

Плазмідний вектор для доставки гена препроінсуліну людини в клітини ссавців

О. К. Топорова, С. Д. Кириленко, Д. М. Іродов, В. А. Кордюм

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

toporova@imbg.org.ua

Сконструйовано еукаріотний вектор експресії гена препроінсуліну людини для подальшої доставки у неендокринні клітини ссавців in vitro та in vivo з метою розробки експериментальної генної терапії діабету 1-го типу. Векторна конструкція складається з двох незалежних модулів: послідовності бактеріальної плазміди, що дозволяє їй реплікуватися у клітинах Escherichia coli, і експресійної касети з цільовим та маркерним генами, фланкованої інвертованими термінальними повторидами аденоасоційованого вірусу людини. Для забезпечення конститутивної експресії гена препроінсуліну використано промотор ранніх генів цитомегаловірусу людини. Для посилення експресії цільового трансгена у вектор субклонували енхансер 1 вірусу гепатиту В. Після перенесення in vitro векторної конструкції у клітини ссавців різного походження одержано стабільні трансформанти і ПЛР-аналізом підтверджено наявність цільового трансгена препроінсуліну людини у трансформованих клітинах.

Ключові слова: ген препроінсуліну людини, вектор експресії, стабільні трансформанти.

Вступ. Ключовою проблемою генної терапії є система введення в клітини людини заданого генетичного матеріалу. Ця проблема складається з конкретних завдань, а саме — отримання цільового гена, створення експресійної генетичної конструкції, у якій ген є з'єднаним з відповідними регуляторними елементами, розробка засобів ефективної доставки гена в клітини-мішені [1]. Методи доставки генетичного матеріалу за типом векторної системи можна класифікувати як вірусні та невірусні [2]. Використання вірусних векторів, а саме — ретровірусів, аденовірусів, герпесвірусів та ін., має низку переваг, до яких можна віднести їхню здатність ефективно трансфікувати велику кількість клітин (а в деяких випадках тривало експресувати чужорідні гени), тропізм і стійкість до деградації лізосомами [3—6]. За минуле 10-ліття затверджено біля 1290 протоколів клінічних випробувань з генної терапії, більше 870 з них передбачають

вірусну трансфекцію, приблизно 70 % вірусних систем перенесення засновані на використанні адено- та ретровірусних векторів (таблиця).

Однак використання вірусних векторів поставило питання, пов'язані з безпекою таких систем для людини. У першу чергу це стосується потенційної туморогенності ретровірусів, а також можливої активації ними онкогенів або інактивації генів — супресорів злоякісної трансформації у клітинах-мішенях через здатність ретровірусних векторів неспецифічно інтегрувати у геном реципієнтних клітин [7]. При застосуванні найживаніших рекомбінантних аденовірусних векторів спостерігається швидке зниження експресії цільового гена внаслідок високої імуногенності самих векторів (імунна відповідь розвивається після 2—3 ін'єкцій) [8—10]. Введення аденовірусних векторів пацієнтам зазвичай супроводжується симптомами, що є характерними для гострих респіраторних вірусних інфекцій, внаслідок чого утруднюється проведення повторних курсів генної терапії [11]. Останніми

Кількісний розподіл затверджених протоколів клінічних випробувань з генної терапії за типом використаних векторних систем (www.wiley.co.uk/genmed/clinical)

Векторні системи	Клінічні протоколи	
	%	Кількість
Аденовіруси	26	322
Ретровіруси	23	293
«Naked» плазмідна ДНК	18	230
Ліпофекція	7,9	99
Віруси вакцин	7	88
Поксвіруси	6,8	85
Аденоасоційовані віруси	3,7	46
Герпесвіруси	3,4	43
РНК-доставка	1,3	16
Інші	2,4	31

роками одержано повідомлення про декілька летальних випадків під час клінічних випробувань різних генотерапевтичних протоколів, у яких використовували вірусні вектори [12]. Це призвело до обмеження їхнього застосування і пошуку альтернативних невірусних систем для доставки генів

Нашу роботу спрямовано на розробку саме невірусних засобів перенесення генів, що мають бути впроваджені в експериментальній генній терапії тяжкої патології мультифакторної природи — діабету 1-го типу. Конструювання вектора експресії гена інсуліну людини та його випробування у трансфекційних експериментах *in vitro* є першим етапом цієї роботи. Враховуючи вищезазначені недоліки вірусних векторних систем, ми мали за мету створити невірусні експресійні вектори для переносу цільових генів у клітини ссавців [13, 14]. Дана стаття представляє результати конструювання плазмідного вектора експресії повнорозмірного гена препроінсуліну людини для подальшої доставки у неендокринні клітини ссавців *in vitro* та *in vivo*.

Матеріали і методи. Реактиви. В роботі використано реактиви фірм «Sigma» (США), «Aldrich» (США), «Amersham-Pharmacia Biotech» (Швеція) і вітчизняного виробництва кваліфікації о. с. ч. і х. ч.; ферменти для генно-інженерних робіт виробництва фірми «MBI Fermentas» (Литва).

Дизайн сконструйованих рекомбінантних молекул та стратегію етапів молекулярного субклонування розробляли з використанням комплексу програм Vector NTI та баз даних серверу «National Center for Biotechnology Information».

Плазмідні і штами *Escherichia coli*. Рекомбінантну плазмідну рНВ320 (плазмідна рВР322, яка містить повну послідовність вірусу гепатиту В) люб'язно надано у попередні роки Е. Я. Греном (Інститут органічного синтезу АН Латвії). Плазмідну рTR-UF одержано від С. Золотухіна (Gene Therapy Center Vector Core Lab, USA), плазмідну рBlueScriptSK+ — від фірми «Stratagene» (США). Всі плазмідні, що містять інвертовані термінальні повтори аденоасоційованого вірусу, підтримувалися в клітинах *E. coli* штаму Sure2 (*e14 (McrA) Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 (Kan^r) uvrC [F' proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tet^r) Amy Cam^r]*) («Stratagene»). Проміжні плазмідні конструкції підтримувалися у клітинах штаму DH5a (*f80dlacZΔM15, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17 (rK^r mK^r), supE44, relA1, deoR, Δ(lacZYA-argF)U196*) («Life Technologies», Велика Британія).

Компетентні клітини *E. coli* одержували і трансформували згідно з [15]. Плазмідну ДНК виділяли методом лужного лізису з депротейнізацією фенолом і хлороформом відповідно до методів, описаних Маніатісом та ін. [15]. Електрофоретичний аналіз та елюцію фрагментів ДНК з гелю проводили згідно з [15].

Для експериментів *in vitro* використано клітинні лінії миші (BALB/3T3 clon A31 — клітини ембріонального походження, L-M-TK⁻, APRT⁻ — фібробластоподібні клітини), свині (SPEV — клітини нирки ембріона), хом'яка (CHO-K1 — епітеліоподібні клітини яєчника) та клітинні лінії людини (HeLa — карцинома шийки матки, Her-2 — епідермоїдна карцинома гортані). Клітини отримано з російської колекції клітинних культур (Санкт-Петербург). Клітини культивували при температурі 37 °С в атмосфері, що містила 5 % CO₂, на поживних середовищах F10 («Sigma») або DMEM («Sigma»), до складу яких входило 10 % ембріональної телячої сироватки («Геном», Україна). У середовище додавали 100 ОД/мл пеніциліну та 100 мкг/мл стрептоміцину (Київмедпрепарат, Україна).

Токсичність трансфекційних препаратів ДНК визначали за допомогою тест-набору CellTiter 96R («Promega», США).

Одержання стабільних трансформантів. Трансфекцію проводили, як описано в [13, 14]. Час контакту клітин з трансформуючою сумішшю складав 1 год 30 хв при температурі 37 °С, після

чого зазначену суміш замінювали на ростове середовище. Надалі клітини культивували протягом 72 год і переводили у селективні умови. Селективне середовище містило 20 % ембріональної телячої сироватки та 1000 мкг/мл генетицину (антибіотик G-418, «MP Biomedicals»).

Сумарну ДНК з клітин стабільних трансформантів виділяли, використовуючи Genomic DNA purification Kit («Fermentas», Литва), згідно з рекомендаціями виробника. Концентрацію ДНК визначали флуориметрично за допомогою Hoefer™ DNA Quant™ 200 Fluorometer («Amersham Biosciences», США).

Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) проводили у класичному варіанті. Реакційна суміш (25 мкл) містила: 2,5 мкл 10-кратного буфера для Таq-полімерази, 1,5 мМ MgCl₂, 0,2 мМ dNTP («MBI Fermentas»), 1,0 од. Таq-полімерази («MBI Fermentas»), по 15 пмоль відповідних праймерів, 2 мкл (100 нг) водного розчину сумарної ДНК, воду до кінцевого об'єму. Ампліфікацію фрагмента гена препроінсуліну людини здійснювали на ДНК-ампліфікаторі Biometra Personal Cycler (Швеція). Після завершення ПЛР продукти ампліфікації визначали методом електрофорезу в 1 %-му агарозному гелі. В позитивних пробах на гелі виявлялася специфічна смуга, що відповідала ампліфікованому фрагменту ДНК розміром 461 п. н. У негативних пробах такої смуги не виявлено. Випадків появи специфічних смуг у негативних контролях і їхньої відсутності у позитивних контролях не було.

Результати і обговорення. Як відомо, діабет 1-го типу є аутоімунним захворюванням із прогресуючою деструкцією β-клітин підшлункової залози та розвитком абсолютної інсулінової недостатності [16]. Радикальне лікування можна здійснити тільки за допомогою сучасних технологій генної (або генно-клітинної) терапії. Стратегія нашої розробки замісної генної терапії ІЗЦД базується на створенні безпечної невірусної векторної системи, яка забезпечуватиме ектопічну конститутивну експресію повнорозмірного гена препроінсуліну людини в ендокринних клітинах.

Використання плазмідних ДНК як експресуючих векторів дозволяє переносити повнорозмірні функціональні гени у клітини-мішені [17], але не забезпечує довготривалого функціонування цільового трансгена. Ми розробили інтегративну конструкцію для переносу гена препроінсуліну людини в клітини широкого кола хазяїв, у якій використано

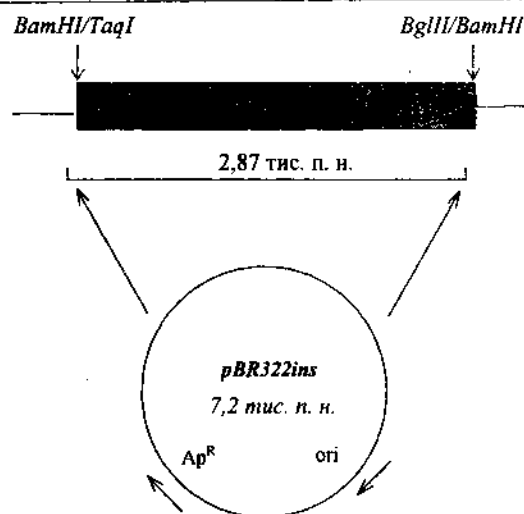


Рис. 1. Карта-схема плазмідної молекули *pBR322ins*

інвертовані термінальні повтори аденоасоційованого вірусу (ААВ, субтип 2), що є ключовими елементами для інтеграції ААВ у геном хазяїна. Показано, що ці паліндромні послідовності є мінімальними *цис*-діючими елементами, суттєво необхідними для вбудовування ДНК вірусу у геном хазяїна [18, 19]. Дизайн векторної молекули передбачає наявність двох незалежних модулів у єдиній конструкції: послідовності бактеріальної плазмідної молекули, що дозволяє їй реплікуватися у клітинах *E. coli*, та послідовності експресійної касети з цільовим та маркерним геном, фланкованою інвертованими термінальними повторами аденоасоційованого вірусу людини.

Джерелом гена препроінсуліну людини (*ins*) для його подальшого субклонування є рекомбінантна плазмідна молекула *pBR322ins*, схематичне зображення якої наведено на рис. 1. Повнорозмірний ген інсуліну людини клоновано в *BamHI* сайт плазмідної молекули *pBR322* у складі фрагмента геному довжиною 2870 п. н. в оточенні фланкуючих послідовностей, з 5'-кінця якого знаходиться частина власної регуляторної області гена, що складає 72 п. н. [20, 21]. Дизайн заданого вектора передбачає одержання конструкції для конститутивного синтезу цільового трансгена. Для цього необхідно максимально видалити фланкуючі ділянки геному людини з клонованого фрагмента. Ген препроінсуліну людини з мінімальними 5'- та 3'-оточуючими ділянками субклонували в два етапи. На першому — з плазмідної молекули *pBRins* (рис. 1) вилучили *HincII-EcoRI* фрагмент довжиною 3064 п. н. і по сайтах *SmaI-EcoRI* вбудували в плазмідну молекулу *pBlueScriptSK+*, на друго-

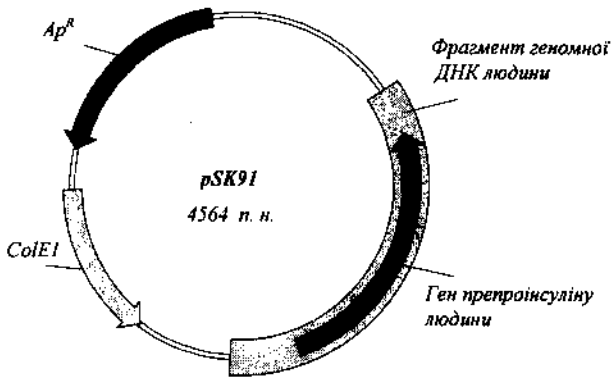


Рис. 2. Карта-схема плазмиди *pSK91*

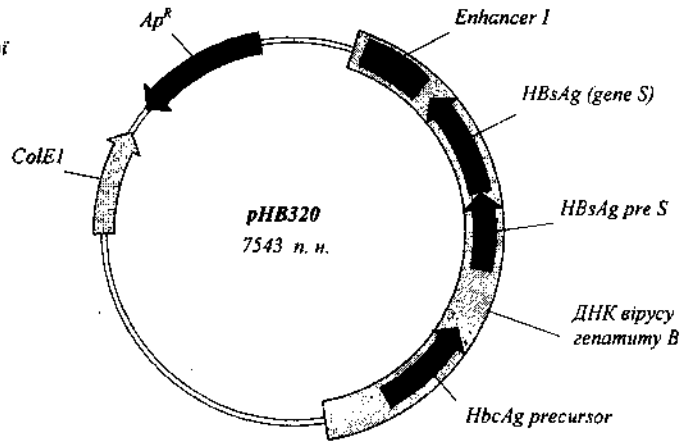


Рис. 3. Карта-схема плазмиди *pHB320*

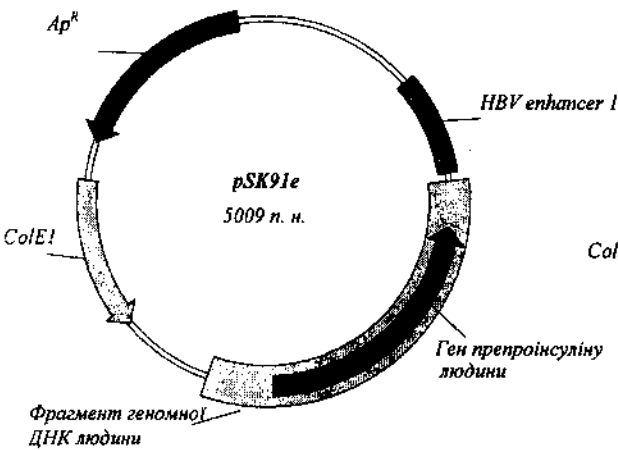


Рис. 4. Карта-схема плазмиди *pSK91e*, що містить ген пре-проінсуліну людини та ехансер 1 вірусу гепатиту В

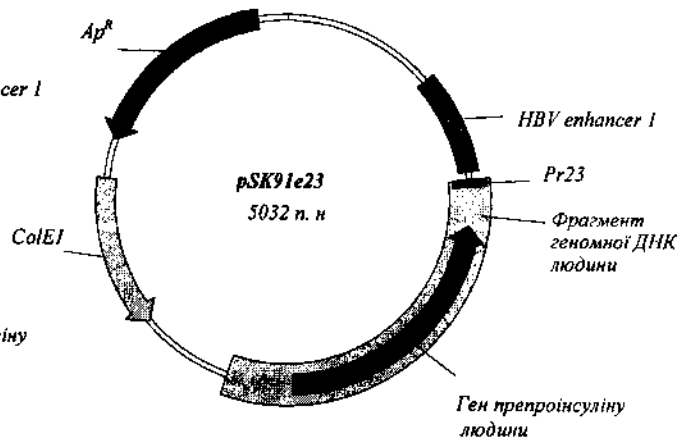


Рис. 5. Карта-схема плазмиди *pSK 91e-ad*

му — позбавлялися *SphI-EcoRI* ділянки розміром 1444 п. н. і кінці вектора після затуплення T4 ДНК-полімеразаю (сайт *EcoRI* був добудований, а *SphI* — відщеплений) лігували. Така проміжна конструкція *pSK91*, яка містить у своєму полілінкері фрагмент геномної ДНК людини довжиною 1615 п. н. з геном препроінсуліну, виявилася дуже зручною для подальших маніпуляцій (рис. 2).

Маючи на увазі подальшу доставку векторних молекул у клітини печінки *in situ*, при конструюванні цільової плазмиди ми використали ехансерну послідовність геному гепатотропного вірусу гепатиту В (субтип ауw) для посилення експресії гена препроінсуліну. Ехансер 1 (*enh 1*), локалізований між відкритою рамкою зчитування поверхневого антигену всередині Р-області, починається перед Х-областю і частково з нею перекри-

вається. Фрагмент *enh 1* (437 п. н.) вилучали з плазмиди *pHB320* (рис. 3) за *BamHI-HpaI* сайтами рестрикції. Його кінці добудовували фрагментом Кльонова ДНК-полімерази I *E. coli*. Векторну ДНК *pSK91* гідролізували рестриктазою *Sall* і після обробки фрагментом Кльонова та дефосфорилування субклонували *enh 1* (рис. 4). Аналіз одержаних клонів виявив наявність рекомбінантних плазмідних ДНК з одиничною послідовністю *enh 1*. За результатами рестрикційного аналізу рекомбінантної молекули та сиквенування клонованого фрагмента показано, що плазмиди *pSK91* містить одну копію послідовності ехансера 1, *BamHI* сайт якого знаходиться з 3'-кінця полілінкера (даних не наведено).

Для забезпечення можливості тестування введеного у клітини трансгена за допомогою ПЛР у

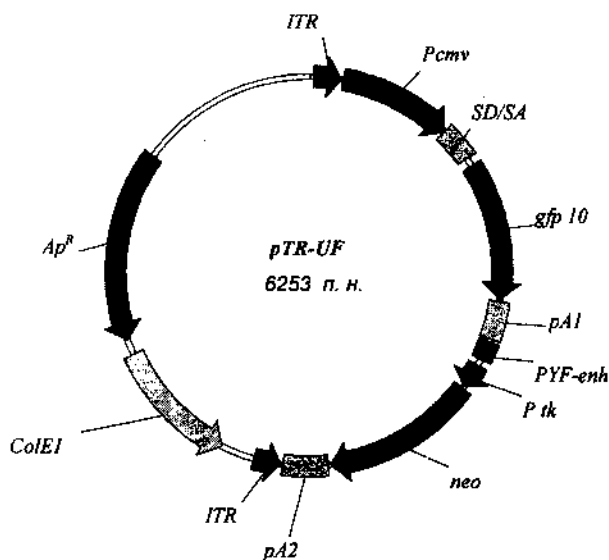


Рис. 6. Карта-схема плазмиди *pTR-UF*. ITR — інвертований кінцевий повтор AAV; *P_{cmv}* — промотор/енхансер ранніх генів цитомегаловірусу людини; SD/SA — донор/акцептор сплайсингу; *gfp 10* — ген зеленого флуоресцентного білка; *pA1*, *pA2* — сигнали поліаденілювання; *neo* — ген неоміцинофосфотрансферази

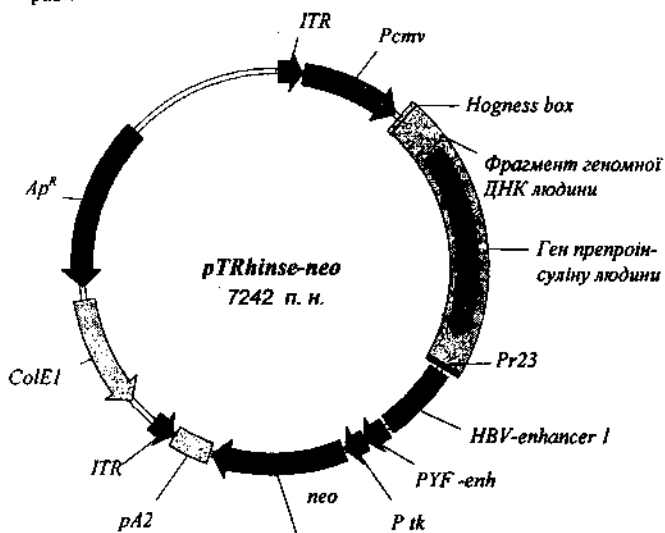


Рис. 7. Карта-схема плазмиди *pTRrhinse-neo*

проміжну плазмиду *pSK91e* вбудували синтезовану послідовність (Pr23), що не має гомології з послідовністю геномів ссавців, клітини яких передбачено використати в експериментах *in vitro*, *ex vivo* та *in situ*. Синтезований фрагмент



вбудували в полілінкер плазмиди *pSK91e*, не порушуючи цілісності гена препроінсуліну (рис. 5).

Проміжні плазмиди використано для подальшого конструювання рекомбінантного вектора з геном препроінсуліну людини *pTRrhins-neo* та вектора, що містить послідовність *ins/enh 1 — pTRrhinse-neo*. Векторну основу цільової конструкції складала плазмиди *pTR-UF* (рис. 6), створена на базі геному аденоасоційованого вірусу, з якого було вилучено структурні гени та на їхнє місце вбудовано ген резистентності до антибіотика G-418 та ген зеленого флуоресцентного білка.

Цільові вектори для гена препроінсуліну людини конструювали з використанням двох проміжних рекомбінантних плазмід *pSK91* та *pSK91e23*. Із складу базової плазмиди *pTR-UF* вилучали перший репортерний ген *gfp* неповним гідролізом рестриктазами *NotI* і *SalI*, а замість цього фрагмента вбудували послідовність гена препроінсуліну, вирізану за відповідними сайтами *NotI-SalI* із плазмиди *pSK91*. Таким чином, перша цільова векторна плазмиди *pTRrhins-neo* містить повнорозмірний ген препроінсуліну людини під регуляцією промотору ранніх генів цитомегаловірусу та репортерний ген неоміцинофосфотрансферази (стійкість до антибіотика G-418). Другу векторну конструкцію одержано переклоуванням *XbaI-XhoI* фрагмента *pSK91e23*, що містить ген препроінсуліну та енхансер 1 вірусу гепатиту B, у векторну ДНК *pTR-UF*, з якої вилучено ген *gfp* за умов повного гідролізу рестриктазою *XbaI* та неповного гідролізу *XhoI* (рис. 7). Склад експресійної касети плазмиди *pTRrhinse-neo* відрізняється від *pTRrhins-neo* наявністю енхансера 1 вірусу гепатиту B, що, як ми передбачаємо, може відігравати ключову роль при використанні клітин печінки як органа-мішені для ектопічної експресії цільового трансгена.

Одержані цільові конструкції містять інвертовані термінальні повтори аденоасоційованого вірусу — паліндромні послідовності довжиною 145 п. н. Плазмиди з такими елементами є дуже нестабільними і не можуть підтримуватися в клітинах більшості штамів *E. coli*. Ми підтримували їх у клітинах штаму *Sure2 E. coli*, створеного фірмою «Stratagene» для конструкцій, що містять паліндромні елементи. Використання інших штамів для трансформації нашими векторними плазмидами спричинювало вищеплення різної довжини фрагментів переважно правого інвертованого повтору (даних не наведено).

Трансфекція культивованих клітин ссавців комплексами ДНК—поліетиленімін (PEI). Опти-

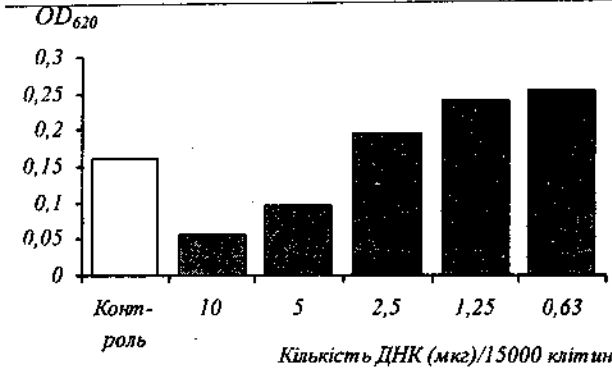


Рис. 8. Результати тестування життєздатності клітин після трансфекції препаратами плазмідної ДНК *pTRhinse-neo* у комплексі з поліетиленіміном

проліферацію клітин CellTiter 96, який широко використовують у клітинній біології для вивчення цитотоксичних агентів (рис. 8, 9).

Ми трансфікували *in vitro* ДНК *pTRhinse-neo* у клітини ссавців різного видового походження: миші, свині, хом'яка та клітинні лінії людини HeLa (карцинома шийки матки), Нер-2 (епідермоїдна карцинома гортані). Селекцією на антибіотику G-418 одержано стабільні трансформанти всіх вищезазначених ліній. На рис. 10 представлено результати відбору стабільних трансформантів L-M-ТК⁺ після трансфекції *pTRhinse-neo*. Ефективність трансформації при переносі плазмідної ДНК у ком-

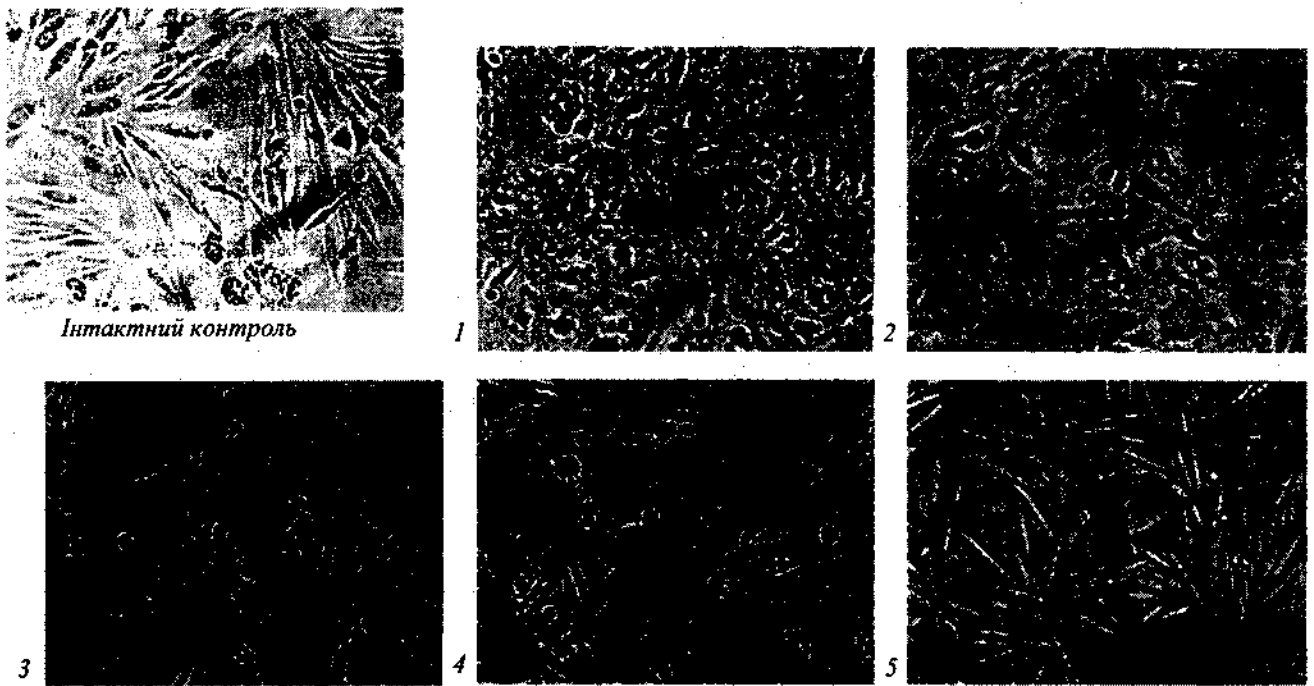


Рис. 9. Фотографії клітин лінії L-M-ТК⁺ під час тесту на проліферацію через 24 год після трансфекції (15000 клітин на лунку): 1 — 10 мкг ДНК; 2 — 5 мкг ДНК; 3 — 2,5 мкг ДНК; 4 — 1 мкг ДНК; 5 — 0,5 мкг ДНК

мальним засобом переносу генів виявилось використання розгалуженого ПЕІ з молекулярною масою 25 кДа як трансфекційного реагенту [14]. Препарат ДНК/ПЕІ готували у масовому еквіваленті 1:2. Утворення комплексів ДНК з ПЕІ виявляли за затримкою міграції ДНК в 1 %-му агарозному гелі при електрофорезі (методом гелі-ретардації). Встановлено оптимальні дози векторної ДНК, яку вводили у комплексі з ПЕІ: 10 мкг ДНК на 500000 клітин при переносі *in vitro*. Оскільки ефективність переносу залежить від ступеня токсичності трансфекційного матеріалу, ми перевіряли цитотоксичність препаратів ДНК за допомогою тесту на

плексі з ПЕІ досягала 30 % (клітини пухлинних ліній людини трансформувалися з більшою ефективністю, ніж інші). Ці дані свідчать про можливість використання даного вектора для переносу цільових генів у широке коло реципієнтних клітин ссавців різного походження.

Передбачаючи подальше випробування створеного вектора в експериментах на тваринах з модельним діабетом, ми вважали за необхідне визначити методом ПЛР, чи зберігається цільовий ген у трансформованих клітинах. Послідовність гена препроінсуліну людини високогомологічна послідовності гена препроінсуліну дослідних тварин, а та-

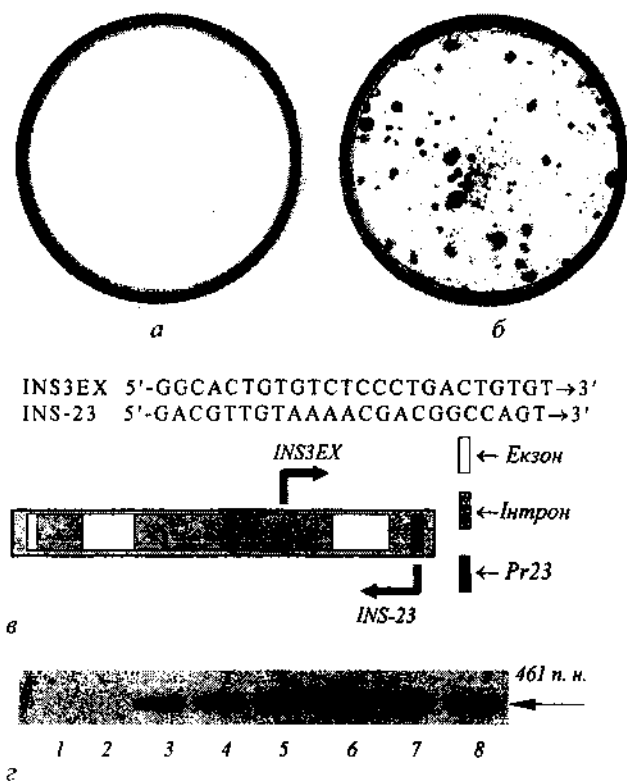


Рис. 10. Відбір стабільних трансформантів на селективному середовищі та виявлення наявності трансгена препроінсуліну людини в трансформованих клітинах: а — контрольні нетрансформовані клітини L-M-TK; б — клітини L-M-TK, трансформовані ДНК *pTRhinse-neo*; в — схема розташування праймерів на гені препроінсуліну людини відносно його структурної карти у складі плазміди *pTRhinse-neo*; г — електрофореграма продуктів ампліфікації фрагмента гена препроінсуліну людини після ПЛР сумарної ДНК стабільних трансформантів клітинних ліній різного видового походження (1 — негативний контроль; 2 — нетрансформовані клітини; 3 — SPEV; 4 — L-M-TK; 5 — CHO-K1; 6 — Hep-2; 7 — BALB/3T3; 8 — позитивний плазмідний контроль)

кож має високу внутрішню гомологію через присутність множинних коротких повторів. Наявність у векторі синтезованої послідовності дала змогу розрахувати пару праймерів INS3EX/INS-23 для тестування гена препроінсуліну людини за присутності генів препроінсуліну тварин різного видового походження. Структуру синтезованих олігонуклеотидних праймерів для проведення ПЛР наведено на рис. 10, в: місце відпаду праймера INS3EX розташоване на 3'-кінці ексона гена препроінсуліну, праймер INS-23 є гомологічним послідовності Pr23, яку було синтезовано та вбудовано у касету. Довжина очікуваного ПЛР-фрагмента складає 461 п. н. ПЛР-аналіз сумарної ДНК стабільних трансформантів виявив наявність трансгену препроінсуліну

в клітинах усіх досліджуваних ліній, про що свідчить очікувана смуга на електрофореграмі продуктів ПЛР-аналізу (рис. 11, в).

Висновки. Створено нову рекомбінантну плазмиду, яка містить повнорозмірний ген препроінсуліну людини в експресійній касеті, фланкованій інвертованими термінальними повторами аденоасоційованого вірусу.

Для посилення експресії цільового гена, який перебуває під регуляцією конститутивного тканинонеспцифічного промотору, в конструкцію клонувано енхансер 1 вірусу гепатиту В.

Експериментально доведено, що нова плазміда є вектором, який ефективно трансформує *in vitro* клітини ссавців різних видів і різного тканинного походження.

Розроблено праймери, які надійно визначають наявність трансгена препроінсуліну в клітинах усіх досліджуваних ліній.

Отримано стабільні лінії клітин ссавців різного видового походження, які містять у своєму геномі ген препроінсуліну людини.

О. К. Топорова, С. Д. Киряченко, Д. М. Иродов, В. А. Кордюм

Plasmid vector for the human preproinsulin gene delivery into mammalian cells

Summary

Eukaryotic expression vector for human preproinsulin gene has been constructed for further delivery into non-endocrine mammalian cells in vitro and in vivo for the development of experimental gene therapy for type 1 diabetes. Vector construction consists of two independent modules, namely, bacterial plasmid sequence that allows its replication in Escherichia coli cells, and expression cassette for the target and marker genes which is flanked by inverted terminal repeats of human adeno-associated virus. The human cytomegalovirus immediate-early promoter has been used to ensure the constitutive expression of human preproinsulin gene. The hepatitis B viral enhancer 1 was subcloned into cassette to increase the target transgene expression. After vector construction in vitro transfer into mammalian cells of different origin, the stable transformants were obtained and the availability of target human preproinsulin transgene in the transformed cells has been confirmed by PCR analysis.

Keywords: human preproinsulin gene, expression vector, stable transformants.

Е. К. Топорова, С. Д. Кириленко, Д. М. Иродов, В. А. Кордюм

Плазмидный вектор для доставки гена препроинсулина человека в клетки млекопитающих

Резюме

Сконструирован эукариотный вектор экспрессии гена препроинсулина человека для последующей доставки в неэндокринные клетки млекопитающих in vitro и in vivo с целью разработки экспериментальной генной терапии диабета 1-го типа. Век-

торная конструкция состоит из двух независимых модулей: последовательности бактериальной плазмиды, которая позволяет ей реплицироваться в клетках *Escherichia coli*, и экспрессионной кассеты с целевым и маркерным генами, фланкированной инвертированными терминальными повторами аденоассоциированного вируса человека. Для обеспечения конститутивной экспрессии гена препроинсулина использовали промотор ранних генов цитомегаловируса человека. Для усиления экспрессии целевого трансгена в вектор субклонировали энхансер I вируса гепатита В. После переноса *in vitro* векторной конструкции в клетки млекопитающих разного происхождения получены стабильные трансформанты и ПЦР-анализом подтверждена наличие целевого трансгена препроинсулина человека в трансформированных клетках.

Ключевые слова: ген препроинсулина человека, вектор экспрессии, стабильные трансформанты.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Strauss M., Barranger J. A. Concepts in gene therapy.—Berlin: DeGruyter, 1997.—553 p.
2. Hodgson C. P. The vector void in gene therapy // *Bio-Technology*.—1995.—13.—P. 222—225.
3. Relph K., Harrington K., Pandha H. Clinical review. Recent developments and current status of gene therapy using viral vectors in the United Kingdom // *BMJ*.—2004.—329.—P. 839—842.
4. Hurskainen H., Tuynela K., Turunen M., Vanninen R., Lehtolainen P., Paljarvi L., Sandmair A. M., Loimas S., Puranen P., Immonen A., Kossila M., Puranen M., Johansson R., Vapalahti M., Yla-Herttuala S. Thymidine kinase gene therapy for human malignant glioma, using replication-deficient retroviruses or adenoviruses // *Hum. Gene Ther.*—2000.—11.—P. 2197—2205.
5. St George J. A. Gene therapy progress and prospects: adenoviral vectors // *Gene Ther.*—2003.—10.—P. 1135—1141.
6. Hitt M. M., Graham F. L. Adenovirus vectors for human gene therapy // *Adv. Virus Res.*—2000.—55.—P. 479—505.
7. Schroder A. R., Shinn P., Chen H., Berry C., Ecker J. R., Bushman F. D. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots // *Cell*.—2002.—110.—P. 521—529.
8. Schagen F. H., Ossevoort M., Toes R. E., Hoeben R. Immune responses against adenoviral vectors and their transgene products: a review of strategies for evasion // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*—2004.—50.—P. 51—70.
9. Muruve D. A. The innate immune response to adenovirus vectors // *Hum. Gene Ther.*—2004.—15.—P. 1157—1166.
10. Smith T. A., Idamakanti N., Rollence M. L., Marshall-Neff J., Kim J., Mulgrew K., Nemerow G. R., Kaleko M., Stevenson S. C. Adenovirus serotype 5 fiber shaft influences *in vivo* gene transfer in mice // *Hum. Gene Ther.*—2003.—14.—P. 777—787.
11. Smith J. S., Tian J., Lozier J. N., Byrnes A. P. Severe pulmonary pathology after intravenous administration of vectors in cirrhotic rats // *Mol. Ther.*—2004.—9.—P. 932—941.
12. Hacein-Bey-Abina S., Von Kalle C., Schmidt M., McCormack M. P., Wulffraat N., Leboulch P., Lim A., Osborne C. S., Pawliuk R., Morillon E., Sorensen R., Forster A., Fraser P., Cohen J. I., de Saint B. G., Alexander I., Wintergerst U., Frebourg T., Aurias A., Stoppa-Lyonnet D., Romana S., Radford-Weiss I., Gross F., Valensi F., Delabesse E., Macintyre E., Sigaux F., Soulier J., Leiva L. E., Wissler M., Prinz C., Rabbitts T. H., Le Deist F., Fischer A., Cavazzana-Calvo M. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1 // *Science*.—2003.—302.—P. 415—419.
13. Кордюм В. А., Топорова О. К., Новікова С. М., Лихачева Л. І., Сухорада О. М., Рубан Т. А., Козел Ю. О., Потаненко Р. І., Гродов Д. М. Розробка підходів до генної терапії атеросклерозу // *Журн. АМН України*.—2004.—10, № 2.—С. 288—300.
14. Топорова Е. К., Новікова С. Н., Лихачева Л. И., Сухорада Е. М., Рубан Т. А., Козел Ю. М., Гродов Д. М., Кордюм В. А. Невиральная доставка гена *aroA1* человека в клетки млекопитающих *in vitro* и *in vivo* // *Биополимеры і клітина*.—2004.—20, № 1—2.—С. 25—32.
15. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*.—New York: Cold Spring Harbor Lab. press, 1989.
16. Stoll S. M., Calos M. P. Extrachromosomal plasmid vectors for gene therapy // *Curr. Opin. Mol. Ther.*—2002.—4.—P. 299—305.
17. Громнацкий Н. И. *Диабетология*.—М.: ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ, 2002.—254 с.
18. Yang C. C., Xiao X., Zhu X., Ansardi D. C., Epstein N. D., Frey M. R., Matera A. G., Samulski R. J. Cellular recombination pathways and viral terminal repeat hairpin structures are sufficient for adeno-associated virus integration *in vivo* and *in vitro* // *J. Virol.*—1997.—71.—P. 9231—9247.
19. Hui ser D., Heilbronn R. Adeno-associated virus integrates site-specifically into human chromosome 19 in either orientation and with equal kinetics and frequency // *J. Gen. Virol.*—2003.—84.—P. 133—137.
20. Незнанов Н. С., Трояновский Б. М., Гартель А. Л., Макарова И. В., Бендукідзе К. А., Газарян К. Г. Молекулярное клонирование гена инсулина человека // *Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология*.—1987.—№ 7.—С. 14—15.
21. Lukash L. L., Podolskaya S. V., Neborachko L. N., Sukhorada H. M., Varzanova I. S., Kordyum V. A. Expression of insulin gene introduced into embryonic human cells // *Advances in gene technology: Molecular biology of human genetic disease: Proc. Miami Bio/Technol. Eur. Symp. (Short Reports)*.—Monaco, 1994.—Vol. 5.—P. 62.

УДК 577.21

Надійшла до редакції 25.12.06