

Создание рекомбинантных аденовирусов и лентивирусов, экспрессирующих ангиогенные и нейропротекторные факторы, с помощью технологии клонирования Gateway

Е.Е. Черенкова¹, В.Ю. Федотова¹, М.А. Борисов², Р.Р. Исламов², А.А. Ризванов¹

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

² Казанский государственный медицинский университет, Казань

Generation of recombinant adenoviruses and lentiviruses expressing angiogenic and neuroprotective factors using Gateway cloning technology

E.E. Cherenkova¹, V.Y. Fedotova¹, M.A. Borisov², R.R. Islamov², A.A. Rizvanov¹

¹ Kazan (Volga region) Federal University, Kazan

² Kazan State Medical University, Kazan

Важной задачей генной и генно-клеточной терапии является поиск оптимального вектора — переносчика генетической информации. Вирусы представляют собой естественную биологическую систему переноса генов в эукариотические клетки. Одними из наиболее эффективных и доступных векторов для доставки рекомбинантных нуклеиновых кислот в клетки являются адено- и лентивирусы. В настоящем исследовании с помощью системы Gateway-клонирования нами были сконструированы аденовирусные и лентивирусные векторы, кодирующие ангиогенные и нейропротекторные факторы: изоформы сосудистого эндотелиального фактора роста *vegf121*, *vegf165*, *vegf189*; основной фактор роста фибробластов *fgf2*; глиальный нейротрофический фактор *gdnf*. Эффективность трансдукции клеток линии HEK293A полученными генетическими конструкциями и экспрессия рекомбинантных белков подтверждены методом иммунофлуоресцентного анализа.

Ключевые слова: аденовирусы, лентивирусы, Gateway-клонирование, сосудистый эндотелиальный фактор роста, основной фактор роста фибробластов, глиальный нейротрофический фактор.

Большинство нейропротекторных стратегий, направленных на предотвращение гибели нейронов при нейродегенеративных заболеваниях, после нейротравм и ишемических инсультов недостаточно эффективны и не приводят к полному функциональному восстановлению больного. При этом ситуация осложняется недоступностью нейропротекторных лекарственных веществ в клинике [1].

К природным нейропротекторным агентам относят нейротрофические факторы (NGF, BDNF, CNTF, GDNF, NT-3/4), эффективно поддерживающие выживание нейронов в патологических условиях и стимулирующие нейрорегенерацию [2]. Особого внимания заслуживают и другие ростовые факторы. В многочисленных исследованиях установлено выраженное нейропротекторное действие IGF, FGF и VEGF при нейродегенеративных заболеваниях, травме спинного мозга, ишемии головного мозга [3–5]. Повышенный интерес к VEGF обусловлен как его ангиогенным, так и нейропротекторным действием [6–9].

The critical aspect in gene and gene-cell therapy is to find an optimal vector — a carrier of genetic information. Viruses represent a natural biological system for gene transfer into eukaryotic cells. One of the most effective and proven vectors for delivery of recombinant nucleic acids into mammalian cells are adenoviruses and lentiviruses. In this study using the Gateway cloning we have constructed adenoviral and lentiviral vectors encoding angiogenic and neuroprotective factors: various isoforms of vascular endothelial growth factor *vegf121*, *vegf165*, *vegf189*; basic fibroblast growth factor *fgf2*; glial cell-derived neurotrophic factor *gdnf*. The efficiency of transduction of HEK293A cell line with generated recombinant viruses and expression of recombinant proteins were confirmed by immunofluorescent analysis.

Key words: adenovirus, lentivirus, Gateway cloning, vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, glial cell-derived neurotrophic factor.

Одной из ключевых задач разработки «инструментов» для генной терапии является создание экспрессионных генетических конструкций, обеспечивающих перенос рекомбинантных генов в целевые клетки *in vitro* и *in vivo*. Идеальная векторная система в генной терапии не требует инвазивных методов доставки, ограничена действием только на клетки-мишени, обеспечивает экспрессию известного количества трансгенных продуктов в течение определенного периода времени. Аденовирусы являются одними из наиболее часто применяемых векторов в генной терапии, уступая только ретровирусам [10]. Перспективными в разработке методов генной терапии также считаются векторы на основе лентивирусов. Лентивирусы, как и аденовирусы, способны инфицировать различные клетки. В то же время, за счет интеграции в геном клетки-хозяина они обеспечивают долговременную экспрессию и передачу трансгена дочерним клеткам при делении.

Недавно группой американских ученых на основе технологии Gateway-клонирования (Invitrogen, США)

e-mail: rizvanov@gmail.com

была создана коллекция клонов (hORFeome V8.1), кодирующих более 16 100 открытых рамок считывания генов человека [11]. Применение технологии Gateway-клонирования позволяет быстро и эффективно проводить субклонирование с сохранением ориентации открытой рамки считывания в различные экспрессионные векторы для дальнейших исследований по функциональному анализу экспрессии генов и белков. Система Gateway-клонирования основана на сайт-специфической рекомбинации бактериофага лямбда, которая происходит между специфическими последовательностями ДНК в пределах очень коротких участков гомологии, обычно 15–30 п.н. В связи с отсутствием этапа ПЦР амплификации, использование системы Gateway-клонирования сводит к минимуму риск возникновения мутаций во время генно-инженерных манипуляций, а применение сайт-специфической рекомбинации позволяет избежать применения многочисленных ферментативных реакций и стадий очистки промежуточных продуктов гидролиза ДНК, характерных для систем рестрикции-лигации.

Целью нашего исследования стали разработка и создание рекомбинантных аденовирусов и лентивирусов, кодирующих гены ангиогенных и нейротрофических факторов (*vegf121*, *vegf165*, *vegf189*, *fgf2*, *gdnf*) по технологии Gateway-клонирования (Invitrogen, США).

Материал и методы

Клонирование кДНК генов *vegf121*, *vegf165*, *vegf189* и *gdnf* в плазмидный вектор *pENTR-D/TOPO*. Амплификация фрагментов кДНК генов *vegf* и *gdnf* проводилась на термоциклере C1000 Thermo Cycler (BioRad) с помощью высокоточной полимеразы Phusion High fidelity DNA Polymerase (FINNZYMES). Праймеры синтезированы компанией «Синтол» (Россия), нуклеотидные последовательности приведены в табл. 1. Очищенные продукты ПЦР-амплификации клонировали (с применением топо-изомеразы)

в плазмидный вектор *pENTR-D/TOPO* (Invitrogen) с последующей трансформацией в компетентные клетки *E. coli* Top 10. ПЦР-скрининг колоний проводили с использованием вектор-специфичных праймеров (табл. 1). Получение целевых рекомбинантных плазмид подтверждали данными секвенирования и рестрикционного анализа.

Клонирование кДНК гена *fgf2* в плазмидный вектор *pDONR221* с помощью технологии Gateway-клонирования (Invitrogen, США). ПЦР-амплификацию фрагмента гена основного фактора роста фибробластов проводили в два этапа: первый этап служит для присоединения *attB* – сайтов с использованием геноспецифичных праймеров *hFGF2* – *attB1* и *hFGF2* – *attB2*, нуклеотидные последовательности которых представлены в табл. 1. Второй этап ПЦР-амплификации проводили с использованием адаптерных праймеров *GW-attB1* и *GW-attB2* (Литех, Россия), предназначенных для увеличения длины нуклеотидной последовательности *att*-сайтов. ВР – рекомбинацию проводили по стандартному протоколу, предложенному компанией Invitrogen, с последующей трансформацией в компетентные клетки *E. coli* Top 10. ПЦР-скрининг колоний и подтверждение получения целевых рекомбинантных плазмид проводили, как описано выше.

Создание экспрессионных конструкций на основе аденовирусов и лентивирусов при помощи технологии Gateway-клонирования (Invitrogen, США). Для создания экспрессионных конструкций на основе аденовирусов и лентивирусов проводили LR-рекомбинацию кДНК генов из плазмид-доноров *pENTR-VEGF121*, *pENTR-VEGF165*, *pENTR-VEGF189*, *pENTR-Gdnf* и *pDONR-FGF2* в плазмидные векторы *pAd/CMV/V5-Dest* (Invitrogen) (для создания аденовирусных конструкций) или *pLX303* (AddGene № 25897) (для создания лентивирусных конструкций). Трансформация компетентных клеток *E. coli*, ПЦР-скрининг колоний и подтверждение получения целевых рекомбинантных плазмид проводили, как описано выше.

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров, использовавшихся для ПЦР-амплификации (прописными буквами выделены кодирующие последовательности)

Название праймера	Нуклеотидная последовательность
hVEGF – TOPO-F*	caccATGAACCTTCTGCTGTCTTGG
hVEGF – Stop – Sall*	gtcgacTCACCGCCTCGGCTTGTC
hGDNF – TOPO – F*	caccATGAAGTTATGGGATGTCGTG
hGDNF – Stop – Sall*	gtcgacTCAGATACATCCACACCTTTTAGC
hFGF2 – attB1**	aaaagcaggctcACCATGGCAGCCGG
hFGF2 – attB2**	agaagactgggtTCAGCTCTTAGCAGACATTGGAAG
GW – attB1**	ggggacaagttgtacaaaaagcaggct
GW – attB2**	ggggaccactttgtacaagaagctgggt
M13 –F(-20)***	gTAAACgACggCCAgtg
M13-Reverse***	ggAAAACAgCTATgACCATg

Примечание: * – ПЦР амплификация для TOPO клонирования; ** – ПЦР амплификация для Gateway клонирования; *** – вектор-специфичные праймеры для ПЦР – скрининга колоний.

Генетическая модификация (трансфекция) клеток HEK293A рекомбинантными плазмидами. Клетки линии HEK293A (Invitrogen, США) культивировали при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂, в среде Игла, модифицированной Дульбекко (DMEM), содержащей 10% сыворотку крови плодов коровы (FBS), 1% смеси антибиотиков пенициллина и стрептомицина и 2 mM L-глутамина. Трансфекцию клеток линии HEK293A с помощью полученных генетических конструкций (pAd-FGF2, pAd-GDNF, pAd-VEGF121, pAd-VEGF165, pAd-VEGF189; pLX-FGF2, pLX-VEGF121, pLX-VEGF165, pLX-VEGF189) проводили с помощью трансфекционного реагента TurboFect (Fermentas, Канада) согласно методике, рекомендованной производителем. Анализ экспрессии белков проводили через 48 ч после трансфекции с помощью иммунофлуоресцентного анализа.

Иммунофлуоресцентный анализ экспрессии рекомбинантных белков. Для фиксации трансфицированных клеток HEK293A в лунки культурального планшета после удаления питательной среды добавляли охлажденный метанол, затем планшет инкубировали при -20°C в течение 10 мин. После инкубации клетки промывали трис-буферным раствором TBS (50 mM Трис, 150 mM NaCl, pH 7,6). Проницаемость клеточных мембран увеличивали с помощью 0,1% раствора тритона X-100 (Helicon, Россия). Инкубацию с первичными антителами (табл. 2) проводили в TBS в течение 1 ч. Затем клетки промывали TBS и далее инкубировали со вторичными антителами (табл. 2) в течение 1 ч. Ядра клеток окрашивали флуоресцентным красителем DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole; Invitrogen, США). Результаты анализировали с помо-

щью флуоресцентного микроскопа AxioObserver Z1 (Carl Zeiss, Германия).

Получение рекомбинантных аденовирусов. Для получения рекомбинантных аденовирусов Ad5-GDNF, Ad5-FGF2, а также Ad5-VEGF (изоформы 121, 165, 189) аденовирусный плазмидный вектор перевели из кольцевой в линейную форму с помощью рестрикции ферментом *PacI*. Полученными очищенными линейными плазмидами трансфицировали клетки линии HEK293A с помощью трансфекционного реагента TurboFect. После трансфекции каждые 2–3 сут. меняли среду на свежую пока не стали заметны области цитопатического эффекта. На 10 сут. после трансфекции суспензию клеток из лунки собирали в стерильную 2 мл пробирку. После сбора клеточной суспензии проводили несколько циклов замораживания/оттаивания с последующим центрифугированием для подготовки неочищенного вирусного лизата. Вирусный сток хранили при -80°C.

Получение рекомбинантных лентивирусов, экспрессирующих ангиогенные и нейротрофические факторы. Для получения рекомбинантных лентивирусов проводили трансфекцию клеток HEK293T (ATCC, CRL-11268) при плотности монослоя в 70–80% кальциево-фосфатным методом по стандартному протоколу рекомбинантными плазмидами pLX303, psPAX2 (Addgene, США) и pCMV-VSV-G (Addgene, США). Эффективность трансфекции оценивали по количеству GFP-позитивных клеток методом флуоресцентной микроскопии. Клеточный лизат собирали через 2 сут. после трансфекции с последующим центрифугированием и фильтрацией супернатанта. Вирусный сток хранили при -80°C.

Таблица 2. Первичные и вторичные антитела, использованные в работе

Антиген	Описание	Разведение	Производитель
GDNF	Поликлональные IgG кролика	1:100	Santa Cruze (sc-328)
VEGF	Поликлональные IgG кролика	1:100	Santa Cruze (sc-152)
FGF2	Поликлональные IgG кролика	1:100	Santa Cruze (sc-7911)
IgG (H+L) кролика	Поликлональные IgG осла, конъюгированные с Alexa Fluor 555	1:2000	Invitrogen (A31572)
IgG (H+L) кролика	Поликлональные IgG осла, конъюгированные с Alexa Fluor 488	1:2000	Invitrogen (A21206)

Результаты и обсуждение

Первоначально в результате ПЦР-амплификации и на последующих этапах клонирования с помощью технологии ВР-рекомбинации и ТОРО-клонирования были получены векторы-доноры: pDONR-FGF2, а также pENTR-GDNF, pENTR-VEGF121, pENTR-VEGF165, pENTR-VEGF189. Экспрессионные аденовирусные плазмиды pAd-FGF2, pAd-GDNF, pAd-VEGF121, pAd-VEGF165, pAd-VEGF189, а также лентивирусные плазмиды pLX303-FGF2, pLX303-GDNF, pLX303-VEGF121, pLX303-VEGF165, pLX303-VEGF189 были получены с использованием LR-рекомбинации (Invitrogen). Наличие целевых фрагментов подтверждено данными рестрикционного анализа и автоматического секвенирования.

Генетическую модификацию клеток HEK293A рекомбинантными плазмидами проводили с помощью трансфекционного реагента Turbofect. Эффективность экспрессии генов подтверждена иммунофлуоресцентным анализом. Показано, что клетки HEK293A, модифицированные рекомбинантными плазмидами со вставками генов ангиогенных и нейротрофических факторов, специфично реагируют с первичными антителами к основному фактору роста фибробластов, глиальному нейротрофическому фактору и сосудистому эндотелиальному фактору роста (рис. 1–2).

На первом этапе получения рекомбинантных аденовирусов кольцевую плазмиду pAd со вставкой интересующего гена перевели в линейную форму

с помощью рестрикционного расщепления эндонуклеазой *PacI*. Расщепление вектора способствует взаимодействию левого и правого инвертированных повторов и удалению бактериальных последовательностей (участка начала репликации *pUC* и гена резистентности к ампициллину). Упаковка и репликация рекомбинантного аденовируса происходит в клетках линии HEK293A, содержащих E1-участок, удаленный в рекомбинантных аденовирусных векторах. Таким образом, делеция E1-области обеспечивает место для трансгенной вставки и блокирует репликацию вируса. На раннем этапе репликации вируса экспрессируются четыре несмежных области генома (с E1 по E4). Они служат, отчасти, в качестве ведущих регуля-

торов транскрипции, начиная с процесса экспрессии вирусного гена и заканчивая репликацией генома. После начала репликации ДНК, поздний промотор ведет большую часть вирусной транскрипции.

Через 72 ч после трансфекции очищенными рекомбинантными плазмидами были зафиксированы первые признаки цитопатического эффекта, характеризующегося характерными изменением морфологии клеток, принимающих округлую форму. Через 10 сут. после трансфекции суспензию клеток собирали и подвергали нескольким циклам замораживания-оттаивания. Полученные рекомбинантные аденовирусы хранили при -80°C для дальнейших исследований в экспериментах *in vivo*.

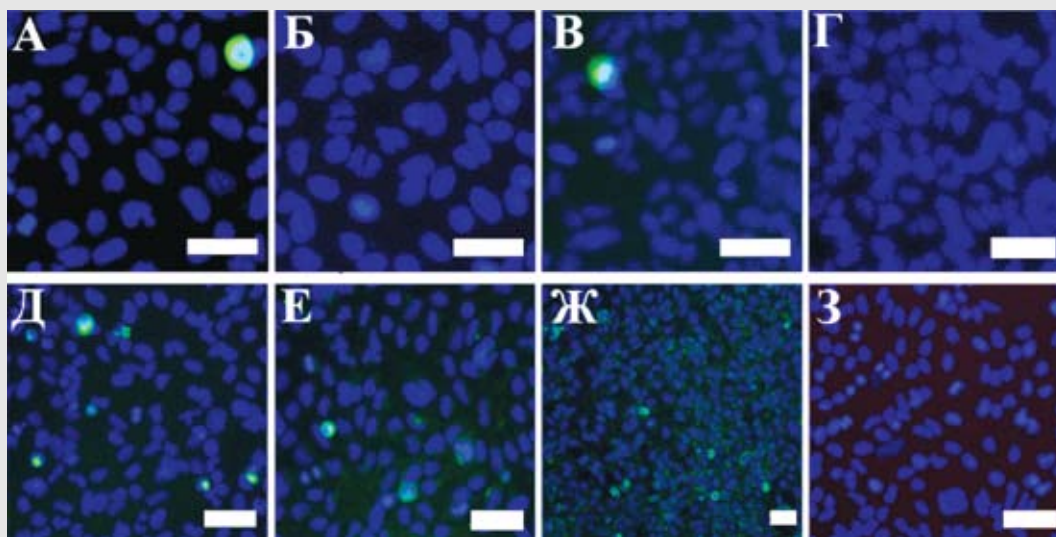


Рис. 1. Клетки HEK293A, трансфицированные рекомбинантными аденовирусными плазмидами, 48 ч после трансфекции: А – трансфекция плазмидой *rAd-GDNF*; Б – нетрансфицированный контроль для антител к глиальному нейротрофическому фактору; В – трансфекция плазмидой *rAd-FGF2*; Г – нетрансфицированный контроль для антител к основному фактору роста фибробластов; Д – трансфекция плазмидой *rAd-VEGF121*; Е – трансфекция плазмидой *rAd-VEGF165*; Ж – трансфекция плазмидой *rAd-VEGF189*; З – нетрансфицированный контроль для антител к сосудистому эндотелиальному фактору роста. Флуоресцентная микроскопия. Шкала – 100 мкм

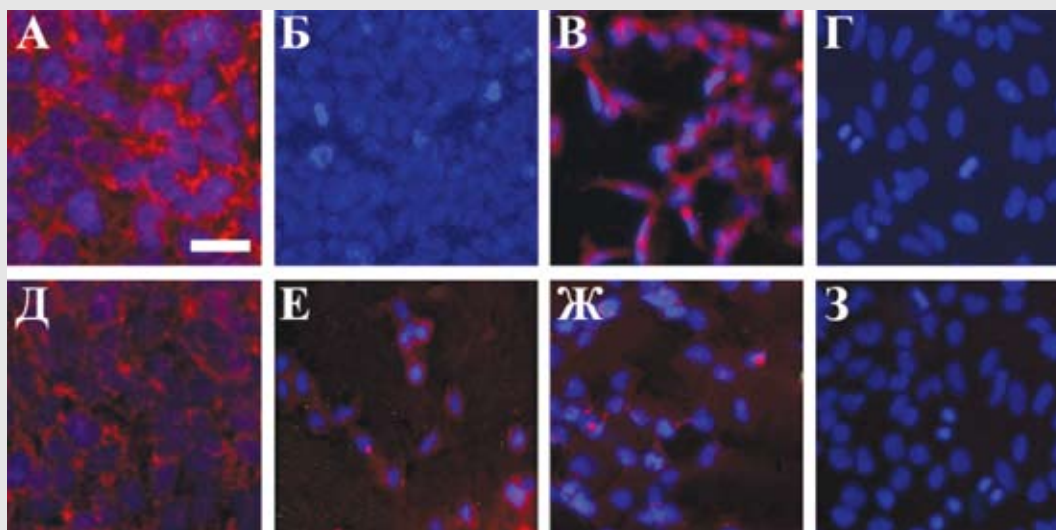


Рис. 2. Клетки HEK293A, трансфицированные рекомбинантными лентивирусными плазмидами, 48 ч после трансфекции: А – трансфекция плазмидой *rLX-GDNF*; Б – нетрансфицированный контроль для антител к глиальному нейротрофическому фактору; В – трансфекция плазмидой *rLX-FGF2*; Г – нетрансфицированный контроль для антител к основному фактору роста фибробластов; Д – трансфекция плазмидой *rLX-VEGF121*; Е – трансфекция плазмидой *rLX-VEGF165*; Ж – трансфекция плазмидой *rLX-VEGF189*; З – нетрансфицированный контроль для антител к сосудистому эндотелиальному фактору роста. Флуоресцентная микроскопия. Шкала – 100 мкм

Для эффективной продукции лентивирусов в клетках HEK293T была проведена трансфекция кальциево-фосфатным методом рекомбинантными плазмидами pLX303 со вставками генов ангиогенных и нейротрофических факторов, а также упаковочными плазмидами psPAX2 и pCMV-VSV-G. Введенная в пакующие клетки в составе плазмиды pCMV-VSV-G (packaging vector plasmid) пакующая кассета под контролем промотора цитомегаловируса экспрессирует гены, необходимые для формирования инфицирующей вирусной частицы. Но из кассеты исключен ген *env*, кодирующий белки-предшественники оболочки, определяющие его способность выходить за пределы клетки. Современная генерация пакующих систем включает обычно две плазмиды: одна кодирует Gag- и Gag-pol-белки (Gag формируют сердцевину вируса, Pol — его ферментную систему соответственно); вторая — Rev-белок (избирательно активирует синтез структурных белков вируса и обеспечивает экспорт из ядра длинных молекул вирусной РНК). Векторная плазмида (transfer vector plasmids) содержит кассету, экспрессирующую мРНК, включающую все *cis*-активирующиеся элементы и последовательности, кодирующие пакующий сигнал. Такие плазмиды содержат трансген-экспрессирующую кассету с геном, предназначенным для экспрессии в новом хозяине и находящимся под контролем внутреннего промотора, обычно позиционированного между 3'-Tat/Rev SA-сайтом и 3'-LTR. Для формирования оболочки векторной вирусной частицы в систему включен оболочечный вектор psPAX2 (envelope vector). Он содержит кассету, определяющую синтез гликопротеинов оболочки вируса. Однако, так как вектор не содержит структурных вирусных генов *gag*, *pol* и *env*,

образования полноценных вирусных частиц не происходит.

В качестве положительного контроля была также проведена трансфекция плазмидой pWPT-GFP (Addgene) в комплексе с упаковочными плазмидами. Эффективность экспрессии зеленого флуоресцентного белка подтверждена с помощью флуоресцентной микроскопии через 24 ч. после трансфекции.

Таким образом, с использованием системы клонирования Gateway были получены рекомбинантные аденовирусы и лентивирусы, экспрессирующие разные изоформы сосудистого эндотелиального фактора роста (*vegfr121*, *vegfr165*, *vegfr189*), основной фактор роста фибробластов *fgf2* и глиальный нейротрофический фактор *gdnf*. Подтвержденная эффективность трансдукции клеток адено- и лентивирусными векторами и экспрессия терапевтических генов позволяют начать доклинические испытания полученных генетических конструкций в генной и генно-клеточной терапии нейродегенеративных и ишемических заболеваний человека.

Благодарности

Работа частично выполнена на оборудовании Федерального центра коллективного пользования физико-химических исследований веществ и материалов (ФЦКП ФХИ) Казанского (Приволжского) федерального университета. Работа частично финансировалась грантами Российского Фонда Фундаментальных Исследований, грантом ОНТИЗК в рамках Программы поддержки научно-исследовательской работы молодых ученых ВУЗов России, госконтрактом ФЦП Министерства образования и науки Российской Федерации № 16.512.11.2101.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Leker R.R., Shohami E. Cerebral ischemia and trauma-different etiologies yet similar mechanisms: neuroprotective opportunities. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 2002; 39(1): 55–73.
2. Abe K. Therapeutic potential of neurotrophic factors and neural stem cells against ischemic brain injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2000; 20(10): 1393–408.
3. Leker R.R., Soldner F., Velasco I. et al. Long-lasting regeneration after ischemia in the cerebral cortex. *Stroke* 2007; 38(1): 153–61.
4. Beck K.D., Valverde J., Alexi T. et al. Mesencephalic dopaminergic neurons protected by GDNF from axotomy-induced degeneration in the adult brain. *Nature* 1995; 373(6512): 339–41.
5. Tomac A., Lindqvist E., Lin L.F. et al. Protection and repair of the nigrostriatal dopaminergic system by GDNF in vivo. *Nature* 1995; 373(6512): 335–9.

6. Dore-Duffy P., Wang X., Mehedi A. et al. Differential expression of capillary VEGF isoforms following traumatic brain injury. *Neurol. Res.* 2007; 29(4): 395–403.
7. Lafuente J.V., Argandoña E.G., Mitre B. VEGFR-2 expression in brain injury: its distribution related to brain-blood barrier markers. *J. Neural. Transm.* 2006; 113(4): 487–96.
8. Papavassiliou E., Gogate N., Proescholdt M. et al. Vascular endothelial growth factor (vascular permeability factor) expression in injured rat brain. *J. Neurosci. Res.* 1997; 49(4): 451–60.
9. Sköld M.K., Gertten C. VEGF and VEGF receptor expression after experimental brain contusion in rat. *Neurotrauma* 2005; 22(3): 353–67.
10. Vorburger S.A., Hunt K.K. Adenoviral gene therapy. *Oncologist* 2002; 7(1): 46–59.
11. Yang X., Boehm J.S., Yang X. et al. A public genome-scale lentiviral expression library of human ORFs. *Nat. Methods.* 2011; 8(8): 659–61.

Поступила 01.08.2012