

9. Монченко В. И., Анистратенко В. В. Попытка определения эвригалинности группы по ее видовому разнообразию в морях с градиентом солености // Экология моря. – 2001. – Вып. 56. – С. 35–40.
10. Poppe G. T., Goto Y. European Seashells. Vol. I (Polyplacophora, Caudofoveata, Solenogastra, Gastropoda). – Wiesbaden: Verl. Christa Hemmen, 1991. – 352 p.
11. Анистратенко В. В., Стадниченко А. П. Литторинообразные. Риссоиобразные (Littoriniformes. Rissoiformes) // Фауна Украины: В 40 т. Т. 29: Моллюски: Вып. 1. Кн. 2. – Киев: Наук. думка, 1995. – (1994). – 175 с.
12. Халиман И. А., Анистратенко В. В., Анистратенко О. Ю. Моллюски северо-западной части Азовского моря: фауна, особенности распространения и экологии // Вестн. зоологии. – 2006. – 40, вып. 5. – С. 397–407.
13. Пузанов И. И. Последовательные стадии медитерранизации фауны Черного моря (Новые данные) // Гидробиол. журн. – 1965. – 1, № 2. – С. 54.
14. Карпевич А. Ф. Теория и практика акклиматизации водных организмов. – Москва: Пищ. пром-сть, 1975. – 432 с.
15. Чухчин В. Д. Экология брюхоногих моллюсков Черного моря. – Киев: Наук. думка, 1984. – 176 с.

Институт зоологии им. И. И. Шмальгаузена
НАН Украины, Киев

Поступило в редакцию 11.09.2006

Институт геологических наук НАН Украины, Киев

УДК 577.218

© 2007

Ю. М. Гільчук, О. М. Сухорада, Т. А. Рубан, Д. М. Іродов,
О. К. Топорова, член-кореспондент НАН України В. А. Кордюм

Експресія гена аполіпопротеїну А-1 людини під контролем різних регуляторних послідовностей стабільними трансформантами СНО-К1

The recombinant plasmids (pTRapo-neo^R, pTRapohCMVintronA-neo^R, and pTRapohCMV β-actin-neo^R) containing the human genomic apolipoprotein A-1 (apoA-1) gene under control of several transcriptional regulatory elements and neomycinphosphotransferase gene (neo^R) have been constructed. The expression of human apoA-1 gene for all pools of stable transformants has been detected. A higher level of the expression of the transgene for pools obtained by the transfection with pTRapohCMVintronA-neo^R and pTRapohCMV β-actin-neo^R than that with pTRapo-neo^R has been shown.

Рівень експресії введених у клітини ссавців генів, як відомо, залежить від багатьох причин, у тому числі і від сили елементів регуляції транскрипції. Для корекції порушень, що викликані дефіцитом експресії певного гена в організмі, часто необхідно забезпечити високий рівень експресії цільового трансгена для досягнення фізіологічних концентрацій білка та, відповідно, терапевтичного ефекту. Тому однією з перспективних стратегій розв'язання проблеми низького рівня експресії трансгенів є оптимізація вже відомих та пошук нових, більш сильних регуляторних послідовностей.

З літературних джерел відомо, що введення деяких геномних елементів, зокрема інтронів та 3'- і 5'-послідовностей, що не транскрибуються, до кДНК цільових генів призводить до

підвищення рівня експресії трансгена як у культурах клітин *in vitro*, так і в трансгенних тваринах *in vivo* [1, 2]. Механізм впливу таких послідовностей на рівень експресії трансгенів не в усіх випадках відомий, але його пов'язують з такими явищами, як підвищення швидкості транскрипції, підвищення стабільності та транспорту і/або підвищення ефективності формування 3'-кінця мРНК при її дозріванні. Іншими дослідниками [3, 4] з використанням маркерних генів було показано, що гібридні послідовності енхансер середньораннього гена цитомегаловірусу людини/промотор гена β -актину курчати з першим інтроном гена β -актину курчати (CAG послідовність) та енхансер/промотор середньораннього гена цитомегаловірусу людини з інтроном А того ж гена (hCMV-intronA послідовність) забезпечують найбільший рівень експресії трансгена *in vitro* і *in vivo*.

Нами на базі вектора pTRapo (в якій ген аполіопротеїну А-1 (*anoA-1*) людини знаходиться під регуляцією промотору першого середньораннього гена цитомегаловірусу людини (промотор hCMV IE)) створено рекомбінантні плазмиди, в яких цільовий ген знаходиться під регуляцією саме цих елементів (CAG послідовність — pTRapohCMV β -actin, hCMV-intronA послідовність — pTRapohCMV-intronA), та досліджено особливості експресії трансгена *anoA-1* людини під контролем даних елементів *in vitro* при транзиторному синтезі при використанні клітин CHO-K1 [5].

Метою проведеного дослідження було введення до складу векторів експресії pTRapo, pTRapohCMV-intronA та pTRapohCMV β -actin, які містять під транскрипційним контролем різних гібридних елементів геномний варіант гена *anoA-1* людини, послідовності гена неоміцинофосфотрансферази (*neo^R*), одержання стабільних трансформантів для кожної отриманої генетичної конструкції та вивчення при їх використанні експресії *anoA-1* людини в клітинах стабільних трансформантів CHO-K1.

Матеріали та методи дослідження. Для конструювання векторів експресії використовували плазмиди pTRapo [6], pTRapohCMV-intronA [5], pTRapohCMV β -actin [5], які містять повнорозмірний ген *anoA-1* людини, pTRUF, яка була люб'язно надана доктором С. Золотухіним (Gene Therapy Center Vector Core Lab, США), pBlusKM ("Fermentas", Литва) та бактеріальний штаб *Escherichia coli* DH10B (*F⁻ mcrA Δ (mrr⁻ hsdRMS-mcrBC) Φ 80dlacZ Δ M15 Δ lacX74 deoR recA1 endA1 araD139 Δ (ara, leu)7697 galU galK λ^- rpsL nupG*) ("Invitrogen", США).

Ампліфікацію гена *neo^R* проводили методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) на приладі Gene ATAQ Controller ("Amersham Biosciences", Швеція). Послідовності олігонуклеотидів для ампліфікації ДНК розраховували з використанням програми Vector NTI за гомології до відомої ДНК-послідовності гена *neo^R*, а також вводили сайти рестрикції MunI:

Mun-Neo asn : 5'-TGTACCAATTGTAGTTCGACCTCGAGCAGTGTG-3'

MunI

Mun-Neo sn : 5'-TGTACAATTGAGATCTCTCCCCAGCATGCC-3'

MunI

Ампліфікацію гена *neo^R* проводили з використанням як матриці плазмиди pTRUF. Температурний режим для ПЛР підбирали з урахуванням довжини і складу праймерів. Реакція ампліфікації була запрограмована на 20 циклів: денатурація — 94 °C, 20 с; гібридизація праймерів з матрицею — 50 °C, 30 с; елонгація — 72 °C, 30 с.

Роботи з бактеріальними культурами, трансформацію *E. coli*, рестрикцію та лігування ДНК проводили за стандартними методами як описано в [7]. Отримані рекомбінантні плазмиди перевіряли рестрикційним аналізом. Плазмідну ДНК виділяли як описано в роботі [5].

У роботі використовували лінію клітин CHO-K1, одержану з Російської колекції клітинних культур (Санкт-Петербург). Клітини культивували як описано в роботі [5].

За дві доби до проведення трансфекції клітини висівали по $1,5 \cdot 10^5$ у 3,5 см чашки Петрі. Трансфекцію проводили за допомогою розгалуженого поліетиленіміну (ПЕІ) (25 кД, "Aldrich", США) як описано в роботі [5]. Після трансфекції клітини вирощували протягом двох днів на середовищі F10, що містив 10% ембріональної телячої сироватки. Для відбору стабільних трансформантів клітини CHO-K1 вирощували протягом двох тижнів на селективному середовищі, що містило 20% ембріональної телячої сироватки та 1 мг/мл антибіотика G418 ("USB").

Тотальну ДНК з клітин виділяли набором реактивів Genomic DNA Purification kit ("Fermentas"). Наявність гена *apoA-1* людини в тотальній ДНК трансформованих клітин визначали методом ПЛР, використовуючи праймери:

Ap-f : 5'-TGAAAGCTGCGGTGCTGACCTTGG-3',

Ap-r : 5'-ATCTCCTCCTGCCACTTCTTCTGG-3'.

Розрахунок послідовностей праймерів проводили за допомогою програми Vector NTI.

Загальний об'єм реакційної суміші становив 25 мкл. Для проведення реакції використовували Taq-полімераза ("Амплісенс", Росія). Кожен цикл проходив за таких температурних та часових режимів: денатурація — 94 °C, 20 с; гібридизація з матрицею — 62 °C, 30 с; елонгація — 72 °C, 30 с, 30 циклів. ПЛР реакцію проводили на приладі Biometra Personal Cycler. Електрофоретичне розділення продуктів ампліфікації проводили в 1,0%-му агарозному гелі.

Накопичення ApoA-1 людини трансформантами CHO-K1 визначали методами вестерн-блотингу, дот-блотингу та непрямого твердофазного імуноферментного аналізу (ELISA) як описано в роботі [5].

Статистичну обробку даних виконували з використанням програми Graph Pad Prism 4 (www.graphpad.com).

Результати дослідження та їх обговорення. Слід зазначити, що рівень експресії трансгена під контролем одного і того ж тканиннонеспецифічного промотору чи гібридної послідовності може значно змінюватись залежно від типу та походження клітин, в яких відбувається експресія, а також від послідовності цільового гена. Враховуючи вищенаведене, важливо було встановити рівень експресії гена *apoA-1* людини під регуляцією CAG та hCMV-intronA послідовностей. Важливим є те, що для досліджень ми використовували повнорозмірний варіант гена *apoA-1* людини, а позитивний ефект вищезазначених послідовностей раніше показано при використанні кДНК трансгенів.

Транзиторна експресія є стандартним методом дослідження промоторів та інших елементів регуляції транскрипції гена в культурах клітин *in vitro* [4, 8], однак цей підхід потребує великої кількості повторів досліду та використання методу переносу цільової ДНК з високою ефективністю трансфекції клітин для одержання достовірного результату. Крім транзиторної експресії трансгена для порівняння промоторів деякі дослідники [4] також застосовують аналіз рівня синтезу цільового білка пулом стабільних трансформантів. Такий підхід дозволяє виключити з аналізу клітини, в які при трансфекції не потрапив цільовий ген. З іншого боку, рівень експресії в даному випадку залежить від "ефекту положення"

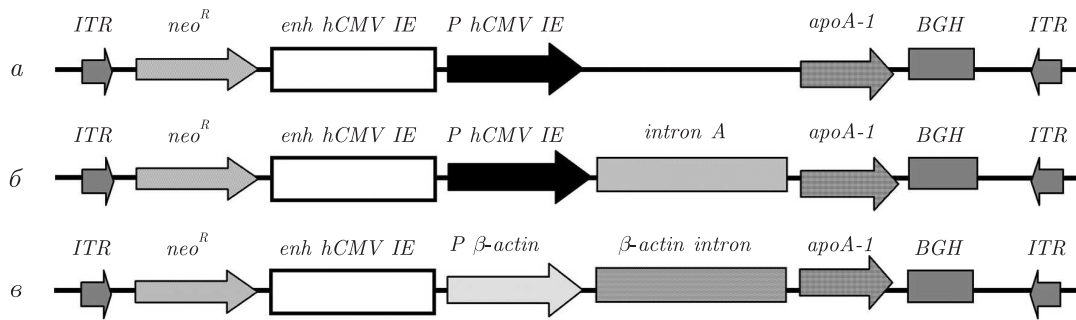


Рис. 1. Схема розташування елементів експресійної касети у векторах: *a* — pTRapo-*neo^R*; *б* — pTRapohCMV-intronA-*neo^R*; *в* — pTRapohCMVβ-actin-*neo^R*. *ITR* — інвертовані термінальні повтори аденоасоційованого вірусу; *neo^R* — ген неоміцинофосфотрансферази; *enh hCMV IE* — енхансер середньораннього гена цитомегаловірусу людини; *P hCMV IE* — промотор середньораннього гена цитомегаловірусу людини; *intron A* — інтрон A середньораннього гена цитомегаловірусу людини; *P β-actin* — промотор гена β-актину курчати; *β-actin intron* — перший інтрон гена β-актину курчати; *apoA-1* — ген аполіпропротеїну A-1 людини; *BGH pA* — сайт поліаденілювання бичачого гена гормону росту

(position effect), тобто на нього впливають регуляторні хромосомні елементи, оскільки експресія трансгена відбувається з інтегрованих векторних послідовностей. Для того щоб зменшити вплив “ефекту положення” на рівень синтезу цільового білка, як правило, експресію трансгена визначають у пулі стабільних трансформантів, а не в окремих клонах.

Для оцінки впливу вищезазначених гібридних послідовностей на експресію гена *apoA-1* людини *in vitro* стабільними трансформантами клітин CHO-K1 нами було сконструйовано декілька векторів. Для цього до послідовностей плазмід pTRapo, pTRapohCMVβ-actin та pTRapohCMV-intronA ввели ген *neo^R* (рис. 1), що дозволяє відбирати клітини, в яких присутній цей ген, на селективному середовищі, яке містить антибіотик генетицин (G418).

Конструювання векторів проводили через проміжну конструкцію pBluSKM-*neo^R*. Для отримання цієї плазмиди ген *neo^R* ампліфікували з плазмиди pTR-UF та клонували у векторі pBluSKM, який було гідролізовано рестриктазою *Ecl136II*. Для одержання цільових конструкцій послідовність гена *neo^R* клонувано з проміжної плазмиди pBluSKM-*neo^R* по сайту ендонуклеази рестрикції *MunI* у векторах pTRapo, pTRapohCMV-intronA та pTRapohCMVβ-actin, які було гідролізовано рестриктазою *EcoRI*.

Після двох тижнів селективного відбору клітин CHO-K1, які були трансфіковані окремо кожним з одержаних векторів експресії, отримано не менше як 100 клонів стабільних трансформантів для кожної конструкції.

Оскільки селекція клітин CHO-K1 після введення зазначених рекомбінантних плазмід проводилась лише за геном *neo^R*, важливого значення набуло встановлення наявності цільового гена в клітинах трансформантів. ПЛР методом з використанням праймерів, що специфічні до послідовності *apoA-1* людини, було визначено наявність цільового гена в пулі тотальної ДНК для кожної конструкції окремо за синтезом специфічного амплікона розміром 1182 п. н. (рис. 2). При проведенні згідно з [9] порівняння кількості продукту ПЛР, який було одержано в кожному окремому випадку, показано, що в різних пулах стабільних трансформантів наявна приблизно однакова кількість копій трансгена на клітину.

Наступним етапом роботи було дослідження стабільних трансформантів та порівняння рівня експресії трансгена під регуляцією різних регуляторних елементів. Для цього в чашки Петрі переносили по $1 \cdot 10^6$ клітин трансформантів, отриманих для кожної плазмидної

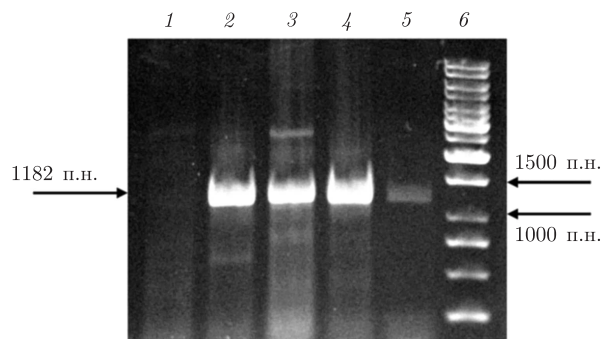


Рис. 2. ПЛР аналіз гена *apoA-1* людини в ДНК: 1 — нетрансформованих клітин CHO-K1; 2-4 — стабільних трансформантів, що були трансфіковані різними векторами експресії: 2 — pTRapo-neo^R, 3 — pTRapohCMV- β -actin-neo^R, 4 — pTRapohCMV-intronA-neo^R; 5 — плазмід з геном *apoA-1*; 6 — маркер молекулярної маси ДНК

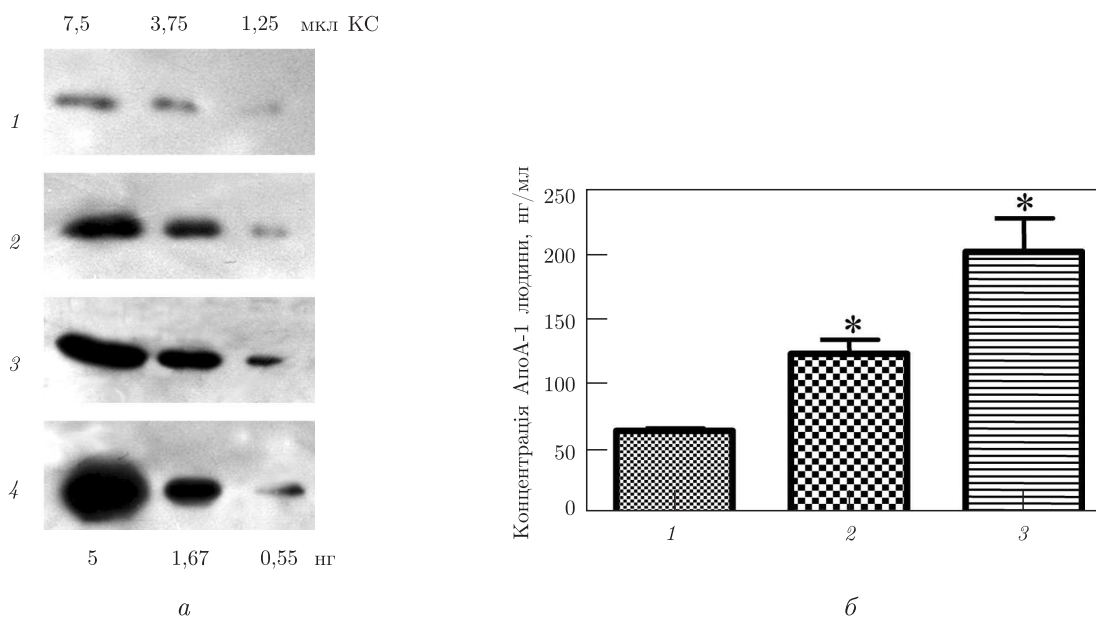


Рис. 3. Вестерн-блот (а) та ELISA (б) аналіз наявності білка АпоА-1 в культуральному середовищі (КС) стабільних трансформантів CHO-K1, що були трансфіковані різними векторами експресії: 1 — pTRapo-neo^R; 2 — pTRapohCMV β -actin-neo^R; 3 — pTRapohCMV-intronA-neo^R; 4 — стандарт молекулярної маси і концентрації АпоА-1 людини. * — $P < 0,05$

конструкції. Через добу середовище замінювали на безсироваткове (1,5 мл), а через дві доби відбирали для аналізу. Аналіз та порівняння рівня експресії трансгена під регуляцією різних регуляторних елементів проводили для пулів стабільних трансформантів (надалі стабільні трансформанти), для того щоб уникнути впливу “ефекту положення” на рівень синтезу трансгена та усереднити результат.

Оскільки білок *ApoA-1* людини секретується клітинами, його детекцію проводили безпосередньо в культуральному середовищі (КС). Методом ELISA показано, що концентрація *ApoA-1* людини в середовищі стабільних трансформантів, що були отримані трансфекцією pTRapo-neo^R, нижча за концентрацію *ApoA-1* у КС стабільних трансформантів для pTRapohCMV β -actin-neo^R та pTRapohCMV-intronA-neo^R векторів (рис. 3, б).

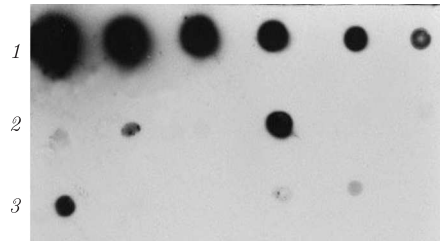


Рис. 4. Аналіз методом дот-блотингу в культуральному середовищі (КС) синтезу білка *ApoA-1* клітинами окремих клонів стабільних трансформантів СНО-К1, для конструкції рTRapo-neo^R: 1 — стандарт концентрації білка *ApoA-1* людини (20 нг, 10 нг, 5 нг, 2,5 нг, 1,25 нг, 0,625 нг); 2–3 — КС окремих клонів стабільних трансформантів (кількість нанесеного КС в кожному випадку — 5 мкл)

Кількісний аналіз вмісту білка АпоА-1 в КС проводили також методом вестерн-блотингу. Рівні експресії гена *apoA-1* людини, що були визначені нами для клітин, трансформованих рTRapo-neo^R, рTRapohCMV β -actin-neo^R та рTRapohCMV-intronA-neo^R, становили 156, 253 та 634 нг/мл відповідно (рис. 3, а). Результати вестерн-блот аналізу в цілому узгоджуються з результатами ELISA, наведеними вище, однак метод вестерн-блотингу при аналізі виявився більш чутливим.

Результати аналізу рівня синтезу АпоА-1 свідчать про те, що стабільні трансформанти клітин СНО-К1, які були отримані для рTRapohCMV β -actin-neo^R та рTRapohCMV-intronA-neo^R векторів експресії, забезпечують більш високий рівень синтезу трансгена — в 1,6 та 4 рази відповідно у порівнянні з отриманими для рTRapo-neo^R. Дані за рівнем синтезу АпоА-1 людини узгоджуються з результатами роботи [4] з іншими трансгенами, що знаходились під регуляцією вищезазначених регуляторних елементів. Крім того, наведені дані в цілому узгоджуються з результатами порівняння елементів регуляції транскрипції при транзиторному синтезі трансгенів у роботі [3] та результатами дослідження транзиторної експресії гена *apoA-1* людини клітинами СНО-К1 [5]. Таким чином, можна зробити висновок, що результати аналізу транзиторної експресії та аналізу експресії трансгена стабільними трансформантами в цілому узгоджуються.

Для дослідження особливостей експресії індивідуальними клонами гена *apoA-1* людини з пулу стабільних трансформантів СНО-К1 було виділено 45 клонів, які аналізували методом дот-блотингу (рис. 4). Результати аналізу виявили значну гетерогенність серед клонів за експресією цільового білка.

Таким чином, для пулів трансформантів, що були одержані трансфекцією клітин СНО-К1 векторами експресії рTRapohCMV-intronA-neo^R та рTRapohCMV β -actin-neo^R, показано більш високий рівень експресії трансгена, ніж для трансформантів з плазмідною рTRapo-neo^R. Одержані результати по вивченню експресії *apoA-1* свідчать про те, що введення до складу елементів регуляції транскрипції послідовностей інтронів (у випадку вектора рTRapohCMV-intronA-neo^R) сприяє підвищенню рівня експресії не лише тих трансгенів, які є кДНК копіями, а і повнорозмірних геномних варіантів генів.

1. Palmiter R. D., Sangren E. P., Avarbock M. R. et al. Heterologous introns can enhance expression of transgenes in mice // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1991. – **88**, No 2. – P. 478–482.
2. Chapman B. S., Thayer R. M., Vincent K. A. et al. Effect of intron A from human cytomegalovirus (Towne) immediate-early gene on heterologous expression in mammalian cells // Nucl. Acids Res. – 1991. – **19**, No 14. – P. 3979–3986.
3. Xu Z. L., Mizuguchi H., Ishii-Watabe A. et al. Optimization of transcriptional regulatory elements for constructing plasmid vectors // Gene. – 2001. – **272**, No 1–2. – P. 149–156.

4. Xia W., Bringmann P., McClary J. et al. High levels of protein expression using different mammalian CMV promoters in several cell lines // Protein Expr. Purif. – 2006. – **45**, No 1. – P. 115–124.
5. Гільчук Ю. М., Сухорада О. М., Рубан Т. А. та ін. Вивчення транзиторної експресії гена *apoA-1* людини під регуляцією різних гібридних послідовностей у клітинах CHO-K1 // Біополімери і клітина. – 2006. – **23**, № 3. – С. 210–216.
6. Топорова Е. К., Новикова С. Н., Лихачева Л. И. и др. Невирусная доставка гена *apoA-1* человека в клетки млекопитающих in vitro и in vivo // Биополимеры и клетка. – 2004. – **19**, № 1–2. – С. 25–32.
7. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual. – 2nd ed. – New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. – Vol. 1.
8. Makrides S. C. Components of Vectors for Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells // Protein Expr. Purif. – 1999. – **17**, No 2. – P. 183–202.
9. Молекулярная клиническая диагностика. Методы / Пер. с англ. под ред. С. Херрингтона, Дж. Макги. – Москва: Мир, 1999. – 558 с.

*Інститут молекулярної біології
і генетики НАН України, Київ*

Надійшло до редакції 18.08.2006