

Снижение концентрации глюкозы в системах *in vitro* и *in vivo* с помощью рекомбинантного вектора, несущего ген препроинсулина человека

Ф. Аджамиян, Е. М. Сухорада, Т. А. Рубан, Т. Г. Титок

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

*Изучена экспрессия рекомбинантного гена препроинсулина человека. Фрагмент геномной ДНК, содержащий последовательность гена препроинсулина без собственного промотора, переклонирован в векторную ДНК плазмиды pTR-UF под контролем цитомегаловирусного промотора. Осуществлено тестирование полученной рекомбинантной плазмидной ДНК: *in vitro* — в клетках культуры ткани Her-2 и *in vivo* — на стрептозотоциновых диабетических мышцах, а также ввода препарата в ткань печени. В результате наших экспериментов обнаружено снижение концентрации глюкозы как в клетках культуры ткани, так и в крови экспериментальных животных. Представленные данные, по мнению авторов, свидетельствуют о возможности наличия экспрессии гена препроинсулина.*

Плаزمида *pTR-ins*, схема которой представлена на рис. 1, получена на основе плазмиды *pTR-UF* [1]. Данная плаزمида благодаря своим регуляторным последовательностям, приведенным на рис. 2, может быть полезной для клонирования экзогенного материала и дальнейшей его экспрессии в культуре клеток и/или на уровне экспериментальных животных. Была изучена экспрессия экзогенного гена *gfp 10*, находящегося под влиянием регуляторных последовательностей данной плазмиды [1]. Поэтому для клонирования экзогенного гена препроинсулина и изучения дальнейшей его экспрессии было решено использовать данную плазмиду в качестве вектора.

Фрагмент вектора длиной 4933 п. н. получен по рестрикционным сайтам *NotI/SalI*. Фрагмент геномной ДНК (1620 п. н.), содержащий ген препроинсулина человека без собственного промотора, также был вырезан по рестрикционным сайтам *NotI/SalI* из плазмиды *pSK91*, полученной ранее С. Д. Кириленко (отдел регуляторных механизмов клетки Института молекулярной биологии и генетики НАН Украины). Схема конструирования ре-

комбинантной плазмиды для изучения возможной экспрессии гена инсулина представлена на рис. 2.

Лигирование вектора с фрагментом, содержащим ген инсулина, осуществляли с помощью T4-ДНК лигазы стандартным методом [2]. Трансформацию рекомбинантной ДНК, получение компетентных бактериальных клеток и отбор клонов после трансформации проводили методом, описанным в [3], в штамме JM109 *Escherichia coli*. Плазмиды выделяли по методу [4]. Для конструирования рекомбинантных молекул использовали ферменты фирмы «Fermentas» (Латвия).

В результате экспериментов получен клон, содержащий ген инсулина, рестрикционная карта которого соответствует схеме клонирования, приведенной на рис. 2. Данную рекомбинантную молекулу проверяли как в культуре клеток, так и на мышцах.

В работе использовали линию клеток Her-2 (культура клеток из карциномы гортани), полученную нами из Ассоциации клеточных культур (Россия, Санкт-Петербург). Клетки культивировали в среде Игла с добавлением 10 % сыворотки крупного рогатого скота. Для опыта клетки рассеивали в пластиковые чашки диаметром 35 мм по 200 тыс. на вариант. Клетки культивировали в атмосфере

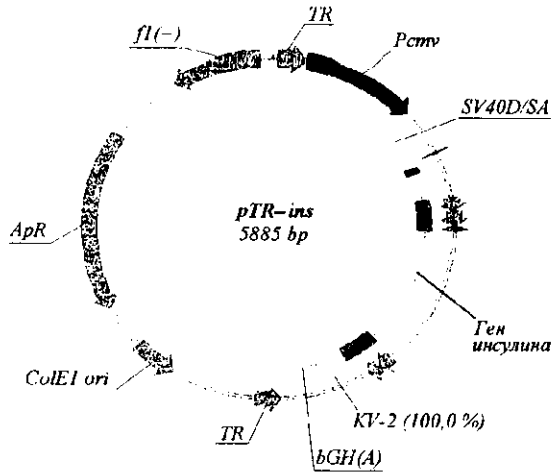


Рис. 1. Карта плазмиды *pTR-ins*

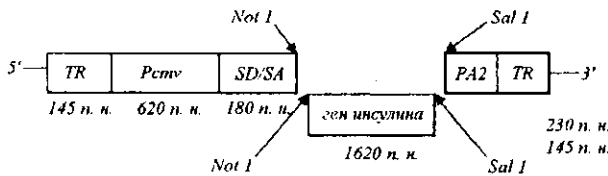


Рис. 2. Схема клонирования структурной части гена инсулина в AAV-кассету вектора *pTR-UF*. TR — терминальный повтор аденоассоциированного вируса; *Pcmv* — промотор цитомегаловируса; *SD/BA* — донорные и акцепторные сигналы сплайсинга гена вируса SV40; PA2 — сайт полиаденилирования

5 % CO₂ и 80 % влажности при температуре 37 °С. Концентрация трансформирующей ДНК составляла 10 мкг/мл. Трансформацию клеток осуществляли методом кальций-фосфатного преципитата [5] через 24 ч после посева. Изменения концентрации глюкозы под действием гена инсулина определяли в пробах культуральной среды стандартным глюкозооксидазным методом (Диаглюк-2). Для этого пробы культуральной среды отбирали через 5, 6, 7, 8 и 10 сут после трансфекции клеток. Перед отбором проб клетки промывали дважды средой Игла и затем добавляли среду Игла без сыворотки с увеличенным содержанием глюкозы (500 мг%). В качестве контроля использовали плазмиду *pTR-UF* (без гена инсулина). Уровень экспрессии гена ин-

сулина определяли по уровню концентрации глюкозы относительно контроля, результаты представлен на рис. 3.

Экспрессию гена препроинсулина *in vivo* исследовали на диабетических мышях линии C₅₇Bl/6J, полученных инъекцией стрептозотоцина в течение 5 дней по 40 мг/кг живого веса в день. Метод получения мышей, страдающих диабетом, описан в [6]. Плазмиды, включенные в липосомы, вводили в печень диабетическим мышам через 2 недели после первой инъекции стрептозотоцина. Липосомы состава фосфатидилхолин : ХС : дицетилфосфат (7 : 2 : 1) готовили методом упаривания с обращением фаз, ДНК заключали в них методом Ca-fusion [7]. Общая концентрация введенной ДНК плазмид *pTR-ins* и *pTR-UF* (контроль) была 24 мг. Экспрессию гена инсулина определяли по изменению концентрации глюкозы в крови животных, начиная с 6 ч после введения, затем через 24 ч в течение 7 сут. Максимальный эффект наблюдался через 24—36 ч после инъекции. Через 48 ч концентрация глюкозы возрастает, но не достигает исходного уровня (рис. 4). На наш взгляд, падение уровня глюкозы в крови контрольных мышей через 6 ч после введения физиологического раствора или вектора без гена инсулина может быть следствием стрессовой реакции.

Таким образом, как на уровне клеток в культуре, так и на организменном уровне у диабетических мышей показано снижение концентрации

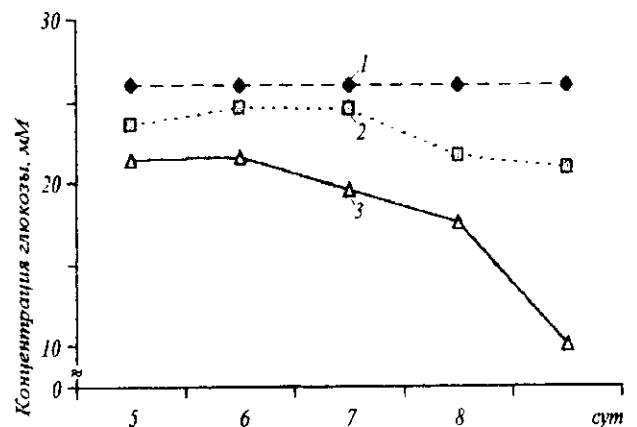


Рис. 3. Уровень концентрации глюкозы в клетках HEP-2 после введения в них плазмидных ДНК: 1 — среда; 2 — *pTR-UF*; 3 — *pTR-ins* (по оси ординат — концентрация глюкозы)

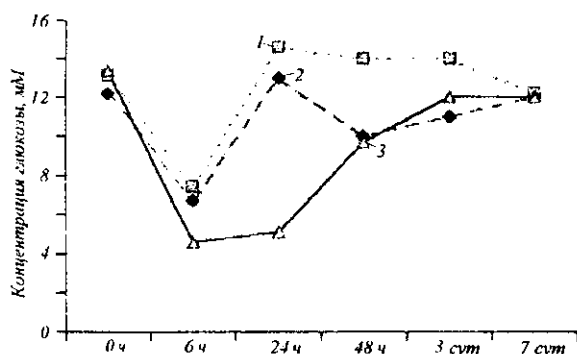


Рис. 4. Динамика гликемии у диабетических СТЦ мышей линии C₅₇Bl/6J после введения плазмид: 1 — после введения физиологического раствора (контроль 1); 2 — после введения pTR-UF (контроль 2); 3 — после введения pTR-ins (по оси ординат — концентрация глюкозы)

глюкозы, что может быть следствием экспрессии гена инсулина человека под контролем цитомегаловирусного промотора.

Ф. Аджамян, О. М. Сухорада, Т. А. Рубан, Т. Г. Титок

Зниження концентрації глюкози в системах *in vitro* і *in vivo* за допомогою рекомбінантного вектора, який містить ген препроінсуліну людини

Резюме

Вивчено експресію рекомбінантного гена препроінсуліну людини. Фрагмент геномної ДНК, що вміщує послідовність гена препроінсуліну без власного промотора, переклоновано у векторну ДНК плазмиди pTR-UF під контролем цитомегаловірусного промотора. Здійснено тестування одержаної рекомбінантної плазмідної ДНК: *in vitro* — у клітинах культури Hep-2 і *in vivo* — на стрептозотоцинових діабетичних мишах, а також введення препарату в тканину печінки. В результаті

експериментів виявлено зниження концентрації глюкози як у клітинах культури тканини, так і в крові дослідних тварин. Наведені дані, на думку авторів, свідчать про можливість експресії гена препроінсуліну.

F. Ajamian, E. M. Suhorada, T. A. Ruban, T. A. Titok

Decrease of glucose level *in vitro* and *in vivo* by recombinant vector containing human preproinsulin gene

Summary

The expression of human preproinsulin gene was studied. The fragment of genomic DNA, containing the sequences of preproinsulin gene without its personal promoter was cloned in the vector plasmid DNA pTR-UF under control of cytomegalovirus promoter. The obtained recombinant plasmid DNA was tested *in vitro*, in Hep-2 of tissue culture and *in vivo* at streptozotocin diabetic mice by introducing the preparation into the liver. As a result of our experiment we found out the reduction of glucose level both in the cells of tissue culture and in the blood of the experimental animals. The presented results, in the author's opinion, evidence about the availability of the expression of the human preproinsulin gene.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Zolotukhin S., Potter M., William W., Hauswirth J. G., Muzyczka N. A humanized green fluorescent protein cDNA adapted for high level expression in mammalian cells // *J. Virol.*—1996.—70.—P. 4646—4654.
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. *Molecular cloning; A laboratory manual.*—New York: Cold Spring Harbor Lab. press, 1989.—456 p.
- Nishimura A., Morita M., Nishimura Y., Sugino Y. A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells // *Nucl. Acids Res.*—1990.—18—P. 6169.
- Kriey P., Melton D. *Promega Biotech. Catalogue.*—1985/1986.—p. DB3 DB3.
- Graham F. L., van der Eb A. J. Transformation of rat cells by human adenovirus 5 // *Virology.*—1973.—54.—P. 536—539.
- Титок Т. Г., Евсеєнко А. А., Аджаміян Ф., Кордюм В. А. Модели сахарного діабета, їх вибор і використання в експериментальних дослідженнях // *Биополимеры и клетка.*—1999.—15, № 2.—С. 103—108.
- Марголис Л. Б., Бергельсон Л. Д. Липосомы и их взаимодействие с клетками.—М.: Наука, 1986.—240 с.

УДК 571.21:616.379—008.64
Поступила в редакцию 19.05.99