

УДК 577.21

НОВЫЙ ВАРИАНТ МОРФОГЕНЕТИЧЕСКОГО БЕЛКА КОСТИ 7 ЧЕЛОВЕКА С УСИЛЕННЫМ ГЕПАРИН-СВЯЗЫВАЮЩИМ САЙТОМ

© 2013 г. L. Nematollahi, F. Mahboudi, A. Rahimpour, H. Jahandar, V. Khalaj*

Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Pasteur Ave., Pasteur Square, Southern Kargar Ave., Tehran-Iran

Поступила в редакцию 28.07.2012 г.

Принята в печать 17.09.2012 г.

ВМР – группа остеоиндуктивных белков, которые используются при острых костных переломах. Для достижения клинического эффекта обычно необходимы большие количества рекомбинантных белков, что увеличивает как стоимость лечения, так и вероятность развития побочных эффектов. Эффективность и безопасность ВМР повышают при помощи разных подходов, один из которых – модификация гепаринсвязывающего сайта, направленная на увеличение продолжительности локальной задержки морфогена. С целью дальнейшего улучшения свойств ВМР-7 сконструировали новую форму этого белка и успешно экспрессировали ее в клетках яичников китайского хомячка (СНО). Для повышения гепаринсвязывающей способности нового белка N-концевую область ВМР-7 заменили гепаринсвязывающим сайтом ВМР-2. Показали, что новый вариант сохраняет биологическую активность *in vitro*, а его гепаринсвязывающая способность при концентрации 100 нг/мл приблизительно на 20% выше, чем у белка дикого типа. Новый белок – первый вариант ВМР-7 с дополнительным усиленным гепаринсвязывающим сайтом – может иметь определенные преимущества перед существующими коммерческими препаратами.

Ключевые слова: клетки яичников китайского хомячка (СНО), морфогенетический белок кости (ВМР), связывание гепарина.

A NOVEL HUMAN BONE MORPHOGENETIC PROTEIN-7 VARIANT WITH AN ENRICHED HEPARIN-BINDING SITE, by L. Nematollahi, F. Mahboudi, A. Rahimpour, H. Jahandar, V. Khalaj* (Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Pasteur Ave., Pasteur square, Southern Kargar Ave., Tehran-Iran; *e-mail: khalajs@pasteur.ac.ir). BMPs are osteoinductive proteins which are used in treatment of acute fractures. Large quantities of recombinant proteins are usually needed to achieve efficacy in the clinic. This translates to severe complications and high costs. Different strategies have been developed to improve the efficacy and safety of BMPs. Modification of the heparin-binding site in order to increase the local retention time of the morphogen is one of these approaches. Aiming at further improvement in properties of BMP-7, a novel form of this protein was designed and expressed successfully in Chinese Hamster Ovarian (CHO) cells. Substitution of the Bone morphogenetic protein-7 N-terminus by the heparin-binding site of Bone morphogenetic protein-2 was carried out to increase the heparin binding capacity of the novel protein. It was found that the novel variant, retained its *in vitro* biological activity and the heparin binding capacity of this protein was approximately 20% higher than that of the wild-type at a protein concentration of 100 ng/mL. The novel protein as the first variant of hBMP-7 with the enriched heparin-binding site may offer more advantages in clinical use as compared to the existing commercial form.

Keywords: Chinese Hamster Ovarian (CHO), bone morphogenetic protein (BMP), heparin binding, variant.

DOI: 10.7868/S0026898413030105

Морфогенетические белки кости (ВМР) – входят в суперсемейство TGF- β . Эти многофункциональные цитокины могут индуцировать образование костной ткани, а их остеоиндуктивные свойства определяют клиническую значимость [1]. ВМР синтезируются в виде предшественников, состоящих из сигнального пептида, продо-

мена и зрелого пептида, который после процессинга образует зрелые димеры [2]. В настоящее время из белков семейства ВМР разрешено ограниченное клиническое использование только рекомбинантных ВМР-2 и ВМР-7 (известного также как остеогенный белок-1) [3, 4]. Из-за короткого времени жизни и невозможности удержать белок в месте введения для индукции сращения костей приходится использовать большие до-

* Эл. почта: khalajs@pasteur.ac.ir

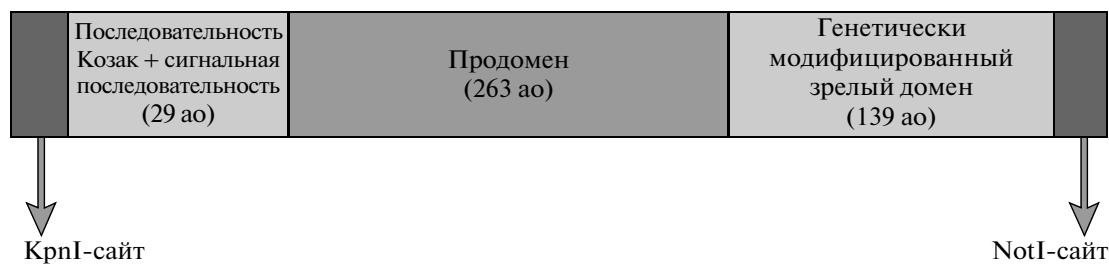


Рис. 1. Схематическое изображение генной конструкции. Полноразмерная кДНК, кодирующая предшественник rhB2BMP-7, сконструирована для получения правильно процессированного белка в клетках CHO DG44. ao – Аминокислотный остаток, при числе.

зы препарата или вводить его многократно. Однако при применении больших доз возрастает не только стоимость лечения, но и возможность возникновения нежелательных побочных эффектов. Таким образом, необходимо иметь более мощные формы BMP, способные оказывать терапевтический эффект в более низких дозах [3, 5–7]. Один из подходов к получению таких форм состоит в использовании BMP в комбинации с подходящим носителем для повышения остеоиндуктивного эффекта. Локальная концентрация BMP может возрастать за счет усиления связывания с внеклеточным матриксом [8]. Гепарин и гепарансульфат – члены семейства гликозаминогликанов (GAG) – молекул, ассоциированных с клеточной поверхностью и внеклеточным матриксом. Эти полисахариды обладают сродством ко многим факторам роста, включая основной фактор роста фибробластов (bFGF) и фактор роста сосудистого эндотелия (VEGF) и BMP-2, связываясь с ними за счет сильного отрицательного заряда цепей, и могут регулировать функции этих гепаринсвязывающих молекул [9–11]. Такие взаимодействия с гликозаминогликанами играют важную роль в поддержании локального резервуара факторов роста. Более того, эти взаимодействия важны не только для защиты факторов роста от протеолиза, они существенны также для презентации факторов роста рецепторам. Защита цитокинов от протеолитической деградации усиливает их биологическую активность и ведет к увеличению времени полужизни в кровотоке [12–14].

Как типичный представитель BMP, BMP-2 человека содержит гепаринсвязывающий сайт, который вносит вклад в его биологическую активность благодаря сильному связыванию с внеклеточным матриксом и клеточной поверхностью. Обогащенность N-концевого гепаринсвязывающего сайта BMP-2 остатками основных аминокислот свидетельствует о взаимодействии положительных зарядов этих боковых цепей с отрицательными зарядами гепарина. Сходные основные остатки представлены в N-концевых областях BMP-3–8 и GDF-5 человека [15]. Роль взаимодействия с внеклеточным матриксом в задержке

BMP изучали с использованием мутантных форм BMP-2. Например, были сконструированы варианты T3, T4 и BMP-2ха, которые прочно связываются с гепарином и могут рассматриваться как второе поколение BMP. BMP проявляют более высокую остеоиндуктивную активность благодаря увеличенному времени локального удерживания [8, 16–19].

Несмотря на клиническую значимость BMP-7, генноинженерные подходы к получению более эффективных форм этого белка с усиленным связыванием с внеклеточным матриксом не рассматривались. Было обнаружено, что гепарансульфатные цепи (HS)/гепариновые цепи необходимы для проведения сигнала BMP-7 [20]. В представленной работе сконструирован новый вариант BMP-7, предназначенный для продукции в клетках DG44 CHO. Новый вариант белка назван B2BMP-7 (B2 обозначает гепаринсвязывающий домен BMP-2). В B2BMP-7 первые 16 N-концевых аминокислотных остатков зрелой части BMP-7 заменены гепаринсвязывающим сайтом BMP-2. Определена биологическая активность нового белка. Кроме того, при помощи иммуноферментного анализа (ИФА) сравнили связывание B2BMP-7 и BMP-7 с гепарином.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Дизайн новой конструкции. Новая конструкция, содержащая полную кДНК, кодирующую сигнальную последовательность (29 аминокислотных остатков), продомен (263 аминокислотных остатка) и генетически модифицированный зрелый домен BMP-7, синтезирована в компании “Gene Key Biotech.” (Шанхай, КНР). Как показано на рис. 1 сайты рестрикции KpnI (5'...GGTACC...3') и NotI (5'...GCGGCCGC...3') введены перед и после гена, соответственно, чтобы упростить клонирование в векторе рTрасег-SV40. Последовательность Козак была включена в конструкцию по рекомендации производителя. Дизайн зрелого домена состоял в замене N-концевой последовательности BMP-7. В генетически модифицированном зрелом домене

(B2BMP-7) первые 16 N-концевых аминокислотных остатков BMP-7 (STGSKQRSQNRSKTPK) заменили первыми 16 аминокислотными остатками BMP-2 (QAKHKQRKRLKSSKRH). Чтобы предотвратить образование нежелательных внутривитридных дисульфидных связей удалили остаток 14 (цистеин) гепаринсвязывающего сайта BMP-2 (QAKHKQRKRLKSSCKRH). Вторичную структуру нового белка предсказали с использованием метода иерархических нейронных сетей (Hierarchical Neural Network, HNN).

Получение экспрессирующей конструкции. С целью получения экспрессирующей конструкции синтетический ген вырезали из промежуточного вектора рестриктазами KpnI и NotI и клонировали в векторе pTracer-SV40 по сайтам KpnI–NotI. Правильность структуры полученной плазмиды подтвердили рестрикционным картированием и секвенированием. В ходе этой работы плазмиды и фрагменты ДНК очищали, используя наборы Miniprep Kit и Gel Extraction Kit фирмы “Qiagen”.

Определение чувствительности к зеоцину. Для получения стабильных клеточных линий, продуцирующих новый белок, определили минимальную концентрацию зеоцина, необходимую для предотвращения роста нетрансформированных клеток. Использовали следующий протокол. Приблизительно 2.5×10^5 клеток/мл выращивали в 12-луночных планшетах в среде CD DG44 (“GIBCO Invitrogen”, США). После высева в клетки CHO DG44 добавляли зеоцин (“Invitrogen”) в концентрации от 0 до 1000 мкг/мл (0, 200, 400, 600, 800 и 1000 мкг/мл). Селективную среду обновляли каждые 3–4 дня, подсчитывали число живых клеток для определения концентрации зеоцина, предотвращающей рост в течение 3–4 нед.

Стабильная экспрессия. Клетки CHO DG44 трансфицировали с использованием набора DG44 Transfection Kit (“GIBCO Invitrogen”). Экспрессионную кассету B2BMP-7 линеаризовали рестриктазой BglII и трансфицировали ею клетки. Через 24 ч после трансфекции клетки промывали и добавляли свежую среду, содержащую зеоцин в нужной концентрации. Селективную среду обновляли каждые 3–4 дня до появления фокусов клеток.

Анализ геномной ДНК. Геномную ДНК из трансфицированных и нетрансфицированных клеток CHO выделяли, используя набор High Pure PCR Template Preparation Kit (“Roche”, ФРГ). ПЦР проводили в режиме 30 циклов: 95°C, 2 мин; 58°C, 30 с; 72°C, 90 с. Использовали прямой праймер B2BMP-7_F (5'-CTGCTTACTGGCTTATCG-3') и обратный праймер B2BMP-7_R (5'-GCAAA-CAACAGATGGCTG-3').

Выделение РНК и обратная транскрипция-ПЦР. Суммарную РНК выделяли, используя набор RNeasy Mini Kit (“Qiagen”, США), согласно протоколу производителя. Одноцепочечную кДНК

синтезировали, используя набор RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (“Fermentas”, Литва). Праймеры и условия ПЦР были такими же, как при амплификации геномной ДНК.

ИФА. Полученные рекомбинантные клеточные линии выращивали в среде DG44 (“GIBCO Invitrogen”) с L-глутамином (“GIBCO Invitrogen”). Для определения уровня продукции рекомбинантного B2BMP-7 супернатант собирали каждые 2 дня в течение 10 дней и измеряли концентрацию белка, используя набор для ИФА BMP-7 человека RayBiotech (“GA”, США), согласно инструкции производителя.

Анализ экспрессии. Супернатанты культур стабильно трансфицированных линий CHO собирали и концентрировали, используя систему фильтрации Amicon (“Millipore”, США). После диализа для очистки B2 BMP-7 применяли колонки Hi Trap Heparin HP (“GE Healthcare”, США). В качестве связывающего и промывочного буфера использовали 10 мМ натрий-фосфатный буфер pH 7.0. Элюцию проводили ступенчатым градиентом того же буфера, содержащего 1–2 М NaCl. Фракции элюата, содержащие мутантную форму белка, объединяли и концентрировали, используя систему фильтрации Microcon (“Millipore”). Для вестерн-блоттинга образцы разделяли в полиакриламидном геле (ПААГ) с додецилсульфатом натрия (SDS) и переносили с помощью электропереноса на нитроцеллюлозную мембрану. B2BMP-7 выявляли, используя кроличьи антитела против B2BMP-7 человека (“Abcam”, США) в качестве первых антител и конъюгат пероксидазы хрена с козьими антителами против иммуноглобулинов кролика (“Rarig BioTech”, Иран) в качестве вторых антител. Полосы белков, реагирующих с антителами, проявляли при помощи коммерческого набора ECL Kit (“GE Healthcare”).

Определение щелочной фосфатазы. Клетки C2C12 культивировали в среде DMEM, содержащей 10% FBS (фетальную сыворотку крупного рогатого скота) и пенициллин/стрептомицин, в инкубаторе при 37°C в атмосфере 5% CO₂. В ячейки 24-луночного планшета высаживали по 100 000 клеток и инкубировали в течение 24 ч. Затем клетки обрабатывали очищенным белком в концентрации 0, 50, 100 нг/мл. Для положительного контроля среду замещали средой DMEM, содержащей 2% FBS и BMP-7 дикого типа в разной концентрации (“Pro Spec”, США), и инкубировали в течение 72 ч. После этого клетки лизировали, и в супернатанте определяли активность щелочной фосфатазы, используя коммерческий набор Sensolyte® pNPP Alkaline Phosphatase Assay Kit (“Ana Spec”) согласно инструкции производителя. После инкубации осветленного супернатанта с раствором субстрата *p*-нитрофенилфосфата в течение 30 мин при 37°C реакцию останавливали,

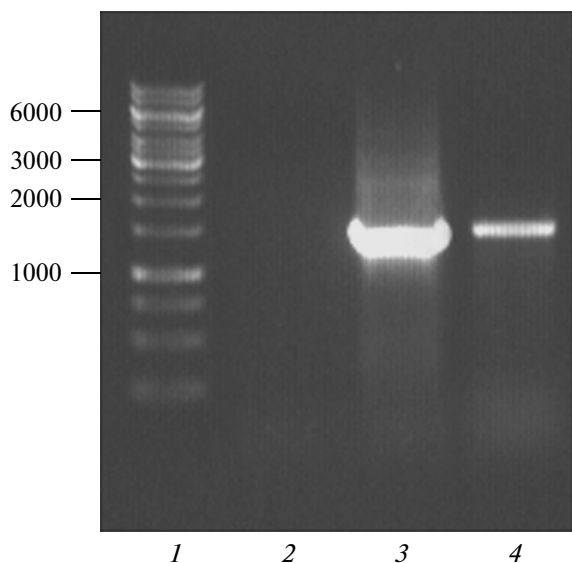


Рис. 2. Анализ клонов клеток после трансфекции В2ВМР-7 методом обратной транскрипции–ПЦР. 1 – Маркеры; 2 – отрицательный контроль; 3 – положительный контроль; 4 – фрагмент размером 1.3 т.п.н., амплифицированный из позитивного клона.

и определяли оптическую плотность при 405 нм на ИФА-ридере.

Определение связывания гепарина. Связывание гепарина определяли при комнатной температуре, используя BD™ Heparin Binding Plates (“BD Bioscience”, США) [22]. В зависимости от исследуемого соединения гепаринсвязывающие планшеты перед применением необходимо обработать раствором гепарина нужной концентрации. Сначала определили требуемую концентрацию гепарина (Н3393, “Sigma”). С целью определения концентрации гепарина, при которой происходит насыщение поверхности, проанализировали растворы с концентрацией более 100 мкг/мл. Планшеты инкубировали с раствором соли гепарина (Н33936 “Sigma”) нужной концентрации в течение ночи при комнатной температуре. Ячейки промывали PBS и блокировали 1% (v/v) раствором бычьего сывороточного альбумина в течение 60 мин при 37°C. После второй отмывки в ячейки добавляли ВМР-7 или В2ВМР-7 в разных концентрациях (0, 50, 100, 150 и 200 нг/мл) и инкубировали при 37°C в течение 2 ч. Отрицательным контролем служило связывание белка с ячейками, не покрытыми гепарином. Взаимодействие выявляли, добавляя в ячейки по 100 мкл разбавленных 1 : 1000 антител кролика к ВМР-7 человека (“Abscam”, Кембридж, Великобритания), выдерживали в течение 90 мин, затем добавляли по 100 мкл конъюгата пероксидазы с антителами против иммуноглобулинов кролика в разведении 1 : 1000 и выдерживали в

течение 45 мин. Через 15 мин измеряли поглощение при 450 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Предсказание вторичной структуры

Вторичную структуру нового варианта белка предсказания с использованием метода иерархических нейральных сетей [2].

Процент α -спиралей, β -слоев и неструктурированных участков составил 29.5, 20.14 и 50.36 в новом варианте белка и 28.06, 20.14 и 51.8 в ВМР-7 дикого типа. Эти результаты показывают, что различия во вторичной структуре незначительны.

Конструирование вектора экспрессии

Полноразмерный фрагмент, кодирующий предшественник нового варианта, успешно клонировали по KphI/NotI-сайтам вектора рTracer-SV40. Расщепление рестриктазами PstI/NotI давало два фрагмента, размер которых соответствовал теоретическим расчетам, что подтвердило успешность клонирования целевого гена в векторе. Присутствие гена и его правильную ориентацию подтвердили секвенированием.

Стабильная экспрессия

Проверка чувствительности к зеоцину показала, что антибиотик в концентрации 400 мкг/мл способен убивать клетки на 15-й день. После трансфекции клеток CHO DG44 экспрессирующей кассетой по устойчивости к зеоцину отобрали множество положительных клонов. Методом флуоресцентной микроскопии подтвердили образование гомогенной популяции клеток, экспрессирующих GFP, что указывало на стабильную трансфекцию (данные не приведены).

ПЦР-анализ геномной ДНК и суммарной РНК

В результате ПЦР-амплификации на геномной ДНК позитивных клонов с использованием праймеров, специфичных к В2ВМР-7, получили продукт длиной примерно 1.3 т.п.н., что указывает на успешную интеграцию конструкции в геном клеток. Из трансфицированных клеток выделили также суммарную РНК и провели обратную транскрипцию–ПЦР. Амплификация такого же фрагмента длиной ~ 1.3 т.п.н. подтвердила экспрессию варианта ВМР-7 на уровне мРНК (рис. 2).

Количественный анализ

Кинетику высвобождения *in vitro* рекомбинантного В2ВМР-7 человека (rhВ2ВМР-7) из клеток CHO определяли, используя ИФА, в течение 10 дней. Культуру клеток выращивали, начи-

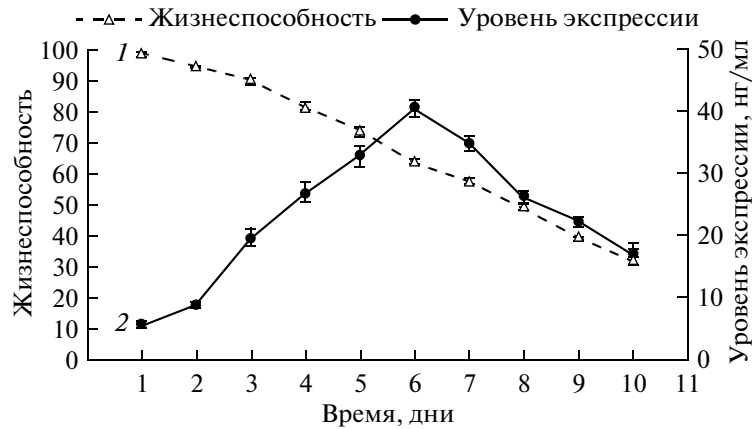


Рис. 3. Экспрессия варианта BMP-7 в супернатанте клеток CHO DG44 в сравнении с их жизнеспособностью. Для определения кинетики экспрессии B2BMP-7 использовали ИФА. 1 – Жизнеспособность клеток; 2 – уровень экспрессии B2BMP-7. Представлены средние значения результатов трех опытов.

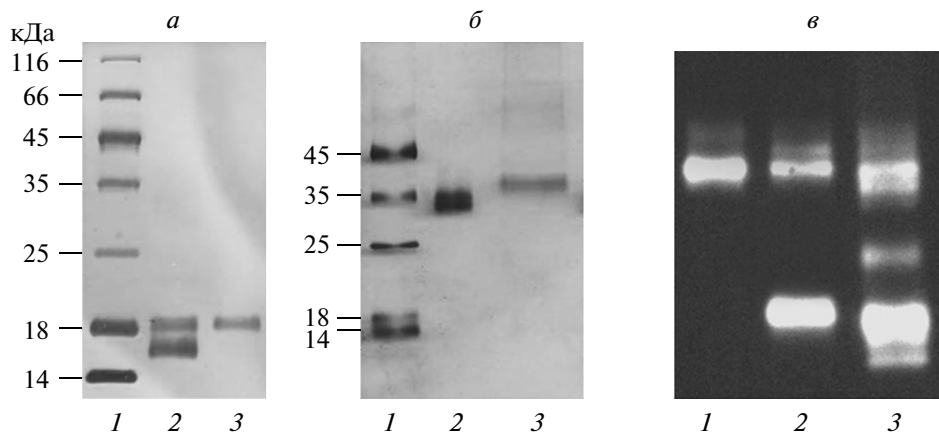


Рис. 4. Анализ экспрессии нового варианта BMP-7. Анализ нового варианта с помощью SDS-ПААГ в восстанавливающих (а) и невосстанавливающих (б) условиях, окрашивание 15% раствором серебра. а – Маркеры белков SM0671 (1); положительный контроль в восстанавливающих условиях (2); очищенный белок в восстанавливающих условиях (~18–19 кДа) (3). б – Маркеры белков SM0671 (1); положительный контроль в восстанавливающих условиях (2); очищенный белок в невосстанавливающих условиях (~36–38 кДа) (3). в – Вестерн-блот-анализ нового варианта BMP-7. Очищенный белок в невосстанавливающих условиях (1); очищенный белок в восстанавливающих условиях (2); положительный контроль в восстанавливающих условиях (3).

ная с плотности 2.5×10^5 /мл. Наиболее высокая продуктивность составила 40 нг/мл в шестидневной культуре. Как показано на рис. 3, жизнеспособность клеток снизилась с 98% в первый день до 64% на шестой.

Электрофорез в полиакриламидном геле с SDS и вестерн-блоттинг

Электрофорез в ПААГ в денатурирующих условиях (SDS) и вестерн-блоттинг проводили как описано ранее. В невосстанавливающих условиях rhB2BMP-7 мигрировал как белок с мол. массой 36–38 кДа. Однако при использовании восстанавливающих соединений белок мигрирует в зоне 18–

19 кДа. В качестве положительного контроля использовали rhBMP-7 (“ProSpec”) (рис. 4).

Определение биологической активности

Остеогенную активность нового варианта BMP-7 (rhB2BMP-2) оценивали по высвобождению щелочной фосфатазы, как описано ранее. Показали, что rhB2BMP-7, продуцируемый клетками CHO, способен стимулировать активность щелочной фосфатазы дозозависимым образом, однако менее эффективно, чем положительный контроль. Активность щелочной фосфатазы дозозависимым образом усиливается также действием BMP-7 дикого типа. В отсутствие BMP-7 в

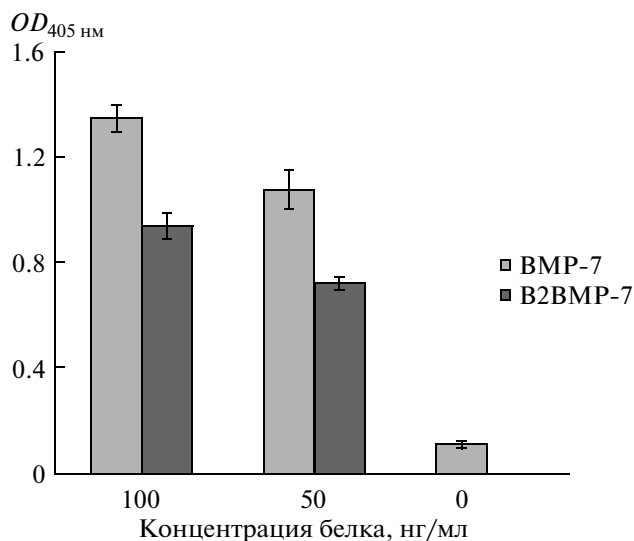


Рис. 5. Анализ высвобождения щелочной фосфатазы. Клетки C2C12 инкубировали в течение 3 дней с рекомбинантными белками BMP-7 и B2BMP-7 в возрастающих концентрациях, что приводило к дозозависимому повышению активности щелочной фосфатазы. Представлены средние значения трех повторностей \pm квадратичное отклонение

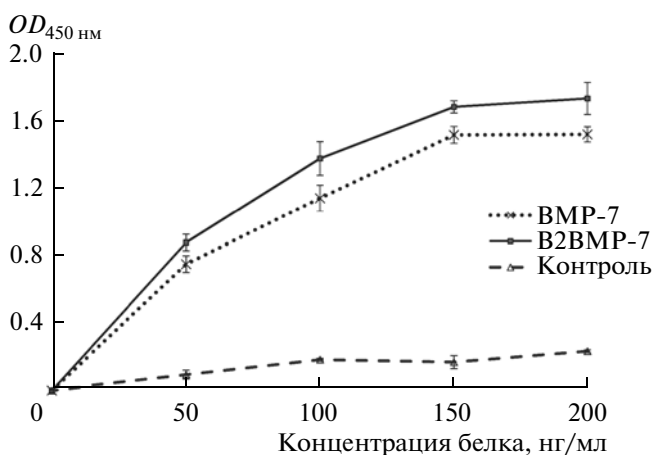


Рис. 6. Анализ связывания BMP-7 и B2BMP-7 с гепарином. Показано дозозависимое связывание двух белков с гепарином. Фоновое связывание с непокрытыми гепарином ячейками, служившими отрицательным контролем, значительно ниже. Каждое значение — среднее, вычисленное по результатам трех определений, \pm квадратичное отклонение.

культурах клеток C2C12 ферментативная активность не выявлена (рис. 5).

Определение связывания гепарина

Влияние замены аминокислотных остатков на связывание BMP-7 с гепарином оценивали с использованием планшета BD™ Heparin Binding

Plate. Обнаружили, что раствор гепарина (H3393, “Sigma”) с концентрацией 25 мкг/мл насыщает поверхность ячеек. Затем проанализировали связывание BMP-7 дикого типа и B2BMP-7 в разных концентрациях с покрытыми гепарином ячейками. Показали, что как BMP-7 дикого типа, так и его мутантный вариант дозозависимым образом связываются с гепарином, а фоновое связывание с непокрытыми гепарином ячейками было значительно более низким. В концентрации 100 нг/мл новый вариант белка связывался с гепарином примерно на 20% лучше, чем белок дикого типа (рис. 6).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что гепаринсвязывающие мотивы играют важную роль в биологической активности BMP-2. Манипуляции с триплетами основных аминокислотных остатков, локализованных в N-концевом домене BMP-2, влияют на способность белка связываться с внеклеточным матриксом. Например, мутантные варианты T3 и T4 BMP-2, содержащие один и два дополнительных остатка основных аминокислот в N-концевой области, обладают повышенным сродством к гепарину. Напротив, замещение N-концевого сегмента BMP-2 так называемой “подставной” последовательностью (dummy) привело к получению варианта EНBMP-2, не обладающего сродством к гепарину [15–19]. В связи с важностью взаимодействия с внеклеточным матриксом для задержки BMP в сайтах-мишенях мы сконструировали новую форму BMP-7 с повышенной способностью связывать гепарин. Анализ *in silico* методом иерархических нейтральных сетей показал, что этот вариант сохраняет вторичную структуру, свойственную BMP-7 дикого типа. Из-за сложности получения рекомбинантных BMP в клетках *Escherichia coli* [23] новую конструкцию экспрессировали в клетках СНО. Поскольку для правильного фолдинга и секреции активных зрелых димеров необходимы пропептиды BMP [24, 25], в конечную конструкцию включили сигнальный пептид и продомен. Вследствие гетерогенности гликозилирования в системе экспрессии СНО новый рекомбинантный белок мигрирует как зрелый димер 36–38 кДа в невозстанавливающих условиях и как мономер 18–19 кДа — в восстанавливающих, что согласуется с полученными ранее данными [25, 26].

Вариант BMP-7 (B2BMP-7) был сконструирован путем замещения первых 16 N-концевых аминокислотных остатков зрелой части BMP-7 соответствующим фрагментом BMP-2 (гепаринсвязывающий сайт BMP-2 без Cys14). Логично было предположить, что новый вариант с дополнительными основными остатками на N-конце (10 аминокислотных остатков в B2BMP-7 против пяти в

ВМР-7) будет обладать более высокой гепаринсвязывающей активностью по сравнению с ВМР-7 дикого типа. Для проверки этой гипотезы изучили связывание rhВМР-7 и rhВ2ВМР-7 с гепарином с помощью методики, основанной на нековалентной иммобилизации гепарина на микротитровальном планшете [22]. Хотя связывание ВМР-7 с гепарином показали ранее с использованием гепарин-сефарозных шариков [20], в нашей работе впервые для изучения взаимодействия гепарин/белок применили простой метод ИФА. Однако молекулярные основы такого взаимодействия не изучены. Мы обнаружили, что и нативный ВМР-7, и его мутантный вариант дозозависимым образом связываются с гепарином. Более того, в соответствии с нашей гипотезой новый вариант связывается с гепарином при всех проанализированных дозах лучше, чем белок дикого типа. Связывание с гепарином определяли, используя гепарин в концентрации 25 мкг/мл. Оказалось, что новый вариант связывается с гепарином примерно на 20% лучше, чем белок дикого типа, взятый в концентрации 100 нг/мл.

Поскольку ВМР регулирует дифференцировку клеток, связанную с формированием костей, мы сравнили биологические активности мутантного белка и ВМР-7 дикого типа, используя линию миобластов С2С12. Клетки С2С12 могут служить моделью, частично имитирующей процесс эктопического формирования кости, индуцируемого ВМР *in vivo* [27]. Ожидается, что новый вариант, обладающий более высоким сродством к гепарину, прочнее связывается с протеогликанами различного типа, включая гепарансульфат. Это взаимодействие защищает фактор роста от протеолиза и будет способствовать его взаимодействию с рецепторами, что может повысить его биологическую активность [14, 28]. Наши результаты показали, что новая форма ВМР-7 способна дозозависимым образом индуцировать активность щелочной фосфатазы.

Несмотря на более высокую способность нового варианта связывать гепарин, его биологическая активность оказалась ниже, чем у ВМР-7. Это можно объяснить тем, что более высокое сродство В2ВМР-7 к гепарансульфатпротеогликанам ограничивает эффективную концентрацию ВМР, доступного для взаимодействия с рецептором. Подобное наблюдение согласуется с результатами изучения роли гепарансульфатпротеогликанов в модуляции активности ВМР в ходе дифференцировки хряща конечности [29]. Показано, что гепарансульфат необходим для проведения сигнала ВМР-7 в клетках остеосаркомы крысы (ROS) [20], что не соответствует нашим данным. По-видимому, гепарансульфатпротеогликанов могут действовать и как негативные, и как позитивные регуляторы активности ВМР в разных контекстах [29].

Наши данные можно, по-видимому, объяснить невозможностью диффузии морфогена в клеточной культуре. Фактор роста может легко удаляться *in vivo*. В культуре клеток ВМР связывается с внеклеточным матриксом, а его доступность для связывания с рецептором ограничена, что согласуется с результатами работы, в которой вариант, дефектный по связыванию с гепарином ЕНВМР-2, проявляет в 5–10 раз более высокую биологическую активность *in vitro* и сниженную активность *in vivo*. Эти различия объясняются разной биодоступностью *in vitro* и *in vivo* [8, 18, 19]. Как ожидалось, наш новый вариант обладает более высоким сродством к гепарину и сниженной биологической активностью *in vitro* по сравнению с ЕНВМР-2. Локальная биодоступность ВМР, которая определяется связыванием с компонентами внеклеточного матрикса, влияет на их остеоиндуктивные свойства *in vivo* [17, 30].

Модификация N-концевого фрагмента ВМР-7 повышает сродство белка к гепарину, однако влияние этих модификаций на остеогенную активность нового белка будет изучено в дальнейших опытах *in vivo*.

Авторы выражают благодарность др. Behrouz Vazivi за ценную поддержку в ходе выполнения проекта.

Проект поддержан грантом Пастеровского института Ирана.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kirker-Head C. A. 2000. Potential applications and delivery strategies for bone morphogenetic proteins. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **43**, 65–92.
2. Swencki-Underwood B., Mills J.K., Vennarini J., et al. 2008. Expression and characterization of a human BMP-7 variant with improved biochemical properties. *Protein Expr. Purif.* **57**, 312–319.
3. Dinopoulos H., Giannoudis P.V. 2007. (iv) The use of bone morphogenetic proteins (BMPs) in long-bone non-unions. *Curr. Orthopaed.* **21**, 268–279.
4. Anitua E., Sánchez M., Orive G., Andia I. 2008. Delivering growth factors for therapeutics. *Trends Pharmacol. Sci.* **29**, 37–41.
5. Jeon O., Song S.J., Yang H.S., Bhang S.-H., Kang S.-W., Sung M.A., Lee J.H., Kim B.-S. 2008. Long-term delivery enhances *in vivo* osteogenic efficacy of bone morphogenetic protein-2 compared to short-term delivery. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **369**, 774–780.
6. Zhu W., Kim J., Cheng C., Rawlins B.A., Boachie-Adjei O., Crystal R.G., Hidaka C. 2006. Noggin regulation of bone morphogenetic protein (BMP) 2/7 heterodimer activity *in vitro*. *Bone*. **39**, 61–71.
7. Han D., Liu W., Ao Q., Wang G. 2008. Optimal delivery systems for bone morphogenetic proteins in orthopedic applications should model initial tissue repair structures by using a heparin-incorporated fibrin-fibronectin matrix. *Med. Hypotheses.* **71**, 374–378.

8. Kübler N., Würzler K., Reuther J., Sieber E., Kirchner T., Seebald W. 2000. The influence of various factors on the bone forming properties of recombinant BMPs. *Mund Kiefer Gesichtschir.* **4**, 465–469.
9. Takada T., Katagiri T., Ifuku M., Morimura N., Kobayashi M., Hasegawa K., Ogamo A., Kamijo R. 2003. Sulfated polysaccharides enhance the biological activities of bone morphogenetic proteins. *J. Biol. Chem.* **278**, 43229.
10. Irie A., Takami M., Kubo H., Sekino-Suzuki N., Kasahara K., Sanai Y. 2007. Heparin enhances osteoclastic bone resorption by inhibiting osteoprotegerin activity. *Bone.* **41**, 165–174.
11. Lin H., Zhao Y., Sun W., Chen B., Zhang J., Zhao W., Xiao Z., Dai J. 2008. The effect of crosslinking heparin to demineralized bone matrix on mechanical strength and specific binding to human bone morphogenetic protein-2. *Biomaterials.* **29**, 1189–1197.
12. Schmoekel H.G., Weber F.E., Schense J.C., Grätz K.W., Schwalder P., Hubbell J.A. 2005. Bone repair with a form of BMP-2 engineered for incorporation into fibrin cell in-growth matrices. *Biotechnol. Bioeng.* **89**, 253–262.
13. Johnson Z., Proudfoot A., Handel T. 2005. Interaction of chemokines and glycosaminoglycans: a new twist in the regulation of chemokine function with opportunities for therapeutic intervention. *Cytokine Growth Factor Rev.* **16**, 625–636.
14. Najjam S., Mulloy B., Theze J., Gordon M., Gibbs R., Rider C.C. 1998. Further characterization of the binding of human recombinant interleukin 2 to heparin and identification of putative binding sites. *Glycobiology.* **8**, 509.
15. Ruppert R., Hoffmann E., Seebald W. 1996. Human bone morphogenetic protein 2 contains a heparin-binding site which modifies its biological activity. *Eur. J. Biochem.* **237**, 295–302.
16. Würzler K., Emmert J., Eichelsbacher F., Kübler N., Seebald W., Reuther J. 2004. Evaluation of osteoinductive potency of genetically modified BMP-2 variations. *J. Oral. Maxillofac. Surg.* **8**, 83–92.
17. Depprich R., Handschel J., Seebald W., Kübler N., Würzler K. 2005. Comparison of the osteogenic activity of bone morphogenetic protein (BMP) mutants. *J. Oral. Maxillofac. Surg.* **9**, 363–368.
18. Kübler N., Würzler K., Reuther J., Faller G., Sieber E., Kirchner T., Seebald W. 1999. EHBMP-2. The first BMP-variant with osteoinductive properties. *Mund Kiefer Gesichtschir.* **3**, 134–139.
19. Vukicevic S., Sampath K.T. 2002. Bone morphogenetic proteins: from laboratory to clinical practice. Birkhäuser, Switzerland.
20. Irie A., Habuchi H., Kimata K., Sanai Y. 2003. Heparan sulfate is required for bone morphogenetic protein-7 signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **308**, 858–865.
21. Guermeur Y. 1997. Combinaison de classifieurs statistiques, Application a la prediction de structure secondaire des proteines., Ph.D. thesis, University of Paris 6.
22. Mahoney D.J., Whittle J.D., Milner C.M., Clark S.J., Mulloy B., Buttle D.J., Jones G.C., Day A.J., Short R.D. 2004. A method for the non-covalent immobilization of heparin to surfaces. *Anal. Biochem.* **330**, 123–129.
23. Di Liddo R., Grandi C., Venturini M., Dalzoppo D., Negro A., Conconi M., Parnigotto P. 2010. Recombinant human TAT-OP1 to enhance NGF neurogenic potential: preliminary studies on PC12 cells. *Protein Eng. Des. Sel.* **23**, 889.
24. Israel D.I., Nove J., Kerns K.M., Moutsatsos I.K., Kaufman R.J. 1992. Expression and characterization of bone morphogenetic protein-2 in Chinese hamster ovary cells. *Growth Factors.* **7**, 139–150.
25. Sampath T.K., Maliakal J., Hauschka P., et al. 1992. Recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1) induces new bone formation *in vivo* with a specific activity comparable with natural bovine osteogenic protein and stimulates osteoblast proliferation and differentiation *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **267**, 20352.
26. Bustos-Valenzuela J., Halcsik E., Bassi E., Demasi M., Granjeiro J., Sogayar M. 2010. Expression, purification, bioactivity, and partial characterization of a recombinant human bone morphogenetic protein-7 produced in human 293T cells. *Mol. Biotechnol.* **46**, 118–126.
27. Zhao B., Katagiri T., Toyoda H., et al. 2006. Heparin potentiates the *in vivo* ectopic bone formation induced by bone morphogenetic protein-2. *J. Biol. Chem.* **281**, 23246–23253.
28. Najjam S., Gibbs R.V., Gordon M.Y., Rider C.C. 1997. Characterization of human recombinant interleukin 2 binding to heparin and heparan sulfate using an ELISA approach. *Cytokine.* **9**, 1013–1022.
29. Fisher M.C., Li Y., Seghatoleslami M.R., Dealy C.N., Kosher R.A. 2006. Heparan sulfate proteoglycans including syndecan-3 modulate BMP activity during limb cartilage differentiation. *Matrix Biol.* **25**, 27–39.
30. Reddi A.H. 2001. Interplay between bone morphogenetic proteins and cognate binding proteins in bone and cartilage development: noggin, chordin and DAN. *Arthritis. Res.* **3**, 1–5.