

- закономерности и контролирующие механизмы раннего эмбриогенеза млекопитающих в норме и патологии.— Л., 1985.— С. 108—113.
12. Секирина Г. Г. Техника культивирования доимплантационных зародышей мышей // Там же.— С. 114—123.
 13. Кабак Я. М. Практикум по эндокринологии. Основные методики экспериментально-эндокринологических исследований.— М.: Изд-во Моск. ун-та, 1968.— С. 146.
 14. Hammer R. E., Palmiter R. D., Brinster R. L. Partial correction of murine hereditary growth disorder by germ-line incorporation of a new gene // Nature.— 1984.— 311.— P. 65—67.
 15. Стимуляция и торможение роста мышей, несущих ген гормона роста человека / С. И. Городецкий, А. П. Дыбан, Б. Л. Вайсман и др. // Бюл. эксперим. биологии и медицины.— 1986.— 102, № 9.— С. 339—342.

НИИ эксперим. медицины АМН СССР, Ленинград

Получено 13.06.89

УДК 616—056.7:616.153.922

Н. Б. Должанская, М. Ю. Манделъштам, Е. Л. Паткин, А. С. Кузнецов,
Ф. Л. Виханская, Р. И. Крутилина, В. С. Гайцхоки

МОДЕЛИРОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ СЕМЕЙНОЙ ГИПЕРХОЛЕСТЕРИНЕМИИ

Исследовали экспрессию рецептора липопротеинов низкой плотности (рЛНП) человека в клетках линии L929 (фибробласты мыши), трансформированных рекомбинантной плазмидой rMSVL. Эта плазида включает полноразмерную кДНК рЛНП и гибридный промотор, состоящий из регуляторных последовательностей промотора ринних генов SV40 и энхансера вируса саркомы Молони, чувствительного к глюкокортикоидным гормонам. Методами dot-, блот-гибридизации РНК—кДНК и иммунофлуоресцентного анализа показано, что в трансформированных L-клетках происходит синтез рЛНП человека.

Введение. Семейная гиперхолестеринемия (СГ) — аутомно-доминантное заболевание человека, в основе которого лежит широкий спектр мутаций гена рЛНП [1]. Нарушение функции рЛНП приводит к нарушению катаболизма циркулирующих атерогенных ЛНП и возникновению в сосудистой стенке множественных отложений холестерина. Зревший рЛНП представляет собой гликопротеид, включающий 839 аминокислотных остатков [2], его мРНК имеет размер около 5,3 тысяч пар нуклеотидов (т. п. н.). В работах Рассела и др. [2] была проклонирована полноразмерная кДНК рЛНП, содержащая 5,1 т. п. н., что предопределило возможность ее использования для создания экспериментальных моделей генетической коррекции СГ. Наиболее значительные успехи в решении этой проблемы в последнее время были достигнуты при конструировании регриврусных векторов, вызывающих эффективную экспрессию рЛНП в фибробластах и гепатоцитах рЛНП-дефицитных кроликов Ватанабэ [3, 4].

Одной из возможных моделей генной терапии СГ может быть создание и экспрессия в клеточных культурах таких генноинженерных конструкций, которые синтезируют рЛНП независимо от концентрации холестерина в клетке, среде или кровотоке и активируются ионами металлов, гормонами либо другими физиологическими факторами.

Стратегия генной терапии в настоящее время в подавляющем большинстве случаев определяется получением стабильных клеточных клонов, экспрессирующих нормальный прототип мутантного белка, и пересадкой их в организм-мишень. В этом смысле преимущество имеют клетки костного мозга и фибробласты [5], методы трансплантации которых освоены достаточно хорошо.

Нами была предпринята попытка разработки клеточной модели генетической коррекции СГ с помощью генноинженерных конструкций, специфически экспрессирующих функционально активный рЛНП в фибробластах млекопитающих.

Материалы и методы. Выделение, клонирование и гибридизационный анализ рекомбинантной ДНК проводили согласно методам, описанным в монографии [6]. L-клетки культивировали в среде DMEM с 10 % эмбриональной сывороткой крови теленка. Трансформацию кальций-преципитатом осуществляли по методу [7]. Временную экспрессию анализировали через 48 ч после трансформации. РНК из культивируемых клеток очищали согласно рекомендациям [8]. Электрофорез РНК вели с глицералем по [6]. Дот- и блот-гибридизацию РНК с клонированными кДНК-зондами на ген рЛНП человека проводили после щелочной фиксации на Zeta-Probe мембранах («Bio-Rad», США). Фильтры гибридизовали с 32 P-пробами при 37 °С в течение 16 ч в 50 %-ном растворе формамида, 3×SSPE (1×SSPE — 0,18 М NaCl, 0,01 М Na-фосфат, pH 7,7, 0,001 М ЭДТА), 1 %-ном DS-Na, 10 %-ном декстран-сульфате, 0,5 мг/мл денатурированной ДНК сармы лосося. Затем их отмывали при многократных сменах раствора 0,5×SSPE, 1 %-ного DS-Na (55 °С). В качестве проб использовали 32 P-фрагменты рЛНП-кДНК, меченные в реакции с фрагментом Клепова ДНК-полимеразы I с множественной загрузкой [9]. Удельная радиоактивность ДНК превышала 10⁸ расц./мин. Автордиографию проводили в течение 2—3 сут при —70 °С с усиливающим экраном; иммунофлуоресцентный анализ — с использованием поликлональных моноспецифических анти-апоВ IgG, полученных иммунизацией кроликов ЛНП человека, последующей их очисткой на ЛНП-сефарозе и меченных флуоресценцинопропионатом. Клетки за 24 ч до трансформации рассеивали на покровные стекла 24×24 мм при плотности 10⁵. Для анализа иммунофлуоресценции ЛНП-рецепторы живых клеток связывали с ЛНП в конечной концентрации 20 мкг/мл в течение 60 мин при 4 °С с последующей отмывкой клеток от избытка несвязавшихся ЛНП раствором (фосфатно-солевого буфера (ФСБ), pH 7,2, с 1 %-ным бычьим сывороточным альбумином (БСА)). Затем клетки фиксировали 4 %-ным раствором формальдегида, отмывали от фиксатора в нескольких сменах ФСБ в течение 2 ч и инкубировали с анти-апоВ IgG (200 мкг/мл) при 37 °С в течение 1 ч с последующей отмывкой несвязавшихся антител раствором ФСБ с 1 %- БСА в течение 30 мин (в трех сменах). Параллельно с опытом осуществляли контроль трансформации (клетки обрабатывали кальций-преципитатом без ДНК); контроль неспецифического связывания антител (отсутствовала обработка клеток ЛНП); контроль синтеза эндогенного рецептора (клетки, не подвергшиеся трансформации, инкубировали с антителами). Полученные препараты заключали в глицерин с 5 %-ным пропилгаллатом. Для наблюдения и фотографирования использовали микроскоп ЛЮММ И2. Интенсивность люминесценции отдельных клеток измеряли с помощью микрофлуориметра МЛ-4 [10, 11].

Результаты и обсуждение. Конструирование плазмидного вектора. На рис. 1 представлена структура генетической конструкции, использованная нами в экспериментах по трансформации и обозначенная как *pMSVL*. При получении данной конструкции мы изолировали *HindIII*-фрагмент (1,2 т. п. н.) плазмиды *pMSV cat*, содержащий гибридный промотор *SV40* и фрагмент *LTR* вируса саркомы

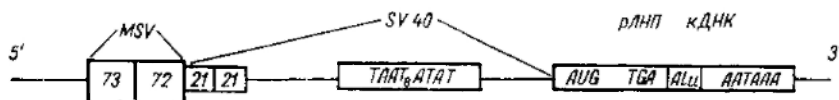


Рис. 1. Структура генетической конструкции *pMSVL*
Fig. 1. The structure of genetic *pMSVL* construct

Молони, включающий два 72-нуклеотидных tandemно расположенных повтора, играющих роль энхансера и активируемых глюкокортикоидными гормонами, в частности, дексаметазоном. Этот *HindIII*-фрагмент клонировали в уникальный *HindIII*-сайт плазмиды *pLDLR-3*, содержащий полноразмерную копию кДНК рЛНП.

Дот-гибридизация РНК трансформированных клеток (рис. 2) демонстрирует наличие в трансформированных клетках мРНК рЛНП человека при гибридизации с 3'-концевым фрагментом кДНК рЛНП человека (1,9 т. п. н.), содержащим последовательности экзонов 10—18 гена рЛНП. Наблюдается отсутствие мРНК рЛНП человека в не-

трансформированных контрольных клетках. Можно предположить, что этот фрагмент не содержит участков гомологии между генами рЛНП мыши и человека. Некоторые отличия в содержании мРНК рЛНП человека в разных опытах тем не менее значительно выше фоновой радиоактивности в контроле.

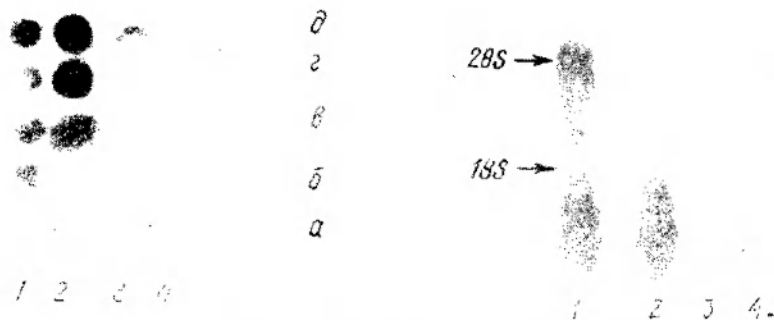


Рис. 2. Дот-гибридизация РНК трансформированных и контрольных клеток. РНК наносили в количестве 0,5 (а), 1 (б), 2 (в), 5 (г), 10 мкг (д). Источники РНК: 1, 2 — трансформированные клетки; 3 — контроль трансформации; 4 — контроль синтеза эндогенного рецептора

Fig. 2. Dot hybridization of RNA from transformed and control cells. The amount of RNA applied: 0.5 μ g (a), 1 μ g (б), 2 μ g (в), 5 μ g (г) and 10 μ g (д). Sources of RNA: 1, 2 — transformed cells, 3 — control for transformation, 4 — control for endogenous synthesis of LDL receptor

Рис. 3. Блот-гибридизация РНК трансформированных и контрольных клеток. РНК наносили в количестве 10 мкг. Источники РНК: 1, 2 — трансформированные клетки; 3 — контроль трансформации; 4 — контроль синтеза эндогенного рецептора

Fig. 3. Blot hybridization of RNA from transformed and control cells. 10 μ g of RNA was applied to each lane. Sources of RNA: 1, 2 — transformed cells, 3 — control for transformation, 4 — control for endogenous synthesis of LDL receptor

Блот-гибридизация РНК трансформированных клеток (рис. 3) также обнаруживает сигнал, отсутствующий в контролях трансформации и синтеза эндогенного рецептора, однако на фоне выраженной

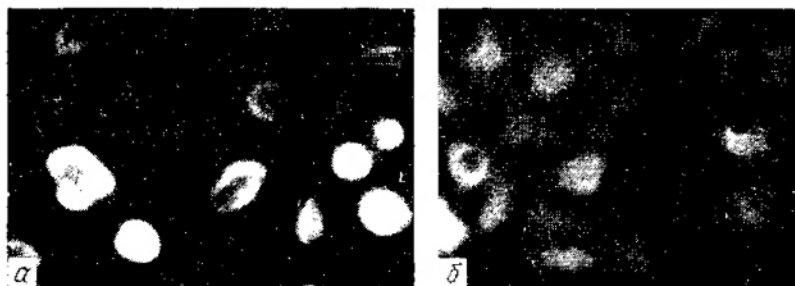


Рис. 4. Иммунофлуоресцентный анализ клеток: а — трансформированные клетки; б — контроль трансформации

Fig. 4. Immunofluorescent analysis of cells: а — transformed cells, б — control of transformation

деградации мРНК рЛНП человека. Гибридизацию проводили с фрагментом кДНК рЛНП человека (1,1 т. п. н.), содержащим последовательности экзонов 1—8 гена рЛНП. Основная зона недеградированной мРНК рЛНП характеризуется размером 5,3 т. п. н. Таким образом, в трансформированных фибробластах мышей вероятно экспрессия рЛНП человека. Данные, полученные с помощью иммунофлуоресцентного анализа, просчитаны по критерию Стьюдента — Фишера. Мы по-

лучили статистически достоверное ($p < 0,01$) возрастание интенсивности люминесценции после трансформации клеток. Это даст возможность предположить, что в трансформированных клетках синтезируется функционально активный рЛНП человека. Соответствующие величины (условные единицы): в опыте $\bar{X} = 14,13 \pm 1,04$; при контроле трансформации $\bar{X} = 10,41 \pm 0,42$; при контроле синтеза эндогенного рецептора $\bar{X} = 9,52 \pm 0,53$.

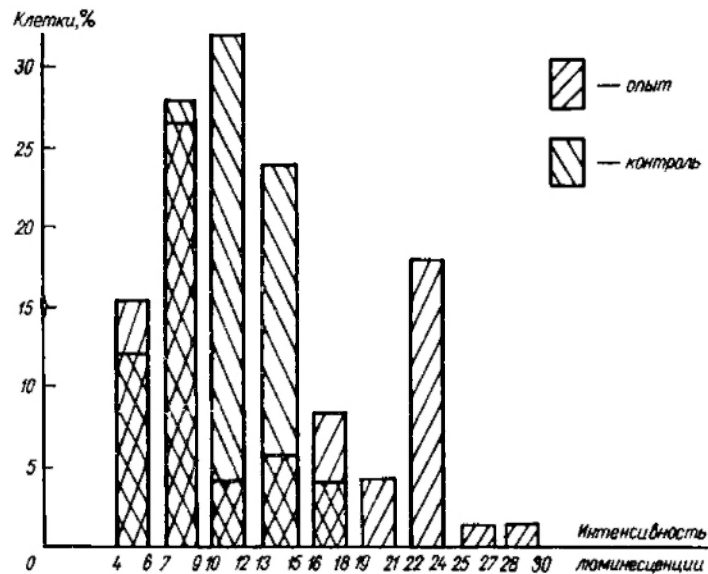


Рис. 5. Гистограмма распределения клеток по интенсивности иммунофлюоресценции
Fig. 5. Distribution of cells according to intensity of immunofluorescence

На рис. 4, а, видно наличие интенсивно флюоресцирующих клеток, подвергшихся трансформации, и отсутствие таковых в контроле трансформации (рис. 4, б). Распределение интенсивности люминесценции отдельных клеток в опыте и контроле трансформации представлено на рис. 5. Приводимая гистограмма отражает факт наличия в опыте по трансформации гетерогенной популяции клеток, характеризующейся присутствием групп клеток с четко различающимися уровнями интенсивности люминесценции. Контроль трансформации, напротив, представлен клетками с одинаковым низким фоновым уровнем интенсивности люминесценции. Количественные оценки экспрессии рЛНП человека и получение стабильного клона могут быть основными критериями адекватности предложенной нами модели генетической коррекции СГ.

A MODEL FOR GENETIC CORRECTION OF FAMILY HYPERCHOLESTEROLEMIA

*N. B. Dozhanskaya, M. Yu. Mandzishiam, E. L. Patkin, A. S. Kuznetsov,
F. L. Vikhanskaya, R. I. Krutilina, V. S. Gaitskhoki*

Research Institute for Experimental Medicine,
Academy of Medical Sciences of the USSR,
Institute of Cytology,
Academy of Sciences of the USSR, Leningrad

Summary

The expression of human low-density lipoprotein receptor (rLDL) was studied in mouse fibroblasts (1-929 line) transformed by the *pMSVL* recombinant plasmid. This plasmid contains full-length rLDL cDNA and hybrid promoter composed of regulatory elements

from early SV40 promoter and glucocorticoid-responsive enhancer of Molony sarcoma virus. The expression of rLDL c DNA in transformed cells was demonstrated using dot and blot RNA-cDNA hybridization as well as immunofluorescent analysis.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Goldstein J. L., Brown M. S. Familial hypercholesterolemia // The metabolic basis of inherited disease / Eds J. B. Stanbury et al.—New York: McGraw-Hill, 1978.— P. 672—712.
2. The human LDL receptor: a cysteine-rich protein with multiple *Alu* sequences in its mRNA / T. Yamamoto, C. G. Davis, M. S. Brown et al. // Cell.—1984.—39, N 1.— P. 27—38.
3. Efficient expression of retroviral vector-transduced human low density lipoprotein (LDL) receptor in LDL receptor-deficient rabbit fibroblasts *in vitro* // A. Miyahara, M. F. Sharkey, J. L. Witztum et al. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1988.—85, N 17.— P. 6538—6542.
4. Correction of the genetic defect in hepatocytes from the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit / J. M. Wilson, D. E. Johnson, D. M. Jeffersen, R. C. Mulligan // Ibid.— N 12.— P. 4421—4425.
5. Implantation of genetically engineered fibroblasts into mice: implications for gene therapy / R. F. Selden, M. J. Skoskiwicz, K. B. Howie et al. // Science.—1987.—236, N 4802.— P. 714—718.
6. Маниатис Г., Фритц Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование.— М.: Мир, 1984.— 420 с.
7. Graham R., Van der Eb A. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA // Virology.—1973.—52, N 2.— P. 456—467.
8. Gough N. M. Rapid and quantitative preparation of cytoplasmic RNA from small numbers of cells // Anal. Biochem.—1988.—173, N 1.— P. 93—95.
9. Feinberg A. P., Vogelstein B. A. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity // Ibid.—1983.—132, N 1.— P. 6—13.
10. Depletion of intracellular potassium arrests coated pit formation and receptor-mediated endocytosis in fibroblasts / J. M. Larkin, M. S. Brown, J. L. Goldstein, R. G. W. Anderson // Cell.—1983.—33, N 1.— P. 273—285.
11. Anderson R. G. W. Methods for visualisation of the LDL pathway in cultured human fibroblasts // Meth. Enzymol.—1986.—129.— P. 201—216.

НИИ эксперим. медицины АМН СССР, Ленинград
Ин-т цитологии АН СССР, Ленинград

Получено 13.06.89

УДК 577.213.3

М. И. Николенко, С. Б. Арбузова

ПОДБОР ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ ПРОВЕДЕНИЯ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ СИНТЕЗА ДНК ПРИ ИДЕНТИФИКАЦИИ МУТАЦИЙ В 12-м ЭКЗОНЕ ГЕНА ФЕНИЛАЛАНИНГИДРОКСИЛАЗЫ ЧЕЛОВЕКА

Описаны условия проведения реакции амплификации ДНК для определения мутаций в 12-м экзоне гена фенилаланингидроксилазы (ФАГид). Указано на необходимость оптимизации условий реакции. Подчеркивается последовательность составления реакционной смеси, при этом праймеры, фермент и трифосфаты следует добавлять после денатурации ДНК. ДНК можно выделять не только из цельной крови больных фенилкетонурией (ФКУ), но и из сухих пятен крови на фильтровальной бумаге. В результате амплификации образуется фрагмент гена ФАГид длиной 245 пар оснований (п. о.), несущий мутации. Последующая дот-гибридизация с мутантными мечеными зондами позволяет определить гетерозиготное носительство у здоровых членов семей.

Введение. В настоящее время в изучении молекулярных основ генетики человека происходят значительные изменения. Во многом это связано с созданием метода специфической амплификации ДНК (полимеразная цепная реакция) [1], позволяющего диагностировать ряд наследственных заболеваний человека за один день. Использование двух синтетических олигонуклеотидных праймеров, комплементарных последовательностям, фланкирующим специфический сайт мутации, дает воз-