

3. Марголис Л. В., Брейгельсон Л. Д. Липосомы и их взаимодействие с клетками.— М.: Наука, 1986.— 240 с.
4. Марголис Л. В. Механизмы взаимодействия липосом с клетками: перспективы и ограничения применения липосом в науке и практике // Биол. мембраны.— 1987.— 4, № 5.— С. 453—467.
5. Взаимодействие отрицательно заряженных лецитиновых липосом с эритроцитами человека: исследование методом трансмиссионной электронной микроскопии ультратонких срезов / Н. В. Белицер, В. И. Чернышов, М. Г. Анищук и др. // Докл. АН СССР.— 1984.— 277, № 1.— С. 210—213.
6. Interaction of positively charged liposomes with erythrocyte membrane. An ultrastructural study / N. V. Belitser, M. G. Anischuk, V. I. Chernishov, T. R. Kozlova // Cell. Biol. Int. Rep.— 1986.— 10, N 5.— P. 331—338.
7. Чернышов В. И., Козлова Т. Р., Соколов Ю. В. Адсорбция и слияние положительно заряженных липосом с мембраной эритроцита человека. Электронная микроскопия ультратонких срезов // Биол. мембраны.— 1987.— 4, № 1.— С. 90—95.
8. Кордюм В. А. Задачи и проблемы генной терапии // Биополимеры и клетка.— 1989.— 5, № 2.— С. 5—15.
9. Takahashi G. Tannin-ferrocyanide OsO₄ method for transmission and scanning electron microscopy // Proc. XI Int. Congr. on electron microscopy.— Kyoto, 1986.— 345 p.
10. Loud A. V. A quantitative stereological description of the ultrastructure of normal rat liver parenchymal cell // J. Cell Biol.— 1968.— 37, N 1.— P. 27—46.
11. Liposomes injected intravenously into mice associate with liver mitochondria / A. Cudd, H. Lable, M. Gervais, C. Nicolau // Biochim. et biophys. acta.— 1984.— 774, N 3.— P. 169—180.
12. Cudd A., Nicolau C. Intercellular fate of liposome-encapsulated DNA in mouse liver. Analysis using electron microscope autoradiography and subcellular fractionation // Ibid.— 1985.— 845, N 4.— P. 477—491.
13. Cudd A., Nicolau C. Interaction of intravenously injected liposomes with liver mitochondria. A fluorescence and electron microscopy study // Ibid.— 1986.— 860, N 2.— P. 201—214.
14. Гайер Г. Электронная гистохимия.— М.: Мир, 1974.— 488 с.

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

Получено 23.06.89

УДК 577.21:579.25.5

Л. Л. Лукаш, Л. Н. Неборачко, Е. М. Сухорада, Е. В. Усенко,
И. С. Варзанова, С. В. Подольская, Т. И. Бужиевская, В. А. Кордюм

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНА ИНСУЛИНА ЧЕЛОВЕКА В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТКАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Показано, что фибробласты человека и мыши, в которые введена рекомбинантная плазмида, содержащая ген инсулина человека под собственным промотором при отсутствии гена-помощника и сильных вирусных промоторов, секретируют в культуральную среду специфический белок-продукт. Установлена сходная зависимость секреции белка — продукта гена инсулина от времени для фибробластов человека и мыши.

Введение. Разработка методов лечения сахарного диабета, являющегося одним из наиболее распространенных заболеваний, — одна из первоочередных задач биотехнологии в медицине. Биотехнология в западных странах добилась значительных успехов в производстве инсулина человека генноинженерными методами. В будущем лечение этого заболевания, возможно, будет производиться с помощью генной терапии: введение в капсулах или иным путем в организм больного клеток, продуцирующих инсулин, а также прямое введение нормального гена инсулина в такой молекулярной конструкции, которая обеспечивает его экспрессию в клетках больных, в том числе в неспециализированных клетках. Для разработки новых способов лечения важно изучить экспрессию введенного гена инсулина в клетках млекопитающих различного происхождения.

Задачи настоящего исследования следующие: изучение особенностей экспрессии геномного гена инсулина человека в культивируемых фибробластах человека и мыши и выяснение возможности селекции клеток, трансформированных по гену инсулина.

Изучали экспрессию геномного гена инсулина человека, содержащего собственный промотор, но без регуляторного участка, обеспечивающего тканеспецифичность экспрессии [1]. Ранее была показана возможность экспрессии этого гена, клонированного в бактериальной плазмиде *pBR322*, в клетках млекопитающих [2]. В данной работе подробно описаны эксперименты по исследованию экспрессии гена инсулина в динамике. Для стимуляции биосинтеза белка — продукта гена инсулина использовали среду с высоким содержанием глюкозы. Согласно литературным данным, глюкоза усиливает биосинтез инсулина. В нестимулированных глюкозой клетках значительная часть соответствующей мРНК находится вне полисом и менее эффективна как матрица для синтеза белка [3]. При высоком содержании глюкозы производство инсулина I у крысы возрастает в 10 раз [4]. Наряду с трансляционным и транскрипционным контролем важную роль в регуляции биосинтеза инсулина, вероятно, играют процессы репликации ДНК *B*-клеток. Геном *B*-клеток запрограммирован на определенное число клеточных делений, и в основе наследственной предрасположенности к диабету, по-видимому, лежит генетически детерминированное снижение способности этих клеток к репликации.

Группой Клайна был разработан и апробирован метод введения и селекции требуемой наследственной информации с использованием клеток костного мозга человека и животных для работ по генной терапии [5]. Этот метод является весьма эффективным, но в то же время имеет очевидные недостатки, связанные с необходимостью введения токсического селектирующего агента и наличия гена-помощника, который неизбежно загрязняет геном и может вызывать побочные биологические эффекты.

Мы использовали другой подход. Известно, что инсулин в комбинации с другими факторами роста и опухолевым промотором ТФА стимулирует к делению фибробласты человека и мыши [6]. Можно было предположить, что повышенное содержание проинсулина и/или инсулина в трансформированных клетках дает им селективное преимущество для роста, приводящее к повышению их доли в клеточной популяции при пассировании. Действительно, мы обнаружили увеличение содержания белка — продукта гена инсулина в культуральной среде после длительного пассирования клеток, трансформированных рекомбинантной ДНК [7]. В этих экспериментах для культивирования клеток использовали среду с сывороткой крупного рогатого скота, обедненную ростовыми факторами по сравнению с эмбриональной сывороткой (содержание инсулина, например, в первом случае < 1 нг/мл, во втором — 60 нг/мл). В данной работе описаны эксперименты, в которых исследовали выживаемость клеток, трансформированных по гену инсулина, после длительного содержания их в бессывороточной среде.

Материалы и методы. Объектом исследования служили клетки эмбрионального легкого человека (диплоидный штамм ЛЭЧ) и культивируемые клетки мыши (линии *С3Н10Т1/2* и *ЛТК*⁻). Клетки ЛЭЧ и *ЛТК*⁻ получены нами из коллекции Ин-та вирусологии АМН СССР им. Д. И. Ивановского, а клетки *С3Н10Т1/2* — из Ин-та молекулярной генетики АН СССР.

Для трансфекции клеток использовали рекомбинантную плазмиду, содержащую ген инсулина человека *pBR322 ins*, исходную плазмиду *pBR322*, а также рестрикционный фрагмент ДНК с геном инсулина.

Трансфекцию клеток проводили кальций-фосфатным методом. Концентрация трансформирующей ДНК составляла 10 мкг/мл на 10^6 клеток. Кальций-фосфатный преципитат наносили на монослой клеток через 3 сут после посева их на стеклянные матрасы.

Клетки культивировали в среде Игла с добавлением 10 % сыворотки крупного рогатого скота. Эффективность клонирования определяли при посеве клеток в среду с 20—30 % сыворотки по оценке соотношения клонообразующих к числу посеянных клеток. При этом сеяли по 200—1000 клеток на чашку Петри.

Содержание белка — продукта гена инсулина определяли в пробах культуральной среды конкурентным иммуноферментным методом. С этой целью производили отбор проб культуральной среды через 1, 2, 3, 6—7, 10, 13—14, 16 сут и в процессе пассирования трансфицированных клеток. Накануне отбора проб клетки промывали дважды средой Игла и добавляли порцию свежей среды с увеличенным содержанием глюкозы от 500 до 2000 мг %, но без сыворотки. Через сутки после этого собирали среду с каждого матраса отдельно и определяли в пробках концентрацию белка-продукта.

Концентрацию глюкозы в пробах культуральной среды определяли стандартным о-толуидиновым методом.

Статистическую обработку данных проводили с помощью критериев Фишера и Вилкоксона.

Результаты и обсуждение. Результаты 20 независимых экспериментов представлены на рис. 1. Динамика секреции белка-продукта в случае фибробластов человека ЛЭЧ мышцы СЗН10Т1/2 не различалась. Через сутки после введения ДНК в клеточную систему уровень белка не отличался достоверно от контроля. Начиная с 3-х и вплоть до 10-х сут происходило значительное увеличение концентрации белка-продукта в культуральной среде ($P < 0,001$); через 13 сут — ее резкое снижение. Наблюдались довольно большие колебания в содержании белка в культуральной среде от опыта к опыту, однако все опытные значения превышали контрольный уровень. На 16-е сут и в последующие сроки концентрация тестируемого белка была близка к контрольному уровню.

Контрольные клетки, не содержащие введенного гена инсулина, по-видимому, секретируют небольшое количество белковых факторов, сходных с инсулином. В контроле уровень тестируемого белка в отдельных экспериментах достигал 30 нг/мл. Следует отметить, что используемые нами для тестирования моноклональные антитела узнают детерминанту, общую для инсулина и проинсулина и, возможно, для инсулиноподобных факторов роста.

Из литературных источников известно, что в перевиваемых клетках почки обезьяны CV1, содержащих введенный ген инсулина человека, происходил синтез проинсулина, процессинг его в инсулин отсутствовал

Из литературных источников известно, что в перевиваемых клетках почки обезьяны CV1, содержащих введенный ген инсулина человека, происходил синтез проинсулина, процессинг его в инсулин отсутствовал

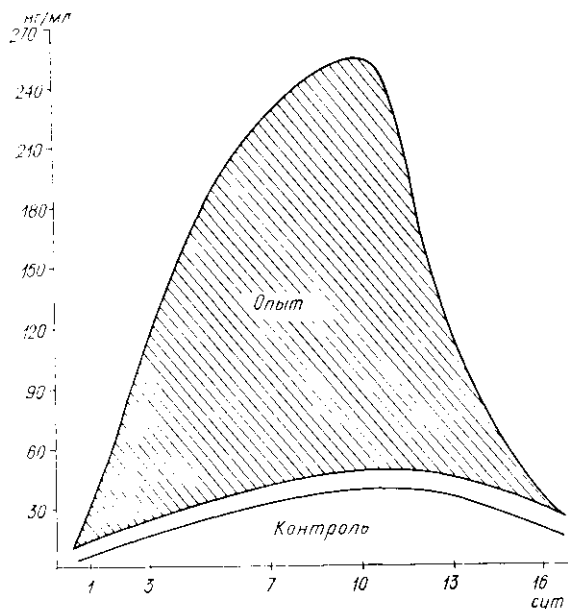


Рис. 1. Содержание белка-продукта в пробах культуральной среды в различные сроки после трансфекции клеток

Fig. 1. Maintenance of protein product in the test cultural media in different intervals after transfection of cells

[8]. Проинсулин обладает слабым инсулиноподобным действием. В наших экспериментах в пробах культуральной среды, где выявлялся продукт гена инсулина, было обнаружено снижение уровня глюкозы на 100—400 мг %. Это свидетельствует о специфической функциональной активности белка. Мы предполагаем, что в наших опытах также синтезировался проинсулин, так как содержание глюкозы за сутки хотя и понижалось, но не достигало нормального уровня (100 мг %).

Таким образом, нами показано, что ген инсулина человека без ре-

гуляторного участка, ответственного за тканеспецифичность экспрессии, может функционировать в культивируемых фибробластах различного происхождения. При исследовании фибробластов человека и мыши наблюдается сходная зависимость секреции белка — продукта гена инсулина от времени после введения трансформирующей ДНК *pBR322ins*.

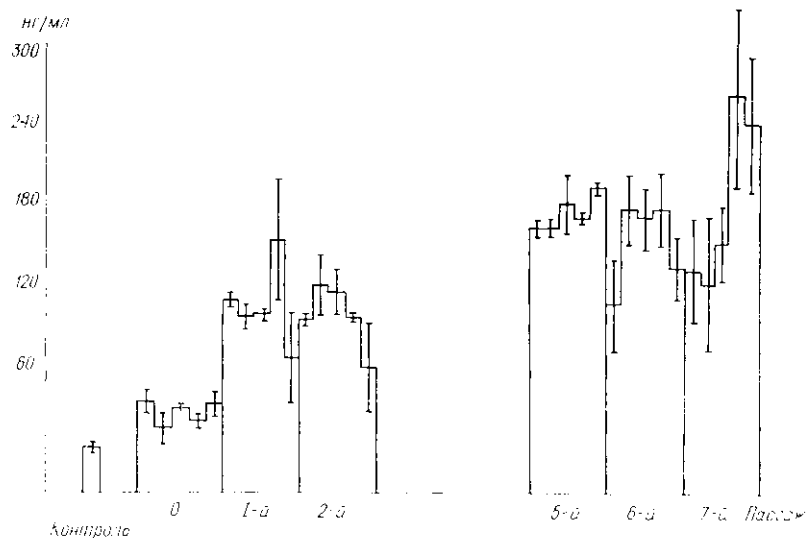


Рис. 2. Содержание белка-продукта в пробах культуральной среды при пассировании клеточных субкультур

Fig. 2. Maintenance of protein product in the test cultural media during passing of the cell subcultures

Уровень секретируемого белка достоверно повышается по сравнению с контролем с 3-х по 10-е сут, а затем резко снижается.

Результаты, полученные при определении содержания белка — продукта гена инсулина в субкультурах, полученных при пассировании трансфицированных клеток человека ЛЭЧ, представлены на рис. 2. В этих экспериментах для трансфекции использовали рекомбинантную плазмиду *pBR322ins*. После трансфекции клетки пересевали один раз в неделю и определяли содержание белка-продукта непосредственно перед каждым последующим посевом.

Уже после первого посева содержание белка-продукта превысило 60 нг/мл. В дальнейшем наблюдались колебания его содержания в пробах среды пяти исследуемых субкультур клеток человека, но в общем прослеживалась тенденция к увеличению секреции белка до уровня 200—250 нг/мл. Различия между опытными и контрольными вариантами во всех случаях статистически достоверны ($P < 0,001$). По сравнению с «нулевым» пассажем во всех последующих пассажах наблюдалось достоверное повышение содержания белка-продукта. При сравнении данных по второму и седьмому пассажам опытные данные также достоверно различаются.

С целью выяснения функционального состояния продукта экспрессии гена инсулина было изучено содержание глюкозы в пробах культуральной среды (таблица), которое понизилось на 110—370 мг % в разных пробах по сравнению с контрольным уровнем. Была также изучена эффективность клонирования опытных и контрольных клеток ЛЭЧ и *СЗН10Т1/2* для оценки их выживаемости после длительного пассирования в среде, обедненной ростовыми факторами. Эффективность клонирования трансфицированных клеток составляла 1 %, в контрольных вариантах этот показатель был ниже 0,01 %. В случае клеток человека ЛЭЧ были изолированы пять опытных клонов, в случае клеток мыши *СЗН10Т1/2* — три. Клетки этих клонов были размножены, и в пробах культуральной среды определяли содержание белка-продукта. В трех

из пяти клонов клеток человека было обнаружено повышенное содержание белка-продукта (60, 80 и 100 нг/мл). Во всех трех клонах клеток мыши наблюдалась аналогичная картина — 60, 90 и 90 нг/мл. Таким образом, частота трансформированных клеток среди таковых, способных к клонообразованию, высока. Для количественного определения этой частоты следует изучить большее число клонов.

Как отмечалось выше, имеются сведения о том, что диплоидные клетки человека и мыши способны к делению в бессывороточной среде

Содержание инсулина и глюкозы в пробах культуральной среды
Maintenance of insulin and glucose in the test cultural media

Вариант	Количество инсулина, нг/мл		Количество глюкозы, мг%	
	Всего	Разница между опытом и контролем	Всего	Разница между опытом и контролем
Контрольная проба	30	--	1860	--
Опытные работы				
1	140	110	1490	-370
2	150	120	1750	-110
3	250	220	1500	-360

при добавлении в нее инсулина в сочетании с другими факторами роста или опухолевым промотором ТФА [6]. Учитывая, что исследуемые клетки человека ЛЭЧ после введения в них гена инсулина продуцируют проинсулин и/или инсулин, мы изучили их способность к делению в бессывороточной среде при добавлении ТФА. Через 5 сут после его добавления в культуральную среду в опытных культурах число клеток в 1,5 раза превысило таковое в контрольных вариантах. Часть клеток, возможно, именно трансформированные клетки с повышенным содержанием проинсулина и/или инсулина, оказалась способной к делению. Следует отметить, что в указанной работе [6] стимуляция клеточных делений при совместном добавлении инсулина и ТФА наблюдалась при относительно высокой концентрации инсулина — 10 мкг/мл. В пробах культуральной среды мы не обнаруживали белка-продукта в столь высокой концентрации. Но клетки-продуценты могли иметь повышенное содержание инсулина.

В двух экспериментах использовали клетки спонтанной опухоли (линия *LTK⁻*), которые трансфицировали с помощью рестрикционного фрагмента ДНК с геном инсулина. Затем клетки более одного месяца выдерживали в среде без сыворотки. Эффективность клонирования клеток после культивирования в бессывороточной среде в контрольном варианте составляла <0,01 %, в опытном варианте — 2,2 %. Два опытных клон были изолированы и размножены. В пробах культуральной среды обнаружен инсулиноподобный белковый продукт в концентрации 70 и 100 нг/мл соответственно для двух клонов. Наблюдалось также снижение концентрации глюкозы с 500 до 120 мг %. Для сравнения можно привести данные по клонированию клеток *LTK⁻* при условии пассирования их в нормальной среде с 10 % сыворотки крупного рогатого скота. В контрольных вариантах эффективность клонирования составляла 13 %, в опытном варианте — 16 %. Следовательно, разница между опытными и контрольными вариантами по выживаемости клеток *LTK⁻* гораздо ярче выявляется при культивировании их на бессывороточной среде после трансфекции.

Таким образом, присутствие и функционирование в фибробластах млекопитающих геномного гена инсулина человека экзогенного происхождения приводит к повышению жизнеспособности клеток, что проявляется в условиях среды, обедненной ростовыми факторами (для фибробластов человека ЛЭЧ и мыши *S3H10T1/2*), и среды без ростовых факторов (для спонтанно трансформированных фибробластов мыши *LTK⁻*). Этот подход, по-видимому, можно будет использовать бо-

лее широко для отбора клеток, трансформированных не только по гену инсулина, но и по генам других ростовых факторов. Частоту трансформированных клеток, вероятно, можно повысить при добавлении ТФА в бессывороточную среду, так как в этих условиях клетки с повышенным содержанием инсулиноподобных белковых факторов способны делиться. Если наши данные и предположения подтвердятся, то в целом ряде случаев для отбора генетически трансформированных клеток можно будет обойтись без гена-помощника и присутствия токсического агента, необходимого для селекции.

HUMAN INSULIN GENE EXPRESSION IN CULTURED MAMMALIAN CELLS

*L. L. Lukash, L. N. Neborachko, H. M. Sukhorada, E. V. Usenko,
I. S. Varsanova, S. V. Podolskaya, T. I. Buzhievskaya, V. A. Kordium*

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

Summary

Studies of human and mouse fibroblasts have shown a similar dependence between protein product of insulin gene and temporal interval after transforming *pBR322ins* DNA injection. The level of secreted protein is shown to be significantly higher as against the control 3-10 days after injection and then it considerably decreases. The presence and the functioning of human insulin gene in mammalian fibroblasts increase viability of cells, that manifests under conditions of medium poor in growth factors.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Молекулярное клонирование гена инсулина человека / Н. С. Незнамов, Б. М. Трояновский, А. Л. Гартель и др. // Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология.— 1987.— № 7.— С. 14—16.
2. 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.
3. *Disproportionate* expression of the two nonallelic insulin genes in a pancreatic tumor is due to translational control / B. Cordell, D. Diamond, S. Smith et al. // *Cell*.— 1982.— 31, N 2.— P. 531—542.
4. *Kakita K., Giddings S., Permut M. A.* Biosynthesis of rat insulin I and II: evidence for differential expression of the two genes // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.— 1982.— 79, N 6.— P. 2803—2807.
5. *Gene transfer in intact animals / M. Y. Cline, H. Stang, K. Mereola et al.* // *Nature*.— 1980.— 284, N 5755.— P. 422—425.
6. *Dicker P., Rosengurt E.* Stimulation of DNA synthesis by tumor promoter and pure mitogenic factors // *Ibid.*— 1978.— 276, N 5689.— P. 723—726.
7. Экспрессия экзогенного гена инсулина человека в субкультурах и клонах клеток млекопитающих / Л. Л. Лукаш, Л. Н. Неборачко, С. В. Подольская и др. // Докл. АН УССР.— 1989.— № 8.— С. 71—74.
8. *Expression of the human insulin gene in an alternate mammalian cell and cell extracts / O. Laub, L. Rall, G. I. Bell, W. J. Rutter* // *J. Biol. Chem.*— 1983.— 258, N 10.— P. 6037—6042.

Инт. молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев

Получено 23.06.89