



УДК 577.21

В. Н. Шульженко, Л. Л. Лукаш,
Л. Н. Шуляк, Е. В. Усенко, В. А. Кордюм

КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНА АпоА1 ЧЕЛОВЕКА И ЕГО ЭКСПРЕССИЯ В ФИБРОБЛАСТАХ МЫШИ

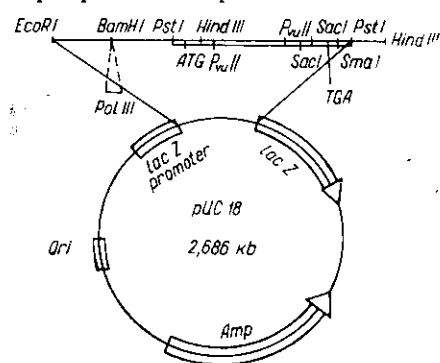
Клонирован ген АпоА1 человека и получена его экспрессия в культуре мышечных фибробластов линии LTK⁻.

Белковый продукт гена АпоА1 человека является основным во фракции липопротеинов высокой плотности. Данные литературы свидетельствуют о том, что с нарушением баланса липопротеинов высокой и низкой плотности коррелирует развитие атеросклероза человека [1, 2]. В этой связи клонирование гена АпоА1 человека представляет значительный интерес как в плане изучения молекулярных механизмов возникновения атеросклероза, так и в плане возможного практического его использования для целей генной терапии.

Мы провели скрининг 300 000 рекомбинантных фагов библиотеки генов человека зондом к гену АпоА1 [3]. В качестве зонда использовали химически синтезированный 40-членный олигонуклеотид, комплементарный фрагменту структурной части гена АпоА1 человека [4]. *Pst*I-фрагмент ДНК рекомбинантного фага, дающий положительный сигнал при блот-гибридизации с используемым зондом, был субклонирован в составе плазмиды *pUC18*. Картирование при использовании рестрикционных эндонуклеаз *Hind*III, *Pvu*II, *Sac*I, *Xho*I, *Tag*I показало идентичность длины полученных рестрикционных фрагментов с таковыми гена АпоА1 человека [4].

Рестрикционная карта плазмиды

Рис. 1. Рестрикционная карта плазмиды *pUC18*-Апо
Fig. 1. Restriction map of plasmid *pUC18*-Апо



ды *pUC18*-Апо приведена на рис. 1. Частичное определение первичной структуры клонированного фрагмента ДНК подтвердило ее идентичность с таковой для гена АпоА1 человека, фланкирующей 5'-конец как со стороны структурной части, так и со стороны 5'-нетранслируемой области гена.

Для изучения экспрессии клонированного гена были использованы три различные молекулярные конструкции: плазмиды *pUC18*-Апо и *pUC18*-Апо', содержащие ген АпоА1 человека под собственным промотором с различной ориентацией клонированного гена АпоА1, а также плазмида *paL1*-Апо, которая отличается от плазмиды *pUC18*-Апо нали-

чием клонированного по *BamHI*-сайту полилинкера промотора РНК-полимеразы III.

Трансфекцию мышинных фибробластов линии *LTK*⁻ проводили Сафосфатным методом [5] из расчета 20 мкг плазмидной ДНК на флакон клеток объемом 50 мл. Затем клетки отмывали и заливали средой без сыворотки. Через сутки (1-е сут) эту среду полностью сливали и замораживали, а клетки заливали свежей. Через двое суток (2—3-е сут) процедуру повторяли. Следующими точками были 6-е сут (3—6-е

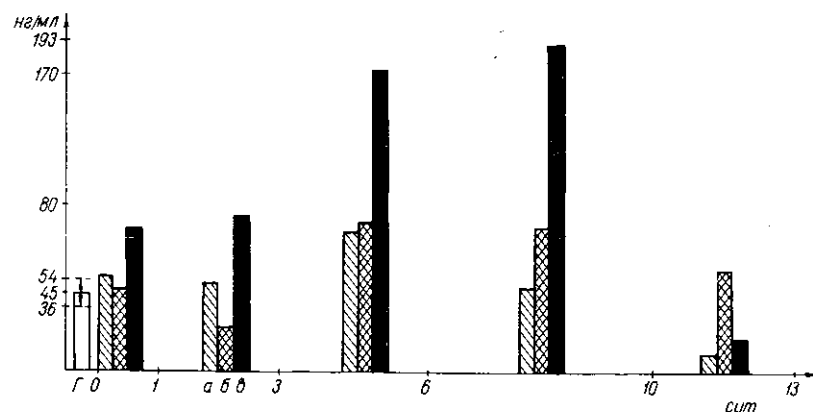


Рис. 2. Динамика секреции АпоА1 человека в культуральную среду после трансфекции мышинных фибробластов различными плазмидами: а — *pUC18*-Апо'; б — *pUC18*-Апо; в — *paL1*-Апо; з — контроль

Fig. 2. Dynamics of the human ApoA1 gene secretion into the culture liquid after transfection of murine fibroblasts with various plasmids: а — *pUC18*-Apo; б — *pUC18*-Apo; в — *paL1*-Apo; з — control

сут), 10-е сут (6—10-е сут) и 13-е сут (10—13-е сут). После этого одновременно проводили иммуноферментное тестирование АпоА1 в культуральной среде и в клеточных лизатах, используя конъюгаты на основе пероксидазы хрена.

В клеточных лизатах белок не был обнаружен. Данные иммуноферментного определения АпоА1 в культуральной среде представлены на рис. 2. Максимальная секреция белка в культуральную среду наблюдалась на 3—10-е сут после введения плазмидных ДНК. Добавление в культуральную среду липидов (яичный лецитин : холестерин : дицетилфосфат в соотношении 7 : 2 : 1) не приводило к увеличению секреции АпоА1. Во всех случаях в течение 10 дней наблюдений превышение количества тестируемого белка над уровнем контроля (клетки без введения плазмидной ДНК) наблюдали после трансфекции *paL1*-Апо.

Поскольку калибровочная кривая на основе известных концентраций АпоА1 позволяет достоверно определить 10 нг белка в 1 мл культуральной среды, то количество тестируемого АпоА1 человека после трансфекции *pUC18*-Апо и *pUC18*-Апо' сопоставимо с чувствительностью метода. По-видимому, собственный промотор гена АпоА1 человека (7-членный АТ-богатый участок в положении —264 —258) [2], по крайней мере для системы клеток *LTK*⁻, является слабым. Однако в том случае, когда ген АпоА1 находится под контролем промотора РНК-полимеразы III человека, общее количество тестируемого белка превышало фон в 2,5 раза, что в абсолютных величинах более чем на порядок выше чувствительности метода.

Таким образом, нами показана экспрессия клонированного гена АпоА1 человека в культуре мышинных фибробластов линии *LTK*⁻. Белок тестировался в культуральной среде и не тестировался в клетках. Добавление липидов в культуральную среду не приводило к увеличению секреции белка трансфицированными клетками. Строение молекулярной конструкции, содержащий ген АпоА1 человека, влияет на уровень экспрессии гена.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Apolipoproteins* and cardiovascular risk: genetics and epidemiology / Ch. F. Sina, E. Boerwinkle, P. P. Moll, J. Davignon // *Ann. Biol. Clin.*—1985.—43.— P. 411—417.
2. *Breslow J. L.* Human apolipoprotein molecular biology and genetics variation // *Ann. Rev. Biochem.*—1985.—54.— P. 699—727.
3. *Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж.* Молекулярное клонирование.— М. : Мир, 1984.— 480 с.
4. *Karatanasis S. K., Zannis V. I., Breslow J. L.* Isolation and characterization of the human apolipoprotein A-1 gene // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1983.—80, N 20.— P. 6147—6151.
5. *Гловер Д.* Клонирование ДНК.— М. : Мир, 1988.—538 с.

Ин-т молекуляр. биологии и генетики
АН УССР, Киев
Харьк. НИИ терапии МЗ УССР

Получено 10.03.89

CLONING OF HUMAN ApoA1 GENE AND ITS EXPRESSION IN MURINE FIBROBLASTS

V. N. Shulzhenko, L. L. Lukash, L. N. Shulyak, E. V. Usenko, V. A. Kordyum
Institute of Molecular Biology and Genetics,
Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev
Research Institute of Therapy, Ministry of Public Health
of the Ukrainian SSR, Kharkov

Summary

The human ApoA1 gene has been cloned and its expression has been obtained in the culture of murine fibroblasts of the LTK⁻ line.