

И. С. Варзанова, Л. Н. Неборачко, С. Н. Шишлевая, И. Е. Костецкий,
Т. В. Столяр, Е. М. Сухорада, Л. Л. Лукаш, В. А. Кордюм

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ МОДЕЛЬНОГО ГЕНА БАКТЕРИАЛЬНОЙ β -ГАЛАКТОЗИДАЗЫ В КУЛЬТУРЕ ФИБРОБЛАСТОВ МЫШИ И ПРИ ПРЯМОМ ВВЕДЕНИИ В ПЕЧЕНЬ ЖИВОТНОГО

На основе ДНК вируса гепатита В сконструирован вектор с модельным геном бактериальной β -галактозидазы. Показано отсутствие существенных отличий в уровне экспрессии гена *lacZ* *Escherichia coli*, находящегося под контролем промоторов *PbsA₂* вируса гепатита В и раннего промотора вируса SV40 в фибробластах мыши (клетки *Ltk*⁻). В то же время наблюдалась значительная разница в уровне экспрессии данного гена в составе вышеуказанных плазмид в клетках печени intactных мышей при введении генетического материала непосредственно в печень путем инъекции в составе липосом. Ген бактериальной β -галактозидазы, находящийся под контролем промотора гена поверхностного антигена вируса гепатита В, экспрессировался значительно эффективнее в этих клетках.

Введение. Диабет — одно из самых распространенных и тяжелых заболеваний. Использование генотерапевтических подходов, т. е. введение пациенту гена инсулина человека в составе молекулярной конструкции, способной функционировать в тех или иных клетках, позволит устранить генетический дефект при инсулинзависимом сахарном диабете. Ранее нами показано, что геномный ген инсулина человека, лишенный области, ответственной за тканеспецифичность, но сохранивший собственный промотор, находящийся в составе различных молекулярных конструкций, способен функционировать в различных культурах фибробластов человека и мыши. Белок — продукт данного гена секретировался в среду и обладал функциональной активностью [1]. Перспективным является изучение экспрессии данного гена не только в фибробластах, но и в других культурах клеток, а также в органах модельного животного.

Целью нашей работы является изучение экспрессии геномного гена инсулина человека в печени животного при прямой инъекции в составе липосом. На первом этапе работы сконструирован вектор на основе ДНК вируса гепатита В с модельным геном бактериальной β -галактозидазы и проведено сравнительное изучение его экспрессии в культуре фибробластов мыши и клетках печени intactного модельного животного — мыши.

Материалы и методы. Плазмиды: в работе использованы плазмиды *pLZ56* и *pHB320*. Плазмида *pLZ56* получена нами от В. Г. Коробко (Ин-т биоорг. химии им. М. М. Шемякина, Москва), содержит *lacZ*-ген *E. coli*, кодирующий синтез бактериальной β -галактозидазы и находящийся под контролем тандема ранних промоторов A_2 и A_3 фага T7. Плазмида *pHB320* получена от д-ра Э. Я. Грена (Ин-т орг. синтеза АН ЛатвССР, Рига). Она представляет собой *pBR322*, в *BamHI*-сайт которой введена полная копия ДНК вируса гепатита В.

Ферменты: рестрикционные эндонуклеазы, фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I получены из НПО «Фермент» ВНИИ прикл. энзимологии (Вильнюс). ДНК-лигаза фага T4 любезно предоставлена Б. М. Трояновским и Ю. И. Горловым (Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев).

Трансфекция: в экспериментах по трансфекции использовали культивируемые клетки мыши (линия *C3H Ltk*⁻), полученные из коллекции Ин-та вирусологии АМН СССР им. Д. И. Ивановского. Трансфекцию осуществляли кальций-фосфатным методом через трое суток после посева клеток в 50 мл стеклянных флаконах [2]. На один флакон вносили $1 \cdot 10^6$ клеток. Кальций-фосфатный преципитат содержал 10–20 мкг плазмидной ДНК. Клетки культивировали на среде Игла с добавлением 10 % сыворотки крупного рогатого скота. Через 72 ч после трансфекции культуральную среду сливали и монослой клеток отмывали буфером PBS. Клетки смывали со стекла

стеклянной палочкой и помещали в буфер FT. Содержание β -галактозидазы в клетках *Ltk*⁻ определяли по методу, рекомендованному фирмой «Pharmacia» (Швеция).

Эксперименты по определению содержания β -галактозидазы в клетках печени описаны нами ранее [3].

Результаты и обсуждение. В качестве вектора для экспрессии модельного гена бактериальной β -галактозидазы (*lacZ*-ген *E. coli*) в клетках печени мыши мы использовали ДНК вируса гепатита В. Источником такой ДНК служила плаزمида *pHB320*, ДНК которой содержала полную копию ДНК вируса гепатита В. Ген бактериальной β -галактозидазы без собственного промотора и с двумя ранними промото-

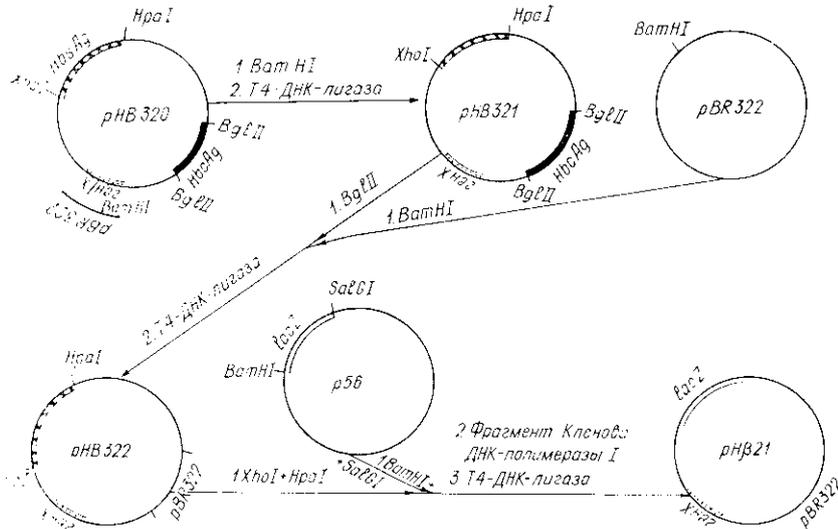


Рис. 1. Схема конструирования плазмиды *pHB21*, несущей ген бактериальной β -галактозидазы под контролем промотора гена поверхностного антигена вируса гепатита В
Fig. 1. Scheme for construction of plasmid *pHB21*, carrying bacterial β -galactosidase gene under control of promoter of surface antigen hepatitis B virus gene

рами фага T7 (A_2 и A_3) получен из ДНК плазмиды *pLZ56*. Схема конструирования приведена на рис. 1. Ген бактериальной β -галактозидазы был введен под промотор *HbsAg* вируса гепатита В. Выбор промотора осуществлен на основе литературных данных, из которых следует, что промотор *Hbs* антигена вируса гепатита В в 4,5—8 раз более активен в клетках гепатом человека, чем промотор *Hbc* антигена [4]. Кроме того, энхансеры, имеющиеся в составе ДНК вируса гепатита В, усиливают активность промотора поверхностного антигена вируса гепатита В в 20,9—22,3 раза, тогда как активность промотора внутреннего антигена — лишь в 2,3—7,9 раза [4]. Данные литературы о тканеспецифичности энхансеров вируса гепатита В противоречивы. Некоторые авторы считают, что они не тканеспецифичны [5]. Другие сообщают о том, что энхансеры вируса гепатита В функционируют только в клетках печени и для проявления их активности необходимы клеточные факторы [6]. При конструировании вектора нами были удалены гены поверхностного и внутреннего антигенов, сохранены энхансеры, усиливающие эффективность промотора *Hbs* антигена. Такие генноинженерные преобразования были направлены на то, чтобы сделать невозможной сборку вируса гепатита В в клетках печени, но обеспечить репликацию данной молекулярной конструкции и высокий уровень экспрессии модельного *lacZ*-гена *E. coli* под промотором гена *Hbs* антигена. Были сконструированы две плазмиды, названные *pHB19* (в ней ген β -галактозидазы находится под двумя промоторами — ранними A_2 и A_3 бактериофага T7 и промотором гена *Hbs* антигена) и *pHB21* (где сохранен только промотор гена *Hbs* антигена).

Экспрессию бактериальной β -галактозидазы в составе полученных молекулярных конструкций изучали как в неспецифических для вируса гепатита В клетках, в качестве которых были использованы фибробласты мыши (культура клеток *Ltk*⁻), так и специфические клетки мыши. Ген поверхностного антигена вируса гепатита В способен экспрессироваться в *Ltk*⁻-клетках, но с меньшей эффективностью (в 2—5 раз), чем в клетках различных гепатом [7].

Активность бактериальной β -галактозидазы определяли двумя независимыми методами: по эффективности расщепления субстрата О-нитрофенил- β -D-галактозида и поликлональными антисыворотками с использованием иммуофлюоресцентного анализа и последующей микроцитометрией. Последний метод позволил нам оценить уровень экспрессии бактериальной β -галактозидазы в каждой отдельной клетке.

Культуру клеток *Ltk*⁻ трансфицировали четырьмя ДНК плазмид *pH β 21*, *pH β 19*, *pH β 320* (с соответствующими в ней изменениями — без генов поверхностного и внутреннего антигенов) и *pCH110*, в которой *lacZ*-ген *E. coli* находится под контролем раннего промотора вируса SV40. Последняя плазмида была использована для сравнения эффективности экспрессии β -галактозидазы под контролем промоторов *HbsAg* и раннего промотора SV40. Активность β -галактозидазы в клетках *Ltk*⁻ определяли на третьи сутки после трансфекции. Результаты приведены в таблице. Клетки эукариот обладают собственной β -галактозидазной активностью, однако введение *lacZ*-гена *E. coli* приводит к значительному увеличению в них уровня β -галактозидазы. Эффективность экспрессии *lacZ*-гена в составе плазмид *pH β 21* и *pH β 19* равна или несколько выше таковой в клетках, трансфицированных *pCH110*.

Определяя β -галактозидазную активность по эффективности расщепления субстрата О-нитрофенил- β -D-галактозида, мы оцениваем суммарную активность данного фермента, складывающуюся из активности собственной β -галактозидазы клетки и активности привнесенной бактериальной β -галактозидазы. Для того чтобы выявить экспрессию

*Сравнительное изучение содержания β -галактозидазы в *Ltk*⁻-клетках, трансфицированных ДНК плазмид, содержащих *lacZ*-ген под различными промоторами*
Comparative studies contents of β -galactosidase in *Ltk*⁻ cells, transfected with DNA plasmid carried *lacZ* gene under different promoter

<i>pHβ21</i> , МЕ/мл	<i>pHβ19</i> , МЕ/мл	<i>pHβ320</i> , МЕ/мл	<i>pCH110</i> , МЕ/мл	Клетки <i>LTK</i> ⁻ , МЕ/мл
—	2,4	1,4	2,4	0,63
—	3,5	2,2	3,5	0,72
—	1,6	0,82	1,7	0,52
—	2,4	1,18	2,5	0,318
6,6	5,23	—	5,2	1,48
6,4	3,2	2,4	4,8	1,6
M \pm m				
6,5 \pm 0,1	3,5 \pm 0,52	1,6 \pm 0,3	3,3 \pm 0,5	0,87 \pm 0,22

lacZ-гена *E. coli* в каждой трансфицированной клетке, нами был использован метод тестирования продукта специфическими поликлональными антисыворотками с использованием иммуофлюоресцентного анализа и последующей микроцитометрией (рис. 2). Через 72 ч после трансфекции цитоплазма контрольных *Ltk*⁻-клеток (клетки, обработанные «пустыми» липосомами) имела тусклое свечение, ядра не флюоресцировали. Распределение *Ltk*⁻-клеток по флюоресценции соответствовало нормальному распределению, что свидетельствовало об отсутствии процессов, влияющих на интенсивность флюоресценции в клетках. Клетки, трансфицированные плазмидами *pCH110* и *pH β 21*, проявляли совершенно иной характер флюоресценции. Спустя 72 ч после трансфекции в их популяции наблюдается появление клеток с яр-

ко флюоресцирующей цитоплазмой. При разложении кривой распределения опытного варианта на составляющие выявляются два основных пика, соответствующих различной интенсивности флюоресценции. Первый пик, по-видимому, представляет нетрансфицированные клетки или клетки, в которых *lacZ*-ген по каким-либо причинам не выражается. Второй пик соответствует интенсивно флюоресцирующим клеткам. Яркая специфическая флюоресценция их цитоплазмы — свидетельство

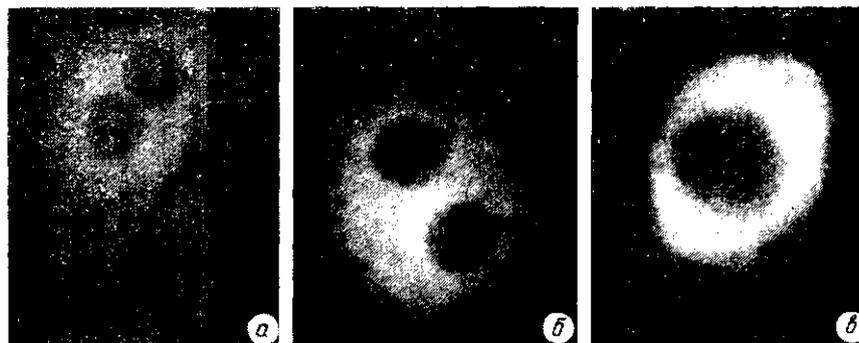


Рис. 2. Флюоресценция гепатоцитов: а — трансфицированных «пустыми» липосомами; б — ДНК плазмиды *pCH110* в составе липосом; в — ДНК плазмиды *pHβ21* в составе липосом

Fig. 2. Fluorescence of hepatocytes: а — transfected by «empty» liposomes; б — plasmid *pCH110* DNA as a part of liposomes; в — plasmid *pHβ21* DNA as a part of liposomes

экспрессии бактериальной β-галактозидазы. Следует отметить одинаковый характер кривых, описывающих интенсивность флюоресценции *Ltk*-клеток, трансфицированных плазмидами *pCH110* и *pHβ21*, что говорит о приблизительно одинаковом уровне экспрессии гена *E. coli*, находящегося под промоторами *HbsAg* вируса гепатита В и раннего промотора вируса *SV40* в *Ltk*-клетках мыши. Проведена статистическая обработка. Результаты могут быть представлены в виде данных по средней интенсивности флюоресценции клеток *Ltk* в зависимости от типа введенных ДНК плазмид (выборка для каждого варианта составила $n=60$). Доверительные границы средних значений и достоверность разницы между контрольной и опытными кривыми определяли для вероятности $n=0,999$:

Интактные клетки	17,93±0,714
После трансфекции ДНК плазмид	
<i>pCH110</i>	29,2±1,38
<i>pHβ21</i>	31,55±1,52

Разницы в интенсивности флюоресценции клеток, трансфицированных ДНК плазмид *pCH110* и *pHβ21*, не обнаружено.

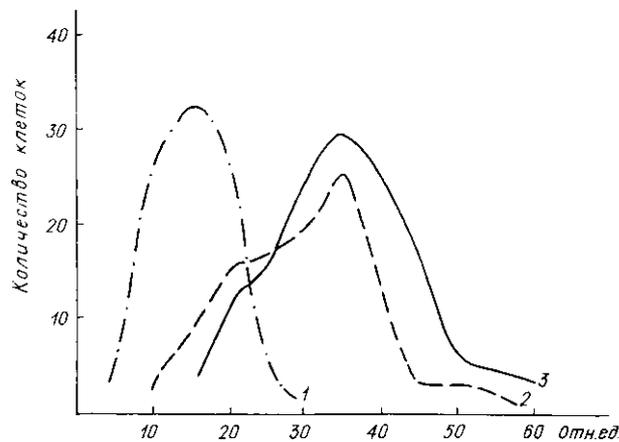
Далее мы изучали экспрессию бактериальной β-галактозидазы в составе плазмид *pHβ21* и *pCH110* в клетках печени интактных модельных животных — мышей. Вышеуказанные ДНК в составе липосом инъецировали в печень животных. На каждый вариант плазмидной ДНК брали по три мыши, которые забивали через 24 ч после введения материала. Продукт экспрессии тестировали специфическими поликлональными антисыворотками с использованием иммунофлюоресцентного анализа и последующей микроцитометрией.

Спустя 24 ч после инъекции в популяции клеток печени появляются клетки с ярко флюоресцирующей цитоплазмой (рис. 3), в то время как цитоплазма клеток, трансфицированных ДНК плазмиды *pCH110*, светится менее ярко. Цитоплазма клеток, трансфицированных «пустыми» липосомами, не обнаруживает свечения. На рис. 4 приведены данные по распределению флюоресценции опытных и контрольных клеток печени. На кривой распределения флюоресценции клеток печени (рис. 4), трансфицированных ДНК плазмиды *pHβ21*, обнару-

живаются пять пиков. Первый пик соответствует распределению флюоресценции клеток печени со слабо светящейся цитоплазмой и, по-видимому, представляет клетки, которые по каким-либо причинам слабо экспрессируют ген бактериальной β -галактозидазы. Второй пик представляет клетки с интенсивно светящейся цитоплазмой. Яркая, спе-

Рис. 3. Распределение клеток Ltk^- по флюоресценции: 1 — клетки Ltk^- , трансфицированные «пустыми» липосомами; 2 — ДНК плазмиды $pCH110$ в составе липосом; 3 — ДНК плазмиды $pH\beta 21$ в составе липосом

Fig. 3. Fluorescent distribution of Ltk^- cells: 1 — Ltk^- cells transfected by «empty» liposomes; 2 — plasmid $pCH110$ DNA as a part of liposomes; 3 — plasmid $pH\beta 21$ DNA as a part of liposomes



цифическая флюоресценция этих клеток рассматривается как присутствие продукта экспрессии $lacZ$ -гена — гена бактериальной β -галактозидазы. На кривой распределения имеются три дополнительных пика,

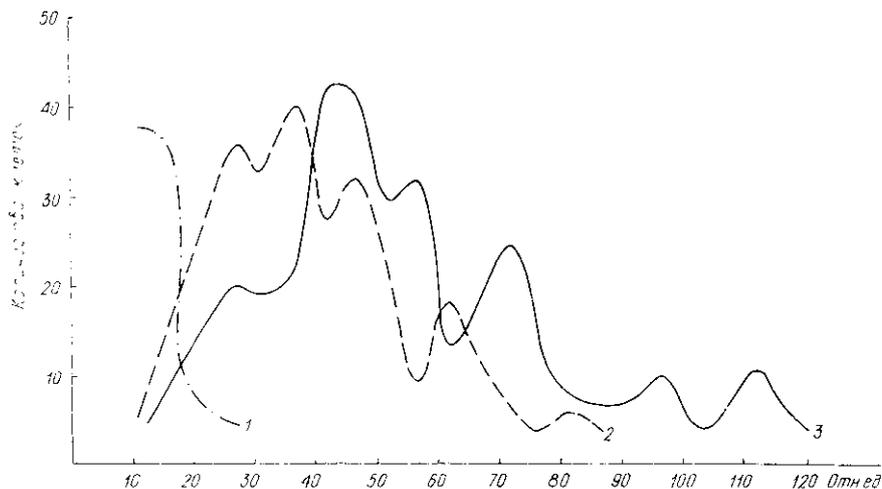


Рис. 4. Распределение гепатоцитов по интенсивности флюоресценции: 1 — intactное животное через 24 ч после инъекции «пустых» липосом; 2 — ДНК плазмиды $pCH110$; 3 — ДНК плазмиды $pH\beta 21$ в составе липосом

Fig. 4. Distribution of hepatocytes by intensity of fluorescence: 1 — intact animal 24 h after injection of «empty» liposomes; 2 — plasmid $pCH110$ DNA; 3 — plasmid $pH\beta 21$ DNA as a part of liposomes

соответствующих клеткам печени с ярко флюоресцирующей цитоплазмой, в которых происходит интенсивная экспрессия бактериальной β -галактозидазы. Такие пики отсутствуют на кривой распределения флюоресценции клеток печени, трансфицированных плазмидой $pCH110$, что, по-видимому, свидетельствует о более высоком уровне экспрессии бактериальной β -галактозидазы, находящейся в составе плазмиды $pH\beta 21$. Проведена статистическая обработка. Результаты могут быть представлены в виде данных по средней интенсивности флюоресценции клеток Ltk^- в зависимости от типа инъектированного материала (выборка при введении ДНК плазмиды $pCH110$ составила $n=243$,

при введении ДНК плазмиды *pH β 21* — $n=309$, интактные гепатоциты — $n=63$). Доверительные границы средних значений и достоверность разницы между контрольной и опытной кривыми и между опытными кривыми определяли для вероятности $n=0,999$:

Интактные гепатоциты	9,9 \pm 0,53
После трансфекции ДНК плазмид	
<i>pCH110</i>	39,29 \pm 1,04
<i>pHβ21</i>	48,37 \pm 1,26

Разницу в уровне экспрессии гена бактериальной β -галактозидазы в составе плазмид *pH β 21* и *pCH110*, по-видимому, можно объяснить наличием энхансеров вируса гепатита В в составе плазмиды *pH β 21*, который усиливает экспрессию данного гена. Наши данные по экспрессии *lacZ*-гена в составе плазмиды *pH β 21* в культуре фибробластов мыши и в клетках печени свидетельствуют о том, что энхансеры вируса гепатита В транспецифичны.

Таким образом, на основе ДНК вируса гепатита В сконструирован вектор с модельным геном бактериальной β -галактозидазы. Показано отсутствие существенных отличий в уровне экспрессии *lacZ*-гена *E. coli*, находящегося под промотором *HbsAg* вируса гепатита В и раннего промотора вируса SV40 в фибробластах мыши (клетки *Ltk*⁻). В то же время наблюдалась значительная разница в уровне экспрессии данного гена в составе вышеуказанных плазмид в гепатоцитах интактных мышей. Ген бактериальной β -галактозидазы, находящийся под промотором *HbsAg*, экспрессировался значительно эффективнее в клетках печени мышей.

COMPARATIVE STUDIES IN EXPRESSION OF MODEL BACTERIAL β -GALACTOSIDASE GENE IN CULTURE OF MURINE FIBROBLASTS AND DURING DIRECT INJECTION INTO THE ANIMAL LIVER

I. S. Varzanova, L. N. Neborachko, S. P. Shpilevaya, I. E. Kostetsky,
T. V. Stoltyar, E. M. Sukhorada, I. I. Lukash, V. A. Kordium

Institute of Molecular Biology and Genetics,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

Summary

A vehicle with a model gene of the bacterial β -galactosidase has been constructed on the basis of DNA of hepatitis B virus. Comparative studies in the expression of *E. coli lacZ* gene under the control of promoters of hepatitis B virus and early promoter of SV40 virus in culture of murine fibroblasts (*Ltk*⁻ cells) and in murine liver cells with immediate introduction of genetic material into liver by injection as part of liposomes have been conducted. The bacterial β -galactosidase gene under the control of promoter of surface antigen hepatitis B virus gene has been expressed much more efficiently in these cells.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Исследование возможности экспрессии экзогенного гена инсулина человека в культивируемых фибробластах млекопитающих / Л. Н. Неборачко, Л. Л. Лукаш, Б. М. Трояновский и др. // Биополимеры и клетка.— 1989.— 5, № 2.— С. 58—61.
2. Graham F. Z., Van der Eb A. J. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA adenovirus // Virology.— 1973.— 52, N 2.— P. 456—467.
3. Экспрессия β -галактозидазы *Escherichia coli* в гепатоцитах мыши / И. Е. Костецкий, С. П. Шпилевая, Л. И. Лихачева и др. // Биополимеры и клетка.— 1989.— 5, № 2.— С. 51—58.
4. The enhancer sequence of human hepatitis B virus can enhance the activity of its surface gene promoter / H. K. Chang, C. K. Chou, C. Chang et al. // Nucl. Acids Res.— 1987.— 15, N 5.— P. 2261—2268.

5. Vannice J. L., Levinson A. D. Properties of the human hepatitis B virus enhancer: position effects and cell-type nonspecificity // J. Virol.—1988.—62, N 4.—P. 1305—1313.
6. Козловская Т. М., Пулиен П. П. Структура и экспрессия гена поверхностного антигена вируса гепатита В человека // Молекуляр. биология.—1986.—20, № 4.—С. 884—901.
7. Shahid J., Aleem S. The human hepatitis B virus enhancer requires trans-acting cellular factor(s) for activity // Mol. and Cell. Biol.—1986.—6, N 2.—P. 710—715.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 24.07.89

УДК 577.352.27:57.086.3

К. М. Билич, Д. М. Иродов, В. А. Кордюм

НЕКОТОРЫЕ УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ АСПЕКТЫ ПРЯМОЙ ИНЪЕКЦИИ ЛИПОСОМ, СОДЕРЖАЩИХ ПЛАЗМИДНУЮ ДНК, В ПЕЧЕНЬ МЫШИ

Методом просвечивающей электронной микроскопии исследована реакция клеток печени на прямое введение в составе липосом бактериальной плазмиды кодирующей синтез β-галактозидазы. Через сутки после инъекции в гепатоцитах отмечены гипертрофия элементов аппарата Гольджи и структурные изменения митохондрий часть из которых носит обратимый характер. С помощью методики, оптимально выявляющей фосфолипиды, предприняты попытки исследовать ультратонкое строение вводимых липосом, а также их распределение в печени. Через 5 мин после инъекции липосомы располагались у ядер гепатоцитов — вблизи поровых комплексов и в перинуклеарном пространстве. Эта локализация отмечалась и через сутки. Выявление липосом в ткани, богатой эндогенными липидами, сопряжено с рядом трудностей, которые обсуждаются.

Введение. Ограниченная проницаемость фосфолипидных мембран позволяет использовать липосомы в качестве носителей физиологически активных веществ, обеспечивающих дозированное поступление последних в определенный орган. Варьируя состав липосом, можно направленно влиять на избирательность их накопления в определенных клетках печени [1]. Ранее было высказано предположение [2], что прямая инъекция липосомной суспензии в печень предпочтительнее внутривенной, так как в этом случае липосомы непосредственно контактируют с гепатоцитами, обеспечивая доставку экзогенной ДНК в эти клетки.

Механизмы взаимодействия липосом с клетками к настоящему времени изучены достаточно полно [3, 4]. Следует, однако, заметить, что реже других для выяснения этих механизмов применялся метод просвечивающей электронной микроскопии. Такое обстоятельство объясняется, с одной стороны, методической сложностью стабилизации хрупких липосом в ходе проводки и заливки [5, 9], с другой — существенной трудностью в дальнейшем наблюдении за липосомами в тканях с активным эндоцитозом. В обход второго затруднения ряд исследователей предпочитает работать со сравнительно простыми модельными системами [5—7]. Однако на подступах к геннотерапевтическим исследованиям [8] становится все более очевидной необходимость электронно-микроскопического контроля качества вводимых липосом, их распределения в ткани животных и возможных реакций различных ультраструктур клетки на вводимый генетический материал.

Целью настоящей работы явилось изучение ультратонкой организации липосом, приготовленных методом Са-ЭДТА, их распределения в ткани печени при прямом введении, а также реакции ультраструктур на плазмидную ДНК, инъецируемую в составе липосом.

Материалы и методы. В работе использовали ДНК плазмиды *pGA293*, содержащей *lacZ*- ген *Escherichia coli*, кодирующий синтез бактериальной β-галактозидазы. Плазмиду заключали в липосомы следующего состава (%): лецитин — 70, холестерин — 20, децил-фосфат — 9, фосфатидил-этанолламин — 1. Основной способ приготовления — кальциевая плавка с последующей обработкой ЭЛТА. Был также апроби-