

12. *In vivo* expression of rat insulin after intravenous administration of the liposome-entrapped gene for rat insulin I / C. Nicolau, C. le Pape, Ph. Soriano et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1983.—80, N 4.—P. 1068—1072.
13. Gynheung An., Hidaka K., Siminovitsh L. Expression of bacterial  $\beta$ -galactosidase in animal cells // Mol. and Cell. Biol.—1982.—2, N 12.—P. 1628—1632.
14. Зильбер А. Иммунологический анализ.—М.: Медицина, 1968.—185 с.
15. Seglen P. O. Effects of amino acids, ammonia and leupeptin on protein synthesis and degradation in isolated rat hepatocytes // Biochem. J.—1978.—174, N 3.—P. 469—474.
16. Coons A. H., Ledis E. M., Connolly J. M. Studies on antibody production. 1. A method for the histochemical demonstration of specific antibody and its application to a study of the hyperimmune rabbit // J. Exp. Med.—1955.—102, N 1.—P. 49—59.
17. Грегориадис Г., Аллис Н. А. Липосомы в биологических системах.—М.: Медицина, 1983.—384 с.
18. Giudice G. J., Fuchs E. The transfection of epidermal keratin genes into fibroblasts and simple epithelial cells: evidence for inducing a type I keratin by a type II // Gene Cell.—1987.—48, N 3.—P. 453—463.
19. T-lymphocyte priming and protection against Friend leukemia by vaccina-retrovirus *env* gene recombinant / P. L. Earl, B. Moss, R. P. Morrison et al. // Science.—1986.—234, N 4777.—P. 728—731.
20. Peterson R. G., Lamb R. A. Ability of the hydrophobic fusion-related external domain of a paramyxovirus F. protein to act as a membrane anchor // Cell.—1987.—48, N 3.—P. 441—452.
21. Трансформация клеток костного мозга грызунов рекомбинантной плазмидой *pBRSV* / Т. Б. Казакова, В. А. Шатов, И. А. Вербина и др. // Цитология.—1986.—28, № 12.—С. 1345—1350.

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

Получено 09.09.88

УДК 577.21:579.25.5

## ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ЭКСПРЕССИИ ЭКЗОГЕННОГО ГЕНА ИНСУЛИНА ЧЕЛОВЕКА В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ФИБРОБЛАСТАХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

**Л. Н. Неборачко, Л. Л. Лукаш, Б. М. Трояновский,  
И. С. Варзанова, Т. И. Бужневская, В. А. Кордюм**

Во всем мире наблюдается рост заболеваемости диабетом. По некоторым оценкам он занимает третье место среди причин смертности в развитых странах мира. Разработка методов лечения этой патологии является одной из первоочередных задач биотехнологии в медицине [1]. Биотехнология в западных странах добилась значительных успехов в производстве инсулина человека генноинженерным путем. В то же время единственным радикальным мероприятием, способным устранить молекулярную основу инсулинзависимого диабета, является перенос гена инсулина человека пациентам в такой молекулярной конструкции, которая обеспечивает его экспрессию в клетках больных, в том числе в неспециализированных.

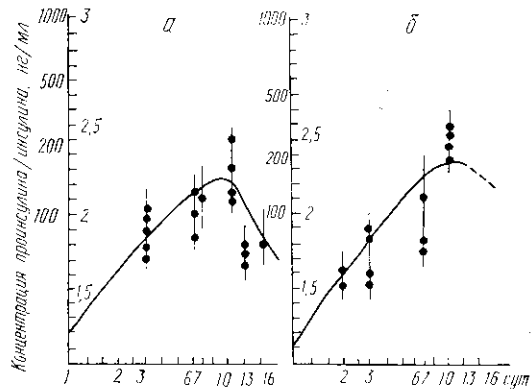
Экспрессия гена инсулина у взрослых животных происходит в  $\beta$ -клетках поджелудочной железы, составляющих лишь 1% общего числа ее клеток. У эмбрионов млекопитающих инсулин синтезируется также в печени [2], нервной ткани (мозге) [2—5], желточном мешке [6]. Клетки мозга обладают более слабой системой процессирования этого гормона, чем клетки поджелудочной железы: проинсулин в первом случае значительно превышает содержание инсулина [5]. У человека ген, кодирующий инсулин, расположен в 11-й хромосоме. Его структурная часть состоит из трех экзонов и двух интронов. Регуляция экспрессии обеспечивается 5'-фланкирующей областью, включающей уникальные последовательности и тандемные повторы [7]. Эта область обеспечивает ту высокую тканеспецифичность, которая и отмечалась выше. Поэтому для экспрессии гена инсулина в клетках, в которых он в норме не работает, обычно используют стандартный прием присоеди-

нения структурной части этого гена к иной регуляторной последовательности. Так, в частности, была продемонстрирована продукция проинсулина в культуре персистируемых клеток почки зеленой мартышки CV1 [8] и COS [9, 10]. В этом случае в клетки вводили экзогенный ген инсулина человека с регуляторными элементами вируса SV40. Подобных экспериментов проведено уже немало.

Известно, что биосинтез инсулина в поджелудочной железе стимулируется глюкозой [11]. В нестимулированных глюкозой клетках значительная часть мРНК инсулина находится вне полисомов и менее эффективна как матрица для синтеза белка [13]. В условиях, стимулирующих синтез инсулина (т. е. высокое содержание глюкозы), производство инсулина крысы в 10 раз возрастает [13].

Синтез проинсулина / инсулина фибробластами человека (а) и мыши (б), трансфицированными плазмидной ДНК, несущей ген инсулина человека

Synthesis of proinsulin / insulin by human fibroblasts (a) and murine fibroblasts (b) transfected with plasmid DNA carrying exogenous human insulin gene



Если же из всех регуляторных последовательностей 5'-фланкирующей области гена инсулина остается только промотор и участок, инициирующий трансляцию, а остальные удаляются и вводится дополнительный «универсальный» промотор ранних генов SV40, то синтез становится конститутивным и не зависит от добавления глюкозы, дексаметазона, инсулина и др. агентов, влияющих в норме на продуктивность β-клеток [14].

Целью настоящего исследования было изучение возможности экспрессии геномного гена инсулина человека в культивируемых фибробластах различного происхождения с собственного промотора.

Ген инсулина человека, содержащий промотор, но без регуляторного участка, обеспечивающего тканеспецифичность экспрессии [15], был клонирован в бактериальной плазмиде pBR322.

Объектом исследования служили клетки эмбрионального легкого человека (диплоидный штамм ЛЭЧ), которые получены нами из коллекции Ин-та вирусологии АМН СССР им. Д. И. Ивановского, и культивируемые клетки мыши (линии СЗН10Т1/2) [16].

Трансфекцию клеток проводили кальций-фосфатным методом [17]. Концентрация трансформирующей ДНК составляла 10 мкг/мл на 10<sup>6</sup> клеток, концентрация ДНК-носителя из молок сельди равнялась 20 мкг/мл (коммерческий препарат). Кальций-фосфатный преципитат наносили на монослой клеток через трое суток после роста на поверхности стеклянных матрасов. Клетки культивировали на среде Игла с добавлением 10 % сыворотки крупного рогатого скота, обедненной инсулином (менее 1 нг/мл). После трансфекции отбор проб культуральной среды производили через 1, 2, 3, 6—7, 10, 13—14 и 16 сут. С этой целью клетки накануне отбора проб дважды отмывали средой Игла и вновь вносили порцию свежей среды Игла с глюкозой (1800 мг%), но без сыворотки. Через 20 ч после этого собирали среду с каждого матраса отдельно и определяли в пробах содержание белка-продукта методом твердофазного конкурентного иммуноферментного анализа [18]. Моноклональные антитела для иммуноферментного анализа были любезно предоставлены нам сотрудником Ин-та биомед. технологии МЗ СССР С. Н. Курочкиным. Данные антитела, узнающие общую детерминанту для инсулина и проинсулина млекопитающих, позволяют определить с

достаточной точностью содержание соответствующих белков в концентрации 30 нг и выше в пробах культуральной жидкости в отсутствие сыворотки.

Усредненные результаты трех независимых экспериментов представлены на рисунке. Через сутки после введения рекомбинантной ДНК в клеточную систему уровень тестируемого белка в пробах не отличался от контрольного значения. Начиная с трех и далее вплоть до десяти суток наблюдается значительное увеличение концентрации исследуемого продукта в культуральной среде и затем на 13-е сут — снижение выхода изучаемого белка. Наблюдается сходная зависимость секреции белка — продукта гена инсулина от времени для фибробластов человека и мыши.

Из этого следует, что такие процессы, как транскрипция, трансляция и секреция белка-продукта, введенного в клетки гена инсулина, не являются ткане- и видоспецифическими. Синтезируемый продукт является биологически активным. В пробах культуральной среды, где выявляется продукт гена инсулина, наблюдается снижение содержания глюкозы на 100—400 мг%. Это свидетельствует о специфической функциональной активности белка, однако, как уже указывалось, используемый метод иммуноферментного анализа не позволяет установить, секретируют клетки инсулин или проинсулин, т. е. происходит ли процессинг белка в исследуемых клетках.

Из литературных источников известно, что в перевиваемых клетках почки обезьяны *CV1*, содержащих экзогенный ген инсулина человека, происходит синтез проинсулина без процессинга в инсулин [9]. Однако в указанной работе был использован геномный ген инсулина с собственной регуляторной зоной и с регуляторными последовательностями вируса *SV40*.

В работах, где исследователи вводили в клетки млекопитающих экзогенный ген инсулина, они, как правило, использовали два промотора. Один из них принадлежал 5'-фланкирующей области гена инсулина человека, а второй, дополнительный, — конститутивный, обеспечивающий тканезависимую экспрессию. В таких конструкциях вклад в биосинтез инсулина его собственного промотора невелик. Так, при тандеме промотора *Ad2* и инсулинового с последнего транскрибируется всего 5 % инсулиновой мРНК, а с первого — 95 % [10]. В наших же опытах высокий уровень экспрессии инсулинового гена обеспечивался его собственным единственным промотором. Можно думать, что введение дополнительного промотора может ингибировать активность собственного инсулинового, что требует тщательного изучения создаваемых молекулярных конструкций.

Таким образом, в данной работе получены определенные доказательства того, что ген инсулина человека без регуляторной области, ответственной за тканеспецифичность экспрессии, продукт которого определяется иммуноферментным методом с использованием моноклональных антител к проинсулину/инсулину, может функционировать в культивируемых фибробластах различного происхождения. В фибробластах человека и мыши наблюдается сходная зависимость секреции белка — продукта гена инсулина от времени после введения трансформирующей ДНК, несущей ген инсулина человека. Уровень секретиремого белка достоверно повышается по сравнению с контролем с 3-х по 10-е сут, а затем резко снижается.

Остается пока невыясненным поведение таких клеток при субкультивировании, а также является ли тестируемый продукт инсулином или проинсулином. Выяснению данных вопросов будут посвящены дальнейшие исследования.

STUDIES IN POSSIBILITY OF EXPRESSION OF EXOGENIC HUMAN  
INSULIN GENE IN CULTURED MAMMALIAN FIBROBLASTS

L. N. Neborachko, L. L. Lukash, B. M. Troyanovsky,  
I. S. Varzanova, T. I. Buzhievskaya, V. A. Kordium

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

S u m m a r y

Expression of human insulin genomic gene is observed in human and murine fibroblasts. Protein-product (proinsulin or insulin) detected by ELISA is secreted by fibroblasts. The protein-product secreted level achieves its peak on 9th-10th days and may be expressed in 125-160 ng/ml of culture medium. The similar dependence of proinsulin / insulin secretion by human and murine fibroblasts is determined.

1. Jones G. Biotechnology is set to improve patient care // *Pract. Biotechnol.*—1986.—7, N 11.—P. 2.
2. Cordell B., Goodman H. M. Evolution of the mammalian insulin gene // *Genes and tumor genes.*—New York: Raven press, 1982.—P. 115—119.
3. Blundell T. L., Humbell R. E. Hormone families: pancreatic hormones and homologous growth factors // *Nature.*—1980.—287, N 5785.—P. 781—787.
4. De Haen C., Swanson E., Teller D. C. The evolutionary origin of proinsulin // *J. Mol. Biol.*—1976.—106, N 3.—P. 639—661.
5. Birch N. P., Christie D. L., Renwick A. G. Proinsulin-like material in mouse foetal brain cell cultures // *FEBS Lett.*—1984.—168, N 2.—P. 229—302.
6. Narang S. A., Brousseau R. The human preproinsulin gene: synthesis, cloning gene modification and expression studies // *Can. J. Biochem. Cell. Biol.*—1984.—62, N 4.—P. 209—217.
7. Niven M. J., Hitman G. A. The molecular genetics of diabetes mellitus // *Biosci. Repts.*—1986.—6.—P. 501—512.
8. Expression of the human insulin gene in an alternate mammalian cell and cell extracts / O. Laub, Z. Rall, G. J. Bell, W. J. Rutter // *J. Biol. Chem.*—1983.—258, N 10.—P. 6037—6042.
9. Gluzman Y. SV40 transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants // *Cell.*—1981.—23, N 1.—P. 175—182.
10. Laub O., Rutter W. J. Expression of the human insulin gene and cDNA in a heterologous mammalian system // *J. Biol. Chem.*—1983.—258, N 10.—P. 6043—6050.
11. Itoh N., Okamoto H. Translational control of proinsulin synthesis by glucose // *Nature.*—1980.—283, N 5742.—P. 100—102.
12. Disproportionate expression of the two nonallelic insulin genes in pancreatic tumor is due to translational control // *Cell.*—1982.—31, N 2.—P. 531—542.
13. Kakita R., Giddinds 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.
14. Expression of a preproinsulin- $\beta$ -galactosidase gene fusion in mammalian cells / D. A. Nielsen, J. Chou, A. J. Mac-Krell et al. // *Ibid.*—1983.—80, N 17.—P. 5198—5202.
15. Молекулярное клонирование гена инсулина человека / Н. С. Незнанов, Б. М. Трояновский, А. Л. Гаргель и др. // *Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология.*—1987.—№ 7.—С. 14—16.
16. Resnikoff C. A., Brancow D. W., Heidelberggerger Ch. Establishment and characterization of a cloned line of C3H mouse embryo cells sensitive to postconfluence inhibition of division // *Cancer Res.*—1973.—33, N 3.—P. 3231—3238.
17. Graham F. Z., van der Eb A. J. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA // *Virology.*—1973.—52, N 2.—P. 456—467.
18. Antigen variation of influenza A virus nucleoprotein detected with monoclonal antibodies / K. L. van Wyke, W. J. Hinshom, W. J. Beam et al. // *J. Virol.*—1980.—35, N 1.—P. 24—80.

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

Получено 10.11.87