

Сравнительное исследование эффективности экспрессии рекомбинантного пролактина человека в двух бакуловиральных системах

Л. И. Строковская, Р. А. Мелешко, И. М. Кихно, А. П. Соломко

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

*Проведено сравнительное изучение уровней экспрессии рекомбинантного пролактина (PRL) человека в системе вирус ядерного полиэдроса *Malacosoma neustria* (ВЯП Mane) — клетки *Anteraea pernyi* (Ap) и в системе на основе ВЯП *Autographa californica* (Ac) и клеточных линий насекомых Hf, Sf21 и Sf9. Показано, что уровень экспрессии пролактина составляет 50—70 мг/л питательной среды для ВЯП ManePRL и монослойной культуры Ap, а для рекомбинантного вируса AcPRL этот показатель в 1,7 раза выше в клетках Sf9 и Sf21 и в 3,5 раза выше в клетках Hf. При этом большая часть синтезированного рекомбинантного гормона человека находится во всех случаях в агрегированном состоянии.*

Введение. В последнее время для получения лекарственных белков и белков для создания диагностикомов все шире используются экспрессионные системы на основе клеток насекомых и рекомбинантных бакуловирусов. Белки, синтезированные в бакуловиральных экспрессионных системах, проходят посттрансляционный процессинг, и для большинства рекомбинантных белков показано, что их биологическая активность практически полностью соответствует активности природных аналогов.

Пролактин является гликопротеидным гормоном и представляет собой одиночную полипептидную цепь с молекулярной массой 24 кДа и тремя дисульфидными мостиками. Гормон пролактин — полифункциональный белок, он участвует в регуляции ряда физиологических функций в организме млекопитающих, включая процессы осморегуляции, размножения, иммунорегуляции, роста и развития [1]. Изменение уровня пролактина в кровотоке млекопитающих отмечено при различных патологических состояниях, таких как ишемия, экспериментальный диабет, почечная недостаточность, шизофрения и др. В связи с этим пролактин является одним из наиболее часто опре-

деляемых гормонов в рутинных клинических анализах. Вследствие этого для получения диагностических препаратов необходимы значительные количества высокоочищенного пролактина.

В нашей лаборатории ранее впервые синтезирован рекомбинантный пролактин (PRL) человека в разработанной нами бакуловиральной генно-инженерной системе на основе вируса ядерного полиэдроса (ВЯП) *Malacosoma neustria* (Mane) и клеток насекомых *Anteraea pernyi* (Ap) [2, 3]. За рубежом наибольшее распространение получила система на основе ВЯП *Autographa californica* (Ac) с использованием ряда линий клеток насекомых. Для этой системы созданы различные векторные конструкции, позволяющие относительно легко получить рекомбинантные бакуловирусы и очистить синтезированные рекомбинантные белки.

Цель нашей работы состояла в сравнительном исследовании уровней экспрессии пролактина человека в отечественной системе ВЯП Mane—клетки Ap и системе на основе ВЯП Ac и разных клеточных линий насекомых.

Материалы и методы. *Клетки и ферменты.* В работе использованы монослойные культуры клеток насекомых: Sf9, Sf21, Hf («Invitrogen», США) и Ap [4], выращенные на среде TC100 с добавлением 10 % эмбриональной бычьей сыворотки («Gib-

соBRL», США). Для трансформации использованы клетки *Escherichia coli* DH5 α и DH10BacTM («GibcoBRL»). Компетентные бактериальные клетки получали по методу [5]. Эндонуклеазы рестрикции, лигаза и Tag-полимераза получены от «MBI Fermentas» (Литва). Трансформацию бактериальных клеток, рестрикцию и лигирование проводили по стандартным протоколам [6].

Конструирование рекомбинантных плазмид. Получение рекомбинантной плазмиды *pMPRL*. кДНК гена пролактина человека выделена из плазмиды *pHPr19* [7]. Фрагмент плазмиды, содержащий кДНК гена пролактина, встраивали в плазмиду *pM1.2*. Эта плазида сконструирована нами на основе созданной ранее плазмиды *pMPEA*, при использовании которой в бакуловирусной экспрессионной системе на основе ВЯП *Mane* получали рекомбинантные белки [2, 3]. Проведена модификация участка, включающего ген полиэдрина: в районе иницирующего кодона ATG был встроено полилинкерный участок с сайтами для рестриктаз *HindIII* и *BamHI*. При этом была удалена последовательность гена полиэдрина от +1 до +144. В результате получена челночная плазида *pM1.2* [8]. Исходная кДНК пролактина ограничена сайтами для *BamHI* и *KpnI*, поэтому встраивание в челночную плазмиду проводили по этим сайтам. Но в плазмиде *pM1.2* для *KpnI* присутствуют два сайта — один расположен на расстоянии +631 от иницирующего кодона, а второй — на расстоянии примерно 900 п. н. от первого. Этот *KpnI*-фрагмент размером 900 п. н. содержит сигналы полиаденилирования и поэтому не может быть исключен из рекомбинантной челночной плазмиды. Вследствие этого получение транспортного вектора осуществляли в два этапа — сначала была получена плазида, содержащая встроенную по сайтам *BamHI* и *KpnI* кДНК гена пролактина, однако в этой плазмиде отсутствовал *KpnI*-фрагмент размером 900 п. н. Следующим этапом было встраивание этого фрагмента в транспортный вектор. Клоны с фрагментом 900 п. н. в правильной ориентации отбирали по результатам обработки рестриктазой *HindIII*. Таким образом получен транспортный вектор *pMPRL*, содержащий кДНК гена пролактина под промотором гена полиэдрина ВЯП *Mane*.

Получение рекомбинантной плазмиды *pFastPRL*. Для создания этой рекомбинантной плазмиды кДНК гена пролактина выделяли из плазмиды *pMPRL* с помощью реакции амплификации с использованием следующих праймеров: 5'-CGGGATCCCATGTTGCCCATCTGTCCCGGC-, содержащего *BamHI*-сайт, и 3'-GGGGTA-

ССААТТСГААГСААГСААТГГААССГ-, содержащего *KpnI*-сайт.

Аmplифицированный фрагмент очищали с использованием набора *QAEXII* («Quagen», США) и встраивали в плазмиду *pFastBac* («Life Technologies», «GibcoBRL») по сайтам *BamHI-KpnI*. Полученная рекомбинантная плазида *pFastPRL* содержит кДНК пролактина под промотором гена полиэдрина ВЯП *Ac* (рис. 2).

Получение рекомбинантных бакуловировусов. Для получения рекомбинантного вируса *ManePRL* клетки *Ar* ко-трансфицировали смесью рекомбинантного транспортного вектора *pMPRL* и ДНК дикого ВЯП *Mane* в различных соотношениях. На 7–10-е сут после ко-трансфекции собирали вирус-содержащий материал и определяли титр вируса. Для определения выхода рекомбинантов клетки насекомых рассеивали в 96-ячеечные планшеты по $2 \cdot 10^4$ клеток на ячейку и инфицировали их вирусным материалом в количестве 50–100 БОЕ на ячейку. На 7-е сут после инфицирования вирусосодержащий материал стерильно отбирали и переносили в другую планшетку. Оставшиеся клетки анализировали под световым микроскопом на присутствие полиэдров. Затем их лизировали, наносили на нейлоновые фильтры, денатурировали, нейтрализовали и гибридизовали с ³²P-меченной кДНК пролактина человека. Для вторичной очистки отбирали вирусный материал из тех ячеек, где была обнаружена гомология с геном пролактина, но полиэдров не было. Клетки, рассеянные в ячейки, инфицировали с множественностью 1 БОЕ на клетку. Далее обработку вели, как описано выше. В результате отобрано несколько вирусных клонов, которые гибридизовались с ³²P-кДНК пролактина и проявляли бесполиэдренный фенотип. Затем с помощью рестрикционного анализа и блот-гибридизации отобраны вирусные клоны, в которых кДНК гена пролактина находилась под промотором гена полиэдрина ВЯП *Mane*. Полученный рекомбинантный вирус *ManePRL* использовали для инфицирования клеток *Ar*.

При получении рекомбинантного вируса *AcPRL* использована система *Vac-to-Vac* («GibcoBRL»). Для транспозиции кДНК гена пролактина в бакмиду клетки DH10BacTM трансформировали рекомбинантной плазмидой *pFastPRL*. Из полученных белых колоний выделяли препараты бакмидных ДНК. Наличие гена пролактина и отсутствие дикой бакмидной ДНК контролировали с помощью реакции амплификации с использованием соответствующих праймеров («GibcoBRL») по протоколам фирмы. Полученные рекомбинантные бакмидные ДНК использовали для трансфекции клеток Sf9, в

с ДНК ВЯП *Mane*. Смесь вирусной и плазмидной ДНК готовили в разных соотношениях. Эффективность ко-трансфекции оценивали количественно по выходу рекомбинантов. Наиболее удачным для эффективной ко-трансфекции оказалось соотношение вирусной ДНК к плазмидной 1:5. Выход рекомбинантов в этом случае составил 0.5—2 %.

Наличие гена пролактина, интегрированного в соответствующий локус вирусного генома, было доказано сравнительным рестрикционным анализом препаратов ДНК ВЯП *Mane* и ДНК полученных рекомбинантов с последующим перенесением на фильтр и гибридизацией с ^{32}P -кДНК пролактина. Полученный рекомбинантный вирус *ManePRL* использован затем для изучения экспрессии пролактина человека в клетках *Ap*.

Монослойную культуру клеток *Ap* инфицировали вирусом *ManePRL* с множественностью 10 БОЕ на клетку. Через 5 дней после инфицирования суммарные белки клеток разделяли в SDS-ПААГ. Как видно из приведенной электрофореграммы (рис. 2), в клетках, инфицированных рекомбинантным вирусом, обнаруживается белок, отсутствующий в неинфицированных клетках и клетках, инфицированных вирусом дикого типа. Молекулярная масса этого белка определяется в пределах 24—26 кДа, что соответствует молекулярной массе пролактина человека (идентичность его пролактину человека подтверждена иммуноблотингом с использованием специфических поликлональных антител (см. «Материалы и методы»). Его процентное содержание, вычисленное по данным денситометрии, составляет около 8 % от всего количества окрашенных Кумассы белков и соответствует выходу в пределах 50—70 мг/л питательной среды. Такое количество синтезированного рекомбинантного пролактина свидетельствует об эффективной его экспрессии в нашей бакуловиральной системе.

Определение динамики экспрессии пролактина с помощью радиоиммунного анализа с использованием ^{125}I -пролактина и набора «Риа-прол» позволило установить, что синтезируемый рекомбинантный белок появляется в клетках уже через 24 ч после инфицирования. На 7-е сут уровень пролактина составлял 8000—8500 мкМЕ/ 10^6 клеток (8000—9500 мкМЕ/мл среды). В перерасчете на количественное содержание белка суммарное количество рекомбинантного пролактина на 7-е сут составляло 1,5—2 мг/л среды.

Мы обратили внимание на существенное несоответствие количественных показателей, полученных с применением разных методов. В связи с тем, что при использовании радиоиммунного метода применяются существенно более мягкие условия раство-

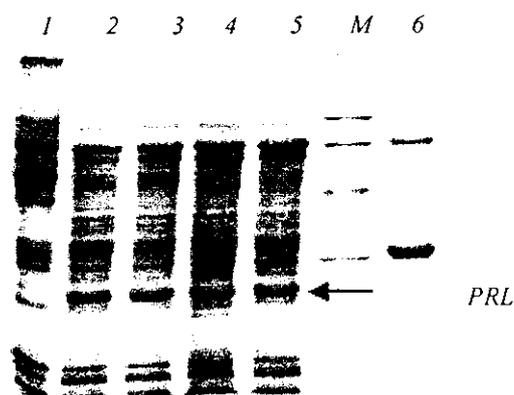


Рис. 2. Разделение в ПААГ суммарных белков клеток *Anteraea pernyi* (*Ap*), инфицированных рекомбинантными вирусами *Malacosoma neustria* (*ManePRL*) D2/116 (2); *ManePRL* 2 (3); *ManePRL* 3 (4); *ManePRL* 5 (5); M — маркерные белки; 1 — неинфицированные клетки MCA; 6 — клетки инфицированные диким вирусом *ManeNPV*

рения белков, чем при проведении электрофоретического анализа, мы предположили, что большая часть экспрессированного белка находится в агрегированном, иммунологически неактивном состоянии. Действительно, после разрушения инфицированных клеток, осаждения центрифугированием клеточного дебриса и обработки его лизирующим буфером для электрофореза с последующим разделением в SDS-ПААГ оказалось, что практически весь пролактин обнаруживается во фракции дебриса. Это свидетельствует в пользу нашего предположения о том, что наличие белка, обнаруживаемого в среде, объясняется попаданием его туда в результате разрушения клеток на поздних стадиях развития инфекции. Известно, что повышенная склонность к агрегации является естественным состоянием вновь синтезированного пролактина и его дезагрегация происходит, в основном, в процессе секреции [12]. В гене пролактина, использованном нами, отсутствовала последовательность, кодирующая сигнальный пептид, отвечающий за секрецию белка в среду, что и приводит к накоплению в клетках агрегатов рекомбинантного белка. Эти результаты подтверждают необходимость модификации используемого гена для получения секретированного пролактина, что существенно повысит эффективность нашей системы.

Следующим этапом работы было получение рекомбинантного вируса с геном пролактина человека на основе ВЯП *Ac* и сравнение эффективности синтеза рекомбинантного гормона в этих двух системах.

Экспрессия пролактина в системе на основе ВЯП Ac. На этом этапе работы нами использована

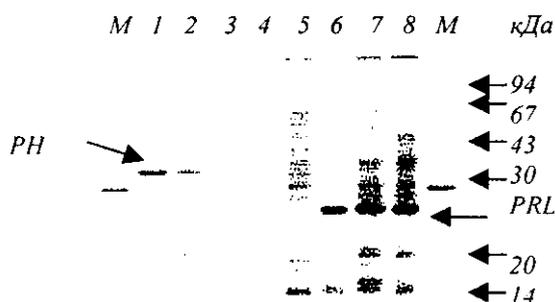


Рис. 3. Распределение в ПААГ суммарных белков клеток: Hf (1) и Sf9 (2), инфицированных *Autographa californica* (*AcNPV*), неинфицированных Hf (3), Sf21 (4), Sf9 (5); инфицированных рекомбинантным *AcPRL* — Hf (6); Sf21 (7); Sf9 (8); M — маркерные белки

коммерческая система *Vac-to-Vac*. В ее основе лежит метод получения рекомбинантных бакуловирусов сайт-специфической транспозицией чужеродного гена в бакуловирусный челночный вектор (бакмиду) в клетках *E. coli* [13]. Полученный таким образом рекомбинантный бакуловирусный челночный вектор (рекомбинантная бакмида) реплицируется в клетках как большая плазида и при трансфекции клеток насекомых этой плазмидой происходит образование рекомбинантных бакуловирусов.

Из плазмиды *pMPRL* выделяли кДНК гена пролактина в реакции амплификации с использованием праймеров, позволяющих исключить из конструкции последовательность, ответственную за связывание с бактериальной рибосомной ДНК. Амплифицированный фрагмент встраивали по сайтам *BamHI* и *KpnI* в плазмиду *pFastBac*. Полученный в результате рекомбинантный транспортный вектор *pFastPRL* содержал кДНК гена пролактина под промотором гена полиэдрина ВЯП *Ac*. После трансформации клеток *E. coli* DH10 *Vac*TM рекомбинантной плазмидой *pFastPRL* отобрано несколько белых колоний, из которых в дальнейшем выделяли препараты бакмидных ДНК. В реакции амплификации с использованием специфических праймеров, позволяющих определить встраивание чужеродного гена в бакмиду, отобрали препараты, содержащие кДНК гена пролактина. Этими препаратами рекомбинантной бакмидной ДНК трансфицировали клетки Sf9. В результате получен рекомбинантный вирус *AcPRL*, используемый в дальнейшем для изучения эффективности экспрессии пролактина в клетках насекомых линий Sf9, Sf21 и Hf.

В экспериментах клетки собирали на 4-е сут после инфицирования и анализировали в SDS-

ПААГ. Электрофореграммы общего белкового состава клеток исследуемых линий Sf9, Sf21 и Hf (рис. 3) свидетельствуют о том, что содержание пролактина в каждой из них составляет соответственно 14, 14 и 28 % от общего количества белка (наличие пролактина в каждой фракции было подтверждено иммуноблотингом со специфическими антителами — см. «Материалы и методы»). Эффективность экспрессии пролактина в данной системе превышает таковую системы ВЯП *Mane*, однако сравнима с ней.

Как свидетельствуют результаты анализа, применение одного и того же рекомбинантного вируса *AcPRL* для инфицирования разных клеточных линий демонстрирует двукратное колебание уровня пролактина в зависимости от использованного штамма клеток, что указывает на необходимость поиска и подбора наиболее продуктивных линий клеток для обоих рекомбинантных вирусов. К сожалению, пока нам не удалось найти другие линии клеток, перmissивных для ВЯП *Mane*. Возможно, проблему можно будет решить, адаптируя уже известные клеточные линии насекомых к этому вирусу.

Целесообразной представляется работа в направлении усовершенствования подхода, заключающегося в получении рекомбинантного бакуловирусного вектора, где в ген пролактина была бы включена последовательность нуклеотидов сигнального пептида секретируемого белка насекомого. Наряду с решением проблемы агрегации, включение сигнального пептида в состав синтезируемого белка может привести также к повышению эффективности его синтеза.

В заключение необходимо отметить, что нами впервые для синтеза рекомбинантного пролактина человека использованы две бакуловирусные системы на основе ВЯП *Mane* и *Ac* и достигнута эффективная экспрессия рекомбинантного гормона: уровень экспрессии пролактина составляет 50—70 мг/л питательной среды для ВЯП *ManePRL* и монослойной культуры *Ac*, а для рекомбинантного вируса *AcPRL* этот показатель в 1,7 раза выше в клетках Sf9 и Sf21 и в 3,5 раза выше в клетках Hf. При этом большая часть синтезированного рекомбинантного гормона человека во всех случаях находится в агрегированном состоянии.

L. I. Strokovskaya, R. A. Meleshko, I. M. Kikhno, A. P. Solomko

Comparative study on the efficiency of human recombinant prolactin expression in two baculovirus systems

Summary

The comparative study on the human recombinant Prolactin exp-

ression in the system NPV *Malacosoma neustria* (Mane)—cell *Anteraea pernyi* (Ap) and the system based on NPV *Autographa californica* (Ac) and insect cell lines Hf, Sf21 and Sf9 is performed. The level of Prolactin expression is shown to be 50–70 mg/l of a medium for both NPV ManePRL and monolayer culture Ap, while for a recombinant virus AcPRL this parameter is 1.7 times higher in cells Sf9 and Sf21 and 3.5 times higher in cells Hf. Thus the major part of the human recombinant hormone synthesized in all cases is in an aggregate state.

Л. І. Строковська, Р. А. Мелешко, І. М. Кіхно, О. П. Соломко

Порівняльне дослідження ефективності експресії рекомбінантного пролактину людини в двох бакуловірусних системах

Резюме

Здійснено порівняльне вивчення рівнів експресії рекомбінантного пролактину (PRL) людини в системі вірус ядерного поліедрозу *Malacosoma neustria* (ВЯП Mane)—клітини *Anteraea pernyi* (Ap) і в системі на основі ВЯП *Autographa californica* (Ac) і клітинних ліній комах Hf, Sf21 і Sf9. Показано, що рівень експресії пролактину складає 50–70 мг/л поживного середовища для ВЯП ManePRL і моношарової культури Ap, а для рекомбінантного вірусу AcPRL цей показник в 1,7 разу вищий в клітинах Sf9 і Sf21 і в 3,5 разу вищий в клітинах Hf. При цьому більша частина синтезованого рекомбінантного гормону людини знаходиться в усіх випадках в агрегованому стані.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Freeman M. E., Kanyicska B., Lenart A., Nagy G. Prolactin: structure, function and regulation of secretion // *Physiol. Rev.*—2000.—80, N 4.—P. 1523–1631.
2. Строковская Л. И., Кихно И. М., Веселовский О. В., Скуратовская И. Н., Мирюта Н. Ю., Петренко А. И., Соломко А. П. Экспрессивный вектор на основе вируса ядерного полиедроза кольчатого шелкопряда *Malacosoma neustria* // *Биополимеры и клетка.*—1990.—6, № 3.—С. 84–89.
3. Строковская Л. И., Калинина Л. И., Кихно И. М., Соломко О. П. Экспрессия рекомбінантного человеческого гена пролактина в клетках насекомых с использованием бакуловірусного вектора на основе вируса ядерного полиедроза кольчатого шелкопряда // *Докл. АН Украины.*—1997.—№ 1.—С. 166–169.
4. Сухорада Е. М., Каныка В. Ю., Милосердова В. Д. Размножение вируса ядерного полиедроза кольчатого шелкопряда при длительном пассировании в клетках перевиваемых линий насекомых // *Энтомопатогенные вирусы и их практическое значение.*—Киев: Наук. думка, 1981.—С. 44–50.
5. Nishimura A. N., Morita M., Nishimura J. N., Sugino G. A rapid and highly effective method for preparation of competent *E. coli* cells // *Nucl. Acids Res.*—1990.—18.—P. 6169–6170.
6. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. *Molecular cloning: A laboratory manual.*—New York: Cold Spring Harbor Lab. press, 1989.
7. Золотухин С. Б., Маркелова Е. Ю., Панасенко Г. В., Найденов И. Г., Швед А. Д., Саутин Ю. Ю., Пацко Я. В. Метод быстрого клонирования специфических кДНК. Клонирование кДНК пролактина человека // *Биополимеры и клетка.*—1989.—5, № 6.—С. 87–92.
8. Строковская Л. И., Кихно И. М., Калинина Н. О., Чащина Л. И., Соломко А. П. Экспрессия гетерологичных белков в бакуловірусной векторной системе: вирус ядерного полиедроза *Malacosoma neustria*—клетки *Anteraea pernyi* // *Цитология и генетика.*—1996.—30, № 1.—С. 42–48.
9. Laemli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.*—1970.—227.—P. 680–685.
10. Luskow V. A., Summers M. D. Trends in development of baculovirus expression vectors // *BioTechnology.*—1988.—6, N 1.—P. 47–55.
11. Кихно И. М., Строковская Л. И. Бакуловірусная система экспрессии чужеродных генов — настоящее и будущее биотехнологии получения биологически активных веществ различного происхождения // *Биополимеры и клетка.*—1994.—10, № 5.—С. 31–48.
12. Vole-Peysot C., Goffin V., Edery M., Binart N., Kelly P. A. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transductions pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice // *Endocrine Rev.*—1998.—19, N 3.—P. 255–268.
13. Luckow V. A., Lee S. C., Barry G. F., Olins P. O. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *E. coli* // *J. Virol.*—1993.—57, N 8.—P. 4566–4579.

УДК 577.112 + 371.24
Надійшла до редакції 29.06.2000