

13. *Linkage disequilibrium between cystic fibrosis and linked DNA polymorphism in Italian families: a collaborative study* / X. Estivill, M. Farrall, R. Williamson et al // Amer. J. Hum. Genet.— 1988.— 43, N 1.— P. 23—28.

НИИ эксперим. медицины АМН СССР, Ленинград  
Ин-т акушерства и гинекологии АМН СССР, Ленинград  
Ин-т мед. генетики АМН СССР, Москва  
Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев  
НИИ охраны материнства и детства МЗ ЛитССР, Вильнюс

Получено 23.06.89

УДК 577.21

**В. П. Шульженко, С. Н. Новикова, И. Е. Костецкий,  
Л. П. Богацкая, В. В. Фролькис, В. А. Кордюм**

### **ИМПЛАНТАЦИЯ КЛОНИРОВАННОГО ГЕНА АпоА1 ЧЕЛОВЕКА ВЗРОСЛЫМ И СТАРЫМ КРОЛИКАМ**

*Сконструирована рекомбинантная ДНК, содержащая Апо-повтор человека и клонированный нами ген АпоА1 человека. Инъекция заключенного в липосомы генетического материала взрослым и старым кроликам приводит к появлению в крови экспериментальных животных белкового продукта гена АпоА1 человека, который обнаруживается иммуноэлектрофорезом в агарозном геле со специфической антисывороткой к этому белку. У экспериментальных животных происходит существенная перестройка содержания холестерина (ХС) и различных классов липопротеидов.*

**Введение.** В соответствии с современными представлениями о роли нарушений липидного и липопротеидного метаболизма в развитии атеросклероза многочисленные клинические и экспериментальные попытки профилактики и лечения этого заболевания основываются на использовании средств, снижающих уровень липидов в крови [1, 2]. Вместе с тем известно, что развитие атеросклероза сопряжено с изменениями не только липидной, но и белковой части липопротеидов — апопротеинов [3]. Аполипопротеин А1 — главный компонент (70 %) белковой фракции липопротеидов высокой плотности (ЛПВП), которые обладают способностью регулировать уровень ХС в крови и удалять его из клеток сосудов. Важная антиатерогенная роль этой фракции липопротеидов подтверждается большим количеством эпидемиологических исследований, показывающих, что представители человеческой популяции, имеющие высокий уровень ЛПВП, не болеют атеросклерозом, а дефициты данной фракции липопротеидов коррелируют с риском возникновения сердечно-сосудистых патологий [4—6]. Это определяет новые подходы к поиску антиатеросклеротических препаратов среди веществ, влияющих на синтез ЛПВП.

Исходя из вышесказанного, перспективной представляется попытка в случаях дефицита повысить уровень ЛПВП с помощью генотерапевтической коррекции. Данные литературы свидетельствуют о проведении большого числа исследований по клонированию Апо-генов человека и АпоА1-гена в частности [7, 8]. Показана экспрессия гена АпоА1 человека в культуре клеток человека и животных [9—11]. Вместе с тем характер экспрессии в культуре клеток и на уровне интактного организма, как можно ожидать, будет существенно отличаться. В этой связи нами поставлена задача — осуществить имплантацию гена А1 в клетки разных тканей модельных животных и изучить их функционирование на уровне интактных организмов. Настоящая работа является первым этапом данного исследования и посвящена определению принципиальной возможности экспрессии клонированного нами гена АпоА1 человека на экспериментальных животных *in vivo*.

**Материалы и методы.** Для клонирования гена АпоА1 человека была использована библиотека генов человека, сконструированная на основе  $\lambda$ -вектора Харон. 4А.

Скрининг рекомбинантных фагов проводили, как описано в [12]. В качестве зонда применяли химически синтезированный 40-членный олигонуклеотид, комплементарный структурной части гена ApoA1 человека. В работе использовали ферменты производства НПО «Фермент» (Вильнюс) и НИКТИ БАН (Бердск). Выделение плазмидной ДНК, обработку ДНК ферментами, электрофорез в агарозном геле проводили по общепринятым методикам [12]. Первичную структуру ДНК определяли по Максаму — Гилберту [13]. Липосомы состава фосфатидилхолин:ХС:дидецилфосфат (7:2:1) готовили методом упаривания с обращением фаз, ДНК заключали в них методом Ca-fusion [14].

Экспериментальным животным — взрослым и старым кроликам (12 животных) генетический материал вводили в печень, внутрибрюшинно или подкожно. При введении для каждого животного использовали 1 мл суспензии липосом, содержащих 13 мг липидов и 400 мкг плазмидной ДНК. Доля заключенной в липосомы ДНК составляла 7—8 %.

Экспрессию введенного гена оценивали с помощью ракетного иммуноэлектрофореза плазмы со специфической антисывороткой к человеческому ApoA1 и последующей количественной оценкой уровня белка по контрольной сыворотке человека, содержащей 125 мг/дл ApoA1 [15]. В плазме крови определяли: общий ХС [16], ХС-ЛПВП [17], процентное содержание фракций липопротеидов методом электрофореза в агарозном геле с последующей денситометрией [18].

Кровь для исследования брали из красной вены уха в исходном состоянии и через 18, 24, 48 ч после имплантации гена. Контрольным животным вводили липосомы без генетического материала.

**Результаты и обсуждение.** Скрининг 300 тыс. рекомбинантных фагов библиотеки генов человека позволил обнаружить клон, дающий положительный сигнал при дот-гибридизации с зондом к гену ApoA1

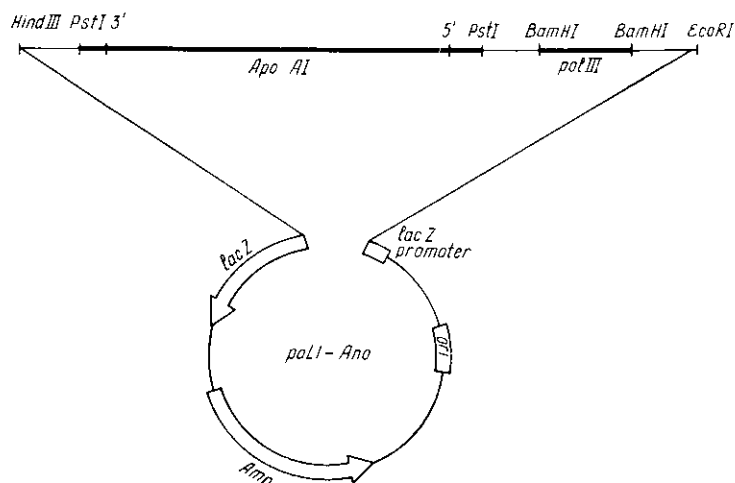


Рис. 1. Схема рекомбинантной плазмиды, содержащей ген ApoA1 человека

Fig. 1. A pattern of recombinant plasmid containing human ApoA1 gene

человека. ДНК этого фага обрабатывали рестрикционными эндонуклеазами *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII*, *PstI* и проводили блот-гибридизацию этим же зондом. *PstI*-фрагмент ДНК рекомбинантного фага являлся наименьшим из тех, что давали одну полосу при гибридизации с зондом, и был субклонирован в составе плазмиды *pUC18*. Картирование с использованием различных рестрикционных эндонуклеаз показало идентичность длин полученных рестрикционных фрагментов с таковыми гена ApoA1 человека, что было подтверждено секвенсом 5'-конца клонированного фрагмента ДНК.

Результаты наших исследований по изучению экспрессии клонированного гена АпоА1 человека в культуре клеток млекопитающих [11] позволили нам выбрать молекулярную конструкцию для проверки принципиальной возможности его экспрессии на уровне интактного организма. Рестрикционная карта плазмиды *paL1*-Апо приведена на рис. 1.

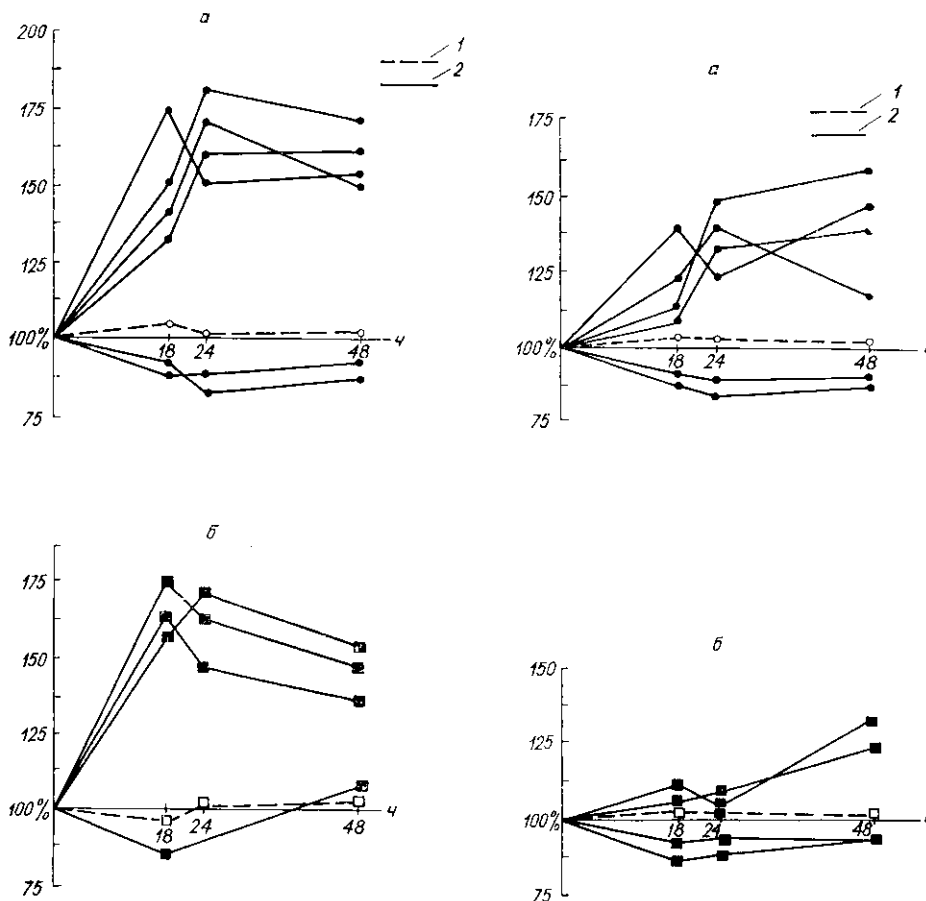


Рис. 2. Влияние имплантации гена АпоА1 человека на содержание общего ХС в крови взрослых (а) и старых (б) кроликов: 1 — контроль; 2 — после имплантации гена  
Fig. 2. Effect of human *ApoA1* gene implantation on total cholesterol in blood of adult (a) and old (б) rabbits: 1 — control; 2 — after gene implantation

Рис. 3. Влияние имплантации гена АпоА1 человека на содержание ХС-ЛПВП в крови взрослых (а) и старых (б) кроликов: 1 — контроль; 2 — после имплантации гена  
Fig. 3. Effect of human *ApoA1* gene implantation on content of HDL cholesterol in blood of adult (a) and old (б) rabbits: 1 — control; 2 — after gene implantation

Клонированный *PstI-PstI*-фрагмент ДНК содержит 7-членный АТ-богатый участок, выполняющий функцию промотора гена АпоА1 человека [19]. Однако данные по клонированию фрагментов 5'-нетранслируемой области гена АпоА1 человека [10] свидетельствуют о том, что для его экспрессии необходима последовательность большей протяженности, чем клонированный *PstI-PstI*-фрагмент. Поэтому при конструировании рекомбинантной ДНК, обеспечивающей экспрессию гена АпоА1 человека, мы исходили из необходимости введения в ее состав дополнительных регуляторных элементов. В литературе есть сведения о том, что на расстоянии около 1 т. п. н. от 3'-конца гена АпоА1 расположен *Alu*-повтор [19]. Такие повторы фланкируют многие другие структурные гены человека, однако их роль еще недостаточно хорошо изучена. Данные машинного анализа последовательностей *Alu*-повторов человека, проведенные в Ин-те молекуляр. биологии и генетики АН УССР,

подтверждают наличие в них сайтов узнавания для РНК-полимеразы III, которая, по некоторым данным, может усиливать работу РНК-полимеразы II [20]. Таким образом, сконструированная нами рекомбинантная ДНК содержала клонированный по *BamHI*-сайту полилинкера *Alu*-повтор человека, обеспечивала экспрессию гена АпоА1 человека в культуре клеток млекопитающих, а поэтому и была выбрана для введения модельным животным. Исследования показали, что введение данной молекулярной конструкции, содержащей ген АпоА1 человека, взрослым и старым кроликам независимо от возраста приводит к появлению в крови экспериментальных животных АпоА1, кото-

*Содержание различных фракций липопротеидов в крови взрослых и старых кроликов после имплантации гена АпоА1 человека (относительная концентрация, %)*

*Blood content's of different fractions of lipoproteins of adult and old rabbits after implantation of human ApoA1 gene (relative concentration, %)*

Условия эксперимента, ч	Взрослые			Старые		
	ЛННН	ЛПОНП	ЛПВП	ЛННН	ЛПОНП	ЛПВП
	Контроль (введение липосом без генетического материала)					
Исходный уровень	35,4±1,5	24,6±1,6	40,0±3,2	51,4±3,5	19,6±2,1	29,0±1,8
18	34,6±1,7	25,0±1,4	41,4±2,9	50,7±4,1	21,0±2,4	28,3±1,6
24	35,1±2,1	24,7±1,8	40,2±2,5	51,1±3,7	19,8±2,1	29,1±1,4
48	36,0±1,8	25,8±1,5	38,2±2,7	50,3±3,8	20,7±2,4	29,0±1,3
	Имплантация гена					
Исходный уровень	33,2±1,8	26,7±1,9	40,1±2,8	52,3±2,0	21,0±1,6	26,7±2,1
18	33,5±1,2	20,0±1,5	46,5±2,3	53,0±3,4	22,1±3,4	24,9±2,1
24	33,6±1,7	19,1±1,3	47,3±2,1	51,6±3,1	23,0±1,4	25,4±2,7
48	32,7±1,3	22,3±1,2	45,0±2,3	47,4±3,1	20,0±1,6	32,6±2,1

рый обнаруживается иммуноэлектрофорезом в агарозном геле со специфической антисывороткой к этому белку человека. В крови контрольных животных преципитация не проявляется. Количественная оценка уровня обнаруженного белка в плазме крови кроликов выявила, что содержание его колеблется от 0,510 до 0,965 мг/дл. Белок обнаруживается в крови экспериментальных животных через 24 ч после имплантации гена. Другие сроки после имплантации не исследовались, так как задачей данной работы была принципиальная оценка возможности эффекта экспрессии вводимого гена А1 человека.

В крови опытных кроликов через 18, 24 и 48 ч обнаружены изменения в содержании общего ХС. Из данных, представленных на рис. 2, видно, что они неоднородны, порой разнонаправленны. Однако преимущественно наблюдается рост уровня ХС. Вполне вероятно, что нарастание общего ХС происходит за счет увеличения ХС-ЛПВП. Это подтверждается обнаруженными изменениями количества данной фракции ХС (рис. 3). У опытных животных изменения содержания ХС-ЛПВП происходят уже через 18 ч после имплантации гена. Обращает на себя внимание более значительная выраженность указанных изменений у взрослых животных по сравнению со старыми. Так, если у взрослых животных максимальный прирост ХС-ЛПВП происходит через 24 ч и составляет в среднем 40,3 %, то у старых максимум увеличения ХС-ЛПВП приходится на 48 ч и составляет всего 23,8 %. Такая же закономерность обнаруживается и в изменении процентного содержания ЛПВП (таблица). Из приведенных данных видно, что относительная концентрация ЛПВП у взрослых животных увеличивается через 24 ч после имплантации гена, а у старых — через 48 ч. Следует отметить, что у двух кроликов (взрослого и старого) было обнаружено снижение

относительной концентрации ЛПВП. Это свидетельствует о значительной индивидуальной вариабельности животных по отношению к вводимому гену, что составит предмет последующих исследований. На данном этапе работы не представляется возможным проанализировать механизм, приводящий к изменению количества ЛПВП и содержащегося в них ХС. Остается неясным, связано это с зарегистрированным увеличением синтеза АпоА1 и ЛПВП или же является результатом каких-то регуляторных сдвигов. Решение этого вопроса имеет большое значение и требует дальнейших исследований.

Имплантация гена А1 человека взрослым и старым кроликам приводит к появлению человеческого апопротеина А1 в крови экспериментальных животных, к существенным изменениям содержания ХС и соотношения различных классов липопротеидов. Теперь необходимо установить, в какой мере АпоА1, образующийся в результате имплантации, участвует в синтезе и катаболизме ЛПВП у экспериментальных животных, как долго может работать предложенная конструкция и как обеспечить заданную длительность функционирования, каково количество и функциональная активность нарабатываемого в этих условиях белка и как выводить ее на требуемый уровень.

Полученные на данном этапе экспериментальные данные обосновывают целесообразность поиска путей генной терапии атеросклероза.

#### TRANSFER OF CLONED HUMAN GENE *APOA1* INTO ADULT AND OLD RABBITS

V. N. Shulhzenko, S. N. Novikova, I. E. Kostetsky, L. N. Bogatskaya,  
V. V. Frotkis, V. A. Kordium

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

#### Summary

Recombinant DNA containing Alu-repeat and cloned human *ApoA1* gene has been constructed. Genetic material included into a liposome and injected into adult and old rabbits has resulted in the appearance of human *ApoA1* protein product in the rabbit blood. This product was identified by agarose gel immunoelectrophoresis with specific antiserum. Essential rearrangement of cholesterol content and different classes of lipoproteins has been observed in the rabbit blood.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ренин В. С. Современные молекулярно-клеточные основы липопротеидной теории атеросклероза. — М.: ВПНИМН, 1987. — 68 с.
2. Иммунореактивность и атеросклероз / Под ред. А. Н. Климова. — Л.: Медицина, 1986. — 160 с.
3. Липопротеиды высокой плотности и атеросклероз / Под ред. А. Н. Климова, Р. И. Леви. — М.: Медицина, 1983. — 318 с.
4. *Lipoproteins and coronary heart disease* / Eds H. Greten, P. D. Lang, G. Shettler. — New York: Gerhard Witzstroch Publ. House, 1980. — 203 p.
5. Bustow J. L. Apolipoprotein genetic variation and human disease // *Physiol. Rev.* — 1988. — 68, N 1. — P. 85—132.
6. *Apolipoproteins and cardiovascular risk: genetics and epidemiology* / Ch. F. Sing, E. Boerwinkle, P. P. Moll, I. Davignon // *Ann. Biol. Clin.* — 1985. — 43. — P. 411—417.
7. Lawrence Ch. The structure of the human apolipoprotein genes // *Hepatology*. — 1987. — 7, N 1. — P. 56—60.
8. Karatanasis S. K., Zannis V. I., Brestow J. L. Isolation and characterization of the human apolipoprotein A-1 gene // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 1983. — 80, N 19. — P. 6147—6151.
9. Secretion of apolipoprotein A-1 in lipoprotein particles following transfection of the human apolipoprotein A-1 gene into 3T3 cells / S. Lamou-Fava, I. M. Ordovas, G. Mandel et al. // *J. Biol. Chem.* — 1987. — 262, N 19. — P. 8944—8947.
10. Kedarnath S. N., Udo S., Karatanasis S. K. Different cis-acting DNA element control expression in the human apolipoprotein A-1 gene in different cell types // *Mol. and Cell. Biol.* — 1988. — 8, N 2. — P. 605—614.

11. Клонирование гена ApoM1 человека и его экспрессия в фибробластах мыши / В. Н. Шульженко, Л. Л. Лукаш, Л. П. Шуляк и др. // Биополимеры и клетка. — 1989. — 5, № 5. — С. 105—107.
12. Манниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1980. — 479 с.
13. Gilbert W., Maxam A. M. A new method for sequencing DNA // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1977. — 74, N 2. — P. 560—564.
14. Марголис Л. Б., Бергельсон Л. Д. Липосомы и их взаимодействие с клетками. — М.: Наука, 1986. — 240 с.
15. Гааль Э., Медьеша Г., Верецки Л. Электрофрез в разделении биологических макромолекул. — М.: Мир, 1982. — 446 с.
16. A simplified method for the estimation of total cholesterol in serum and demonstration of its specificity / L. L. Abell, B. B. Levy, B. B. Brodie, F. E. Kendall // J. Biol. Chem. — 1952. — 195, N 1. — P. 357—366.
17. Киряков А., Тингерова Э. Определение холестерина и триглицеридов в липопротеидах сыворотки крови, выделенных методом двойной沉淀итации // Лаб. дело. — 1979. — № 7. — С. 398—402.
18. Киряков А., Тингерова Э., Стоянова С. Электрофореза на серуминте липопротеини върху агарозен гел // Съевр. медицина. — 1977. — 28, № 4. — С. 29—35.
19. Breslow J. L. Human apolipoprotein molecular biology and genetic variation // Ann. Rev. Biochem. — 1985. — 54. — P. 699—727.
20. Корнеев С. А. Повторяющиеся последовательности генома человека // Генетика. — 1988. — 24, № 6. — С. 965—979.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики АН УССР, Киев  
НИИ геронтологии АМН СССР, Киев

Получено 23.06.89

УДК 577.21:579.25.5

**Т. Г. Титок, И. Е. Костецкий, Т. Л. Чайковская, Т. П. Кочубей,  
Л. Г. Жарова, С. Д. Кириленко, И. М. Мельник, Е. М. Сильванская,  
Т. И. Бужиевская, В. А. Кордюм**

## **ПЕРЕНОС ГЕНА ПРЕПРОИНСУЛИНА ЧЕЛОВЕКА КРЫСАМ С ИСКУССТВЕННО ВЫЗВАННЫМ ДИАБЕТОМ**

*Крысам со стрептозотоциновым (СТЦ) диабетом инъекцировали в печень включенный в липосомы плазмиду с геном препроинсулина человека (pAINS). Введение pAINS вело к снижению гликемии и повышению концентрации иммунореактивного продукта в крови с максимальным эффектом через 6—8 ч после инъекции. Через 24 ч показатели возвращались к исходным уровням.*

**Введение.** Технология рекомбинантных ДНК достигла таких успехов, которые позволяют целенаправленно получать в достаточном количестве функционально активные конструкции. Экспериментально показано, что перенесенные гены могут экспрессироваться в гетерологичных клетках [1—3]. Манипулирование генами позволило исследователям поставить вопрос о возможности лечения наследственных болезней с помощью трансплантации. Был разработан и ряд подходов к осуществлению коррекции некоторых заболеваний: трансформация извлеченных из организма клеток костного мозга или фибробластов необходимым геном с последующей реимплантацией тем же животным [4, 5], а также введение защищенных генов непосредственно в организм [6]. О генотерапии высказываются разные мнения, но интерес к ней по-прежнему не ослабевает [7, 8]. Для оценки эффективности и побочных действий такой терапии требуется широкая апробация последней на модельных животных. В настоящей работе представлены предварительные результаты по трансплантации гена препроинсулина человека крысам с искусственно вызванным диабетом.

**Материалы и методы.** Плазмида pAINS получена путем введения *SalGI-EcoRI*-фрагмента 9, содержащего ген препроинсулина человека, в сайт *SalGI* плазмиды pALI (*pUC18*, в которой по *BamHI*-сайту встроил *Alu*-фрагмент геномной ДНК чело-