

Л. Н. Неборачко, Л. Л. Лукаш, И. С. Варзанова, В. А. Кордюм

## ИЗУЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ЭКЗОГЕННОГО ГЕНА ИНСУЛИНА ЧЕЛОВЕКА, НАХОДЯЩЕГОСЯ ПОД КОНТРОЛЕМ РЕГУЛЯТОРНОЙ ОБЛАСТИ ГЕНА *hsp70* ДРОЗОФИЛЫ, В ФИБРОБЛАСТАХ ЧЕЛОВЕКА

Сконструирован вектор, в котором ген инсулина человека находится под контролем регуляторной области гена *hsp70* дрозофилы. Изучена экспрессия данного гена в фибробластах человека под действием теплового шока. Показано, что в ответ на тепловой шок наблюдается 4-кратное увеличение экспрессии гена инсулина человека.

Одной из актуальных проблем генной терапии является регуляция экспрессии чужеродных генов. Данную проблему в определенной мере можно будет разрешить, используя регуляторные области индуцибельных генов, таких как гены теплового шока, металлотионсиновые гены, гены, регулируемые гормонами, и т. д. Весьма перспективны в этом отношении гены теплового шока. Они индуцируются не только тепловым воздействием, но и некоторыми химическими агентами, различными вирусами, ионами тяжелых металлов.

Гены теплового шока консервативны. Наибольшей степенью консервативности обладает ген *hsp70* дрозофилы. Нуклеотидные последовательности 70К генов дрожжей и других грибов, насекомых, цыплят, обезьян, человека гомологичны на 68—70 % [1]. Ген *hsp70* дрозофилы гомологичен аналогичному гену теплового шока человека на 73 %. Этот ген клонирован и секвенирован [2, 3]. Определена нуклеотидная последовательность 5'-фланкирующего района, обуславливающая ответ на тепловой шок [4]. Все эти данные позволяют использовать регуля-

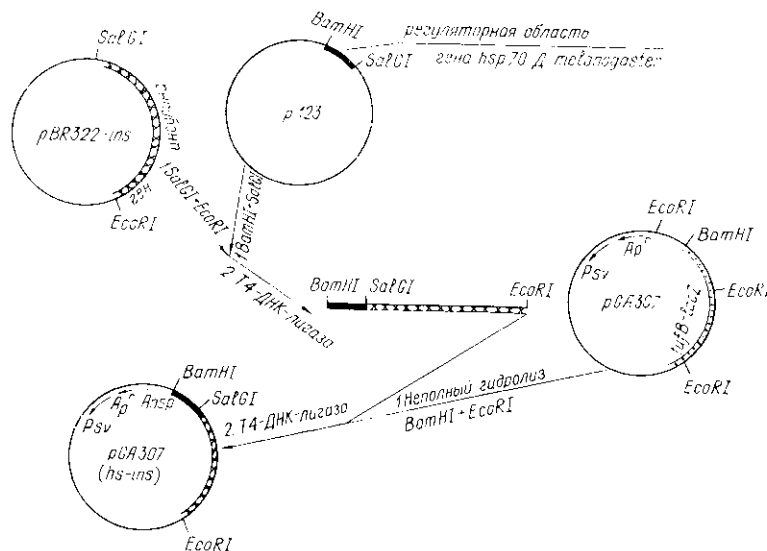


Рис. 1. Схема конструирования вектора, в котором ген инсулина человека находится под контролем регуляторной области гена *hsp70* дрозофилы

Fig. 1. Scheme for construction of a vehicle where the human insulin gene is under control of regulatory region of *hsp70* *Dr. melanogaster* gene

торную область гена *hsp70* дрозофилы для осуществления индукции экспрессии генов. Авторы работы [5] сконструировали рекомбинантную ДНК, в которой ген гормона роста человека, лишенный собственного промотора, находится под контролем регуляторной области гена *hsp70* дрозофилы, и наблюдали 1000-кратное увеличение синтеза этого гормона в клетках *СНО* хомяка и *COS-1*-клетках обезьяны в ответ на тепловой шок. В другой работе показано также 100- и 1000-кратное увели-

чение синтеза  $\beta$ -интерферона человека в клетках почек обезьяны, хомяков и эпителия человека в ответ на подобное воздействие при трансфекции этих клеток молекулярной конструкцией, в которой ген  $\beta$ -интерферона контролируется регуляторной областью *hsp70* дрозофилы [6].

Ранее нами было показано, что в фибробластах человека и мыши происходит конститутивный синтез белка — продукта гена инсулина человека, лишённого области, ответственной за тканеспецифичность, по

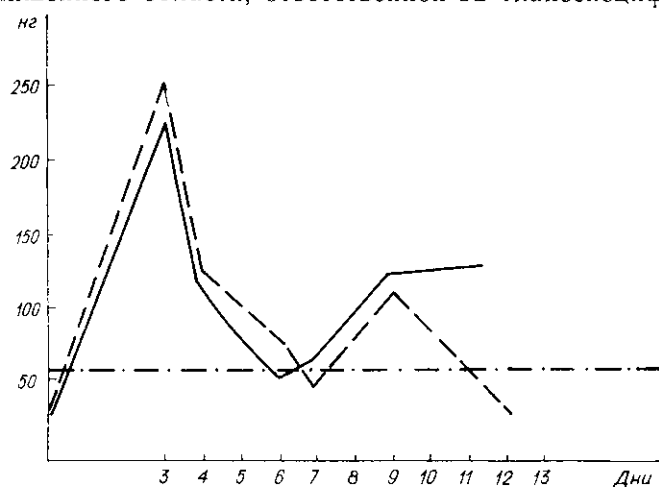


Рис. 2. Синтез проинсулина/инсулина (результаты двух опытов) фибробластами человека (содержание в 1 мл культуральной среды), трансфицированными ДНК плазмиды *pGA307* (*hs-ins*), после теплового шока (120 мин, 42 °С). Штрих-пунктирной линией отмечен уровень синтеза проинсулина/инсулина фибробластами в отсутствие теплового шока

Fig. 2. Synthesis of proinsulin/insulin by human fibroblasts transfected by plasmid *pGA307* (*hs-ins*) DNA after heat shock (120 min, 42 °C). Level of proinsulin/insulin synthesis by fibroblasts in the absence of heat shock is designated by dotted line

сохранившего собственный промотор [7]. В данной работе приводится конструирование ркомбинантной ДНК, в которой ген инсулина человека находится под контролем регуляторной области гена *hsp70* дрозофилы, и изучение его экспрессии в фибробластах мыши. Схема конструирования приведена на рис. 1. Регуляторная область гена *hsp70* получена из ДНК плазмиды *123*, предоставленной нам А. Д. Мирзабековым. Данная плазмида представляет собой *pBR322*, в *EcoRI*-сайт которой клонированы один полный ген *hsp70* дрозофилы и неполный ген в обратной ориентации без регуляторной области [2]. Обработка ДНК плазмиды одновременно двумя рестриктазами *BamHI* и *SalGI* дала нам возможность получить фрагмент этой плазмиды размером 500 тысяч пар нуклеотидов (т. н. н.), включающий регуляторную область *hsp70* гена дрозофилы.

Источником ДНК, содержащей ген инсулина человека, служила плазмида *pBR322-ins*. Она описана нами в [7]. При совместном гидролизе ДНК этой плазмиды рестриктазами *EcoRI* и *SalGI* образуются два фрагмента: 4200 и 2700 т. н. н. Последний содержит ген инсулина человека. *BamHI-SalGI*-фрагмент ДНК плазмиды *123*, несущий регуляторную область гена *hsp70* дрозофилы, лигировали по липким *SalGI*-кошам с фрагментом ДНК, содержащим ген инсулина человека. В качестве вектора использовали ДНК плазмиды *pGA307*, полученной от д-ра Л. Симиновича (Канада). Данная плазмида содержит слитые гены *tuftB-lacZ* без промотора для эукариотических клеток. В плазмиде *pGA307* имеется ранний промотор вируса *SV40*, однако он ориентирован в противоположном направлении по отношению к генам *tuftB-lacZ* и не способен обеспечить их экспрессию в эукариотических клетках. Плазмида *pGA307* содержит также точку начала репликации вируса *SV40*, сигнал полиаденилирования и промежуточную последователь-

ность для ранних транскриптов SV40, а также маркер антибиотикорезистентности для клеток *Escherichia coli*: Amp<sup>r</sup>. Перед слитыми генами *tufB-lacZ* находится уникальный *BamHI*-сайт, удобный для встраивания промотороподобных последовательностей. Данная плазмида предназначена для их поиска. Совместным неполным гидролизом рестриктазами *BamHI* и *EcoRI* мы удалили из ДНК плазмиды *pGA307* фрагмент, несущий гены *tufB-lacZ*, и на их место по *BamHI*- и *EcoRI*-сайтам встроили ген инсулина человека под контролем регуляторной области гена *hsp70* дрозофилы.

Полученной плазмидой трансфицировали фибробласты человека. В опытах использовали диплоидный штамм ЛЭЧ, полученный нами из коллекции Ин-та вирусологии АМН СССР им. Д. И. Ивановского. Начиная с 3-х сут после трансфекции клетки ежедневно подвергали тепловому шоку (42 °С) в течение различного времени: 60, 120 и 180 мин, после чего их продолжали выращивать при 37 °С. Концентрацию проинсулина/инсулина в культуральной среде определяли спустя 15--20 ч после теплового шока конкурентным твердофазным иммуноферментным анализом. Способ определения описан ранее [7]. Наши эксперименты показали, что продукция проинсулина/инсулина фибробластами человека зависит от длительности теплового шока. Тепловой шок в течение 60 мин при 42 °С не приводил к значительному увеличению продукции проинсулина/инсулина клетками ЛЭЧ; в течение 180 мин вызвал резкое падение выживаемости клеток. Самым эффективным был признан режим: 120 мин, 42 °С. Наибольший выход проинсулина/инсулина при такой тепловой обработке отмечен на 3-и сут после трансфекции (рис. 2). Он достигал приблизительно 250 нг/мл. Начиная с 4-х и вплоть до 6-х сут наблюдалось снижение синтеза проинсулина/инсулина после ежедневного теплового шока и далее снова следовал подъем. На 9-е сут после трансфекции выход белка-продукта равнялся 125 нг/мл. В отсутствие теплового шока происходил конститутивный синтез проинсулина/инсулина фибробластами. Он достигал приблизительно 60 нг/мл белка-продукта. Поскольку уровень экспрессии в таком режиме совпадал с таковым, наблюдаемым при трансфекции фибробластов ДНК плазмиды, где ген инсулина человека находился под собственным промотором, то мы предположили, что и в данном случае транскрипция гена проинсулина/инсулина происходит с собственного промотора.

Таким образом, в клетках ЛЭЧ под действием теплового шока наблюдается приблизительно 4-кратное увеличение экспрессии гена инсулина человека, находящегося под контролем регуляторной области гена *hsp70* дрозофилы, по отношению к уровню, обеспечиваемому его собственным промотором, т. е. имеет место индукция экспрессии данного гена. Это открывает интересную перспективу — организацию требуемого базового уровня синтеза целевого продукта и при необходимости увеличение его количества по команде извне.

STUDIES IN EXPRESSION OF HUMAN EXOGENOUS INSULIN GENE  
UNDER CONTROL OF REGULATORY REGION OF *hsp70*  
*DR. MELANOGASTER* GENE IN HUMAN FIBROBLASTS

L. N. Neborachko, L. L. Lukash, I. S. Varzanova, V. A. Kordium

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

S u m m a r y

A vehicle has been constructed where the human insulin gene is under control of the regulatory region of *hsp70 Dr. melanogaster* gene. The expression of this gene in human fibroblasts under the effect of heat shock has been studied. It is shown that four-fold increase in the expression of the human insulin gene is observed in response to heat shock.

Окончание см. на с. 106.

2. Соловьян В. Т., Костенюк И. А., Кунах В. А. Изменения генома культивируемых *in vitro* клеток раувольфии змеиной // Генетика.— 1987.— 23, № 7.— С. 1200—1208.
3. *Nucleic acid hybridization. A practical approach* / Eds B. D. Hames, S. J. Higgins.— New York: LRL press, 1986.— 225 p.
4. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1984.— 480 с.

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

Получено 05.06.89

Окончание. Начало см. на с. 88—90.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schlesinger M. J., Kelly P. M., Miperti G. Properties of three major heat shock proteins and their antibodies // Heat shock from bacteria to man.— New York: Cold Spring Harbor Lab, 1982.— P. 243—246.
2. Goldschmidt-Clermont M. E. Two genes for the major heat shock proteins of *Drosophila melanogaster* arranged as inverted repeat // Nucl. Acids Res.— 1980.— 8, N 2.— P. 235—252.
3. Craig E. A., McCarthy B. J., Wadsworth S. C. Sequence organization of two recombinant plasmids containing genes for the major heat shock induced protein of *Drosophila melanogaster* // Cell.— 1979.— 60, N 2.— P. 575—581.
4. Peiham H. R. B. A regulatory upstream promoter element in *Drosophila* Hsp70+heat shock gene // Ibid.— 1982.— 30, N 2.— P. 517—528.
5. High-level heat-regulated synthesis of proteins in eukaryotic cells / M. Dreano, J. Brochot, A. Myers et al. // Gene.— 1986.— 49, N 1.— P. 1—8.
6. Interferon production under the control of heterologous inducible enhancers and promoters / A. Masahite, N. Hitoshi, I. Yoichiro et al. // Microbiol. and Immunol.— 1988.— 32, N 6.— P. 589—596.
7. 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.
8. An G., Hidaka K., Siminoviitch L. Expression of bacterial  $\beta$ -galactosidase in animal cells // Mol. and Cell. Biol.— 1982.— 2, N 12.— P. 1628—1632.

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

Получено 24.07.89