—7301.
11. *Bollag D. M., Rozychi M. D.* Protein Methods.—New York: Wiley-Liss. Inc., 1996.—415 p.
12. *The Protein* Protocols Handbook / Ed. J. M. Walker.—Totowa, New Jersey: Humana press Inc., 2002.—1139 p.
13. *Boshart M., Weber F., Jahn G., Dorsch-Hasch K., Fleckenstein B., Schaffner W.* A very srong enchancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomeralovirus // Cell.—1985.—**41**.—P. 521—530.
14. *Fitzsimons H. L., Blaund R. J., During M. J.* Promoter and regulatory elements that improve adeno-associated virus transgene expression in the brain // Methods.—2002.—**28**.—P. 227—236.
15. *Palmiter R. D., Sangren E. P., Avarbock M. R., Allen D. D., Brinster R. L.* Heterologous introns can enhance expression of transgenes in mice // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1991.—**88**.—P. 478—482.
16. *Chapman B. S., Thayer R. M., Vincent K. A., Haigwood N. L.* Effect of intron A from human cytomegalovirus (Towne) immediate-early gene on heterologous expression in mammalian cells // Nucl. Acids Res.—1991.—**19**.—P. 3979—3986.
17. *Niwa H., Yamamura K., Miyazaki J.* Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector // Gene.—1991.—**108**.—P. 193—199.
18. *Savvas C.* Makrides components of vectors for gene transfer and expression in mammalian cells // Protein Exp. and Purif.—1999.—**17**.—P. 183—202.
19. *Xu Z.-L., Mizuguchi H., Ishii-Watabe A., Uchida E., Mayumi T., Hayakawa T.* Optimization of transcriptional regulatory elements for constructing plasmid vectors // Gene.—2001.—**272**.—P. 149—156.

УДК 577.218
Надійшла до редакції 09.02.06