

Рекомбинантная ДНК *pGins*, содержащая экспрессирующий ген препроинсулина человека, не проявляет мутагенной активности

Л. Л. Лукаш, С. В. Подольская, А. А. Евсеенко, Е. М. Сухорада,
Л. Н. Неборачко, И. С. Варзанова, Т. П. Кочубей

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 252143, Украина

В отличие от мутагенных рекомбинантных плазмид pBR322ins и pAins ДНК pGins в концентрации 10 мкг/мл не вызывает повышения частоты генных мутаций и хромосомных aberrаций в соматических клетках млекопитающих. Отсутствие мутагенного эффекта pGins подтверждено в различных тест-системах in vitro и in vivo и, по-видимому, обусловлено усилением экспрессии и функций гена препроинсулина под влиянием вирусных регуляторных элементов. Показано, что предварительная обработка культивируемых клеток млекопитающих препаратом инсулина защищает их от мутагенного действия рекомбинантной плазмиды pHB320, которая содержит геном вируса гепатита В. Предполагается участие экспрессирующего гена препроинсулина в поддержании уровня генетической стабильности или изменчивости клеточных популяций.

Введение. Для создания технологии генной терапии инсулинзависимого сахарного диабета принципиальным моментом является конструирование безопасных в генетическом отношении рекомбинантных молекул [1], что стимулировало исследования мутагенной активности рекомбинантных ДНК.

Ранее нами было показано, что в фибробластах млекопитающих различного происхождения экспрессия экзогенного гена препроинсулина под собственным промотором, но без регуляторного элемента, обеспечивающего выражение этого гена в специализированных клетках, носит конститутивный характер [2–5].

При введении в культивируемые клетки грызунов рекомбинантных плазмид *pBR322ins* и *pAins*, содержащих геномный ген препроинсулина человека с делетированным участком регуляторной области, наблюдалось повышение частоты генных и хромосомных мутаций [3–6]. Мутагенный эффект мог быть связан с экспрессией в клетках как измененного гена препроинсулина (делеция части

регуляторной области), так и векторной молекулы, введенных при трансфекции.

Мы предположили, что замена недостающего участка регуляторной зоны гена препроинсулина регуляторными элементами вируса могла бы привести к усилению экспрессии этого гена при введении в исследуемые клетки млекопитающих. Для проверки этого предположения была сконструирована рекомбинантная плаزمида *pGins*, в структуре которой ген препроинсулина находился под влиянием регуляторных элементов вируса гепатита В [7, 8]. В предварительных экспериментах показано, что продукция инсулиноподобных белков в культуральную среду после трансфекции клеток млекопитающих плазмидой *pGins* была существенно выше по сравнению с *pBR322ins* [9].

Цель данной работы состояла в дальнейшем изучении роли экспрессирующего гена препроинсулина, а также белка инсулина в изменении уровня мутагенеза в соматических клетках млекопитающих. Проводили сравнительное исследование мутагенной активности: 1) гена препроинсулина без регуляторного участка, ответственного за тканеспецифичность экспрессии (*BglII-TaqI*-фрагмент); 2) векторной плазмиды *pHB320*, содержащей геном

© Л. Л. ЛУКАШ, С. В. ПОДОЛЬСКАЯ, А. А. ЕВСЕЕНКО,
Е. М. СУХОРАДА, Л. Н. НЕБОРАЧКО, И. С. ВАРЗАНОВА,
Т. П. КОЧУБЕЙ, 1999

вируса гепатита В; 3) рекомбинантной плазмиды *pGins* и 4) препарата инсулина.

Материалы и методы. Выделение плазмидных ДНК, рестрикцию и элюирование фрагментов ДНК из агарозного геля проводили стандартными методами [10]. В экспериментах по мутагенезу использовали плазмиды *pHB320*, *pGins*, в отдельных опытах — *pAins* и *pBR322ins*, а также *BglII-TaqI*-фрагмент ДНК, содержащий ген препроинсулина человека, и медицинский препарат инсулина свиньи.

В качестве модельной системы *in vitro* служили клетки китайского хомячка B10d-ii-FAF28CL237. Клетки культивировали в стандартной среде Игла с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота, глюкозы и антибиотиков. Экзогенные ДНК в концентрации 10 мкг/мл вводили в клетки кальций-фосфатным методом [11]. Эксперименты по мутагенезу описаны нами ранее [12]. Метафазные пластинки для цитогенетического анализа фиксировали через 24 ч с помощью стандартной методики [13]. Для селекции мутантов использовали среду с 6-меркаптопурином (6-МП) фирмы «Koch-Light Lab» в концентрации 60 мкг/мл.

В экспериментах *in vivo* использовали крыс линии Wistar. В организм животных ДНК вводили в составе липосом. Инъекции взвеси липосом в физрастворе с заключенной в них ДНК (75 мкг в 0,2 мл раствора на особь) осуществляли в печень опытных животных в условиях хирургической операции [8]. В качестве негативного контроля использовали здоровых интактных животных и животных, которым вводили физиологический раствор в печень. Позитивным контролем служила плазида *pAins*, обладающая высокой мутагенной активностью [3, 5, 6]. Для изучения мутагенного действия вводимых препаратов были отобраны те животные, у которых после введения плазмид наблюдалось падение уровня глюкозы в крови [8]. Метафазные пластинки клеток костного мозга готовили по общепринятой методике Мак Грегора и Барли [14], а лимфоцитов — по методу Монахова [15] с использованием ФГА фирмы «Wellcome» (США).

Присутствие плазмидной ДНК в клетках контролировали с помощью полимеразной цепной реакции. Экзогенная ДНК, содержащая ген препроинсулина, присутствовала в трансфицированных клетках в течение длительного периода времени [16].

Статистическую обработку результатов проводили с помощью критериев Фишера и Стьюдента [17].

Результаты и обсуждение. Результаты экспе-

риментов по изучению мутагенной активности векторной плазмиды *pHB320* и линейного фрагмента ДНК, содержащего усеченный ген препроинсулина человека, которые использовали для конструирования *pGins*, представлены в табл. 1.

Частота мутантных колоний в независимых контрольных вариантах была различной, как обычно и бывает в индивидуальных клеточных культурах, где в разное время возникают мутантные варианты спонтанного происхождения и существуют некоторые различия в условиях для проявления мутантов [18]. Частоты мутантов, резистентных к 6-МП, в контрольных и опытных вариантах сравнивали через 3; 9 и в ряде случаев — 24 сут. после трансфекции клеток. При выборе времени для съема информации учитывали особенности модельного локуса, на котором изучали генные мутации (для проявления рецессивных мутаций требуются два клеточных деления), и данные по анализу влияния экзогенных ДНК на мутагенез в культурах соматических клеток млекопитающих, полученные ранее [3—6, 19—23]. Следует отметить также, что мутанты, резистентные к 6-МП, обладают пониженной жизнеспособностью по сравнению с клетками дикого типа и поэтому быстро элиминируют из популяции в отсутствие селективных условий.

Как плазида *pHB320*, так и линейный фрагмент генома человека при концентрации ДНК 10 мкг/мл вызывали статистически достоверное повышение частоты мутантов, резистентных к 6-МП, при введении в культивируемые клетки китайского хомячка. Мутагенный эффект выявлялся через 3 сут после трансфекции, а на 9-е сут частота мутантов в опытных вариантах существенно не отличалась от контрольного уровня (табл. 1). На 24-е сут после трансфекции также не было обнаружено статистически достоверной разницы между опытными и контрольным вариантами (данные в таблице не представлены).

В случае линейного фрагмента ДНК, содержащего усеченный ген препроинсулина, кратность превышения контрольного уровня составляла 1,68 и 1,49. Эти данные в сочетании с ранее полученными результатами по рекомбинантным плаздам, содержащим исследуемый фрагмент ДНК [3—6], указывают на то, что ген препроинсулина человека с делецией участка регуляторной области, действительно, обладает слабой мутагенной активностью в соматических клетках млекопитающих. По сравнению с линейными фрагментами вирусных ДНК [19, 20] для индукции мутаций под влиянием экзогенного гена препроинсулина требуется в 10 раз большая концентрация ДНК (10 мкг/мл).

Таблица 1

Частота мутантов по локусу *hprt*, индуцированных геном препроинсулина человека и плазмидой *pHB320*, используемых для конструирования *pGins*

Вариант	Время после трансфекции, сут.	Выборка клеток, 10^3	Эффективность клонирования	Количество мутантных клонов	Частота мутантов $\cdot 10^{-5}$	Частота мутантов за вычетом контроля $\cdot 10^{-5}$	Отношение опыт/контроль	p
Контроль	—	500	0,72	17	4,72	—	—	—
Ген препроинсулина	3	1000	0,53	21	7,92	2,92	1,68	< 0,05
Контроль	—	500	0,71	30	4,22	—	—	—
Ген препроинсулина	9	500	0,46	10	4,35	0,13	1,03	< 0,05
Контроль	—	500	0,26	11	8,46	—	—	—
Ген препроинсулина	3	500	0,19	12	12,63	4,17	1,49	< 0,05
Контроль	—	500	0,28	9	6,43	—	—	—
Ген препроинсулина	9	500	0,60	22	7,33	0,90	1,14	< 0,05
Контроль	—	1000	0,42	34	8,10	—	—	—
<i>pHB320</i>	3	700	0,24	30	17,86	9,76	2,20	< 0,001
Контроль	—	450	0,51	2	0,86	—	—	—
<i>pHB320</i>	3	500	0,29	7	4,83	3,97	5,62	< 0,001
Контроль	—	500	0,40	2	1,00	—	—	—
<i>pHB320</i>	3	500	0,26	4	3,08	2,08	3,08	< 0,05

Примечание. Концентрация ДНК 10 мкг/мл. Статистическая обработка с помощью критерия Фишера.

Мутагенный эффект плазмиды *pHB320* сопоставим с таковым *pBR322* при одинаковых условиях проведения эксперимента: концентрация ДНК 10 мкг/мл, время экспрессии мутаций 3 сут [3—6]. Как видно из табл. 1, кратность превышения контрольного уровня мутантов в случае плазмиды *pHB320* составляла 2,20; 5,62 и 3,08. Различия между опытными и контрольными вариантами были статистически достоверны, в двух случаях — по третьему порогу вероятности ($p < 0,001$).

Итак, определенный вклад в индуцированный мутагенный эффект исследованных нами ранее рекомбинантных плазмид *pBR322ins* и *pAins* [3—6] мог вносить продукт исследуемого гена препроинсулина. Возможно, делеция в регуляторной области гена препроинсулина приводит к снижению экспрессии и ошибкам декодирования [27], в результате чего в клетках появляется мутагенный продукт. Это положение подтверждается данными, показавшими, что при введении в клетки плазмиды

pBR322insN, в составе которой ген препроинсулина инактивирован инсерцией четырех нуклеотидов в область инициации трансляции, происходит снижение частоты индуцированных хромосомных и генных мутаций [4, 6].

Кроме того, мутагенная активность рекомбинантных плазмид, сконструированных на основе стандартного вектора *pBR322*, могла быть обусловлена присутствием так называемой «токсической» нуклеотидной последовательности [24, 25]. В случае рекомбинантной плазмиды *pBR322ins* нельзя исключить возможного взаимодействия «токсической» плазмидной последовательности и измененного гена препроинсулина с образованием чужеродных для клетки комплексных продуктов, проявляющих мутагенную активность. Что касается рекомбинантной плазмиды *pAins*, то ее мутагенный эффект мог определяться взаимодействием гена препроинсулина с делецией в регуляторной зоне и *Alu*-повтора из генома человека [3, 5].

Мутагенный эффект всех изученных экзогенных ДНК (рекомбинантные плазмиды *pBR322ins*, *pAins* и *pHB320*, усеченный ген препроинсулина человека) зарегистрирован через 3 сут после трансфекции клеток и был, вероятно, обусловлен транзитной экспрессией чужеродных нуклеотидных последовательностей и появлением во внутриклеточной среде соответствующих продуктов: РНК и/или белка. Предварительная инактивация экзогенной ДНК-матрицы диметилсульфатом перед трансфекцией клеток приводила к снижению частоты индуцированных мутантов до контрольного уровня [2, 3]. Также наблюдалось значительное снижение мутагенного эффекта после инактивации гена препроинсулина введением мутации сдвига рамки считывания в область инициации трансляции [4, 6].

При введении в клетки онкогенов также была показана связь мутагенного эффекта с транзитной экспрессией чужеродной генетической информации [19—23]. Мутагенный эффект оказался краткосрочным, и частота мутантов быстро снижалась до контрольного уровня. С одной стороны, это объясняется индукцией мутаций сразу же после трансфекции в момент присутствия максимального количества в клетках экзогенной ДНК, с другой, — использованием модельного локуса *hprt* (мутанты, резистентные к 6-МП, обладают пониженной жизнеспособностью в ростовой среде и быстро элиминируются из клеточной популяции).

Ранее нами уже отмечалось отсутствие мутагенного эффекта при введении в клетки китайского хомячка рекомбинантной плазмиды *pGins* [3]. Одновременно в одних и тех же экспериментах трансфекция клеток ДНК рекомбинантных плазмид *pBR322ins* и *pAins* приводила к статистически достоверному повышению частоты мутантов. Это свидетельствовало о принципиальном различии в генетическом действии исследуемых рекомбинантных конструкций. В данной работе получены дополнительные факты, подтверждающие отсутствие мутагенных свойств у рекомбинантной плазмиды *pGins* (результаты четырех независимых экспериментов представлены в табл. 2). При сроках исследования 3, 9 и 24 сут частота мутантных колоний после трансфекции клеток ДНК *pGins* не отличалась достоверно от контрольного уровня.

Таким образом, несмотря на то, что структурные элементы, используемые при конструировании *pGins*, вызывали мутагенный эффект (повышение частоты мутантов, резистентных к 6-МП) в культивируемых клетках китайского хомячка, в составе рекомбинантной плазмиды мутагенная активность не проявлялась. По нашему мнению, это обуслов-

лено усилением экспрессии гена препроинсулина и его функций под влиянием вирусных нуклеотидных последовательностей. Не исключена также возможность того, что вирусные регуляторные элементы повышают точность процесса декодирования гена препроинсулина, несущего делецию в регуляторной области.

В последующих экспериментах биологическое действие рекомбинантной плазмиды *pGins* было изучено с использованием цитогенетического теста, позволяющего оценить мутагенный эффект на уровне всего хромосомного аппарата. При введении в клетки китайского хомячка ДНК *pGins* частота хромосомных aberrаций не отличалась от контрольного уровня ($p < 0,05$). В то же время в случае двух других плазмид *pBR322* (положительный контроль) и *pHB320* наблюдалось статистически достоверное повышение частоты хромосомных aberrаций, как и при действии на соматические клетки млекопитающих многих других экзогенных ДНК в диапазоне концентраций от 1 до 15 мкг/мл [3, 6, 19—23].

Совокупность данных, полученных с плазмидой *pGins* в экспериментах *in vitro*, позволила высказать предположение о возможном антимутагенном действии гена препроинсулина, активно экспрессирующего под влиянием вирусных регуляторных элементов (табл. 3). Важно было понять, не связана ли генетическая активность разных рекомбинантных ДНК с влиянием вновь образованных продуктов (РНК и/или белка) на хромосомный аппарат трансфицированных клеток. При этом синтезированный белок-продукт мог действовать двумя путями: 1) через внутриклеточные структуры (на трансфицированные клетки, синтезирующие этот белок) и 2) через поверхностные рецепторы клеточных мембран при условии секреции его в окружающую среду клетками-продуцентами (на все клетки опытных популяций). В организме первый тип влияния гормона инсулина может реализовываться, главным образом, в β -клетках и клетках некоторых эмбриональных тканей, где происходит процессинг проинсулина в инсулин [26—28], а второй тип — в отношении клеток всех тканей организма. В β -клетках существуют механизмы, защищающие их внутриклеточные структуры от действия инсулина [27]. В норме инсулин поступает из крови, где он присутствует в свободном состоянии и/или в комплексах с различными сывороточными белками, и оказывает регуляторное влияние на метаболизм клеток через взаимодействие с мембранными рецепторами [27, 29].

В экспериментах *in vivo* рекомбинантные плазмиды *pGins* и *pAins* в составе липосом инъецирова-

Таблица 2
Частота мутантов по локусу *hprt* после трансфекции клеток рекомбинантной плазмидой *pGins in vitro*

Вариант	Время после трансфекции, сут	Выборка клеток, 10^3	Эффективность клонирования	Количество мутантных колоний	Частота мутантов $\cdot 10^{-5}$	Частота мутантов за вычетом контроля $\cdot 10^{-5}$	Отношение опыт/контроль	p
Контроль	—	1000	0,42	34	8,10	—	—	—
<i>pGins</i>	3	1000	0,41	37	9,02	0,92	1,11	> 0,05
Контроль	—	400	0,27	10	9,26	—	—	—
<i>pGins</i>	3	315	0,51	15	9,33	0,07	1,01	> 0,05
Контроль	—	500	0,19	17	17,89	—	—	—
<i>pGins</i>	3	500	0,16	17	21,25	3,36	1,19	> 0,05
Контроль	—	500	0,26	11	8,46	—	—	—
<i>pGins</i>	3	500	0,25	11	8,80	0,34	1,04	> 0,05
Контроль	—	500	0,28	9	6,43	—	—	—
<i>pGins</i>	9	500	0,39	9	4,61	-1,82	0,72	> 0,05
Контроль	—	500	1,00	7	1,40	—	—	—
<i>pGins</i>	24	500	1,00	4	1,00	-0,40	0,71	> 0,05

Примечание. Концентрация ДНК 10 мкг/мл. Статистическая обработка с помощью критерия Фишера.

Таблица 3
Частота aberrantных метафаз после трансфекции клеток рекомбинантной плазмидой *pGins in vitro*

Вариант	Количество изученных метафаз	Частота aberrantных метафаз			Частота aberrantных метафаз за вычетом контроля $\cdot 10^{-5}$	Отношение опыт/контроль	p
		Всего	С разрывом	С обменом колоний			
Контроль	260	3,46	2,31	1,15	—	—	—
<i>pGins</i>	275	1,82	1,82	0,00	-1,64	0,53	> 0,05
<i>pHB320</i>	100	9,00	7,00	2,00	5,54	2,60	< 0,05
<i>pHB322</i>	100	9,00	7,00	2,00	5,54	2,60	< 0,05

Примечание. Концентрация ДНК 10 мкг/мл. Фиксация метафаз происходила через 24 ч после трансфекции. Статистическая обработка с помощью критерия Фишера.

ли в печень [8]. Плазмиду *pAins* использовали в качестве позитивного контроля, поскольку она вызвала наиболее значительный мутагенный эффект [3, 5]. Хромосомные aberrации изучали в гемопоэтических клетках (костный мозг и лимфоциты), которые доступны для цитогенетических исследований и на которые чужеродные продукты, кодируе-

мые исследуемыми генетическими матрицами, могли действовать только через внешние рецепторы плазматической мембраны. В системе *in vivo* плазмиды *pGins* также не вызвала повышения частоты хромосомных aberrаций, этот показатель был на уровне контроля (табл. 4). В то же время рекомбинантная плазмиды *pAins* в условиях организма

Таблица 4
Частота aberrантных метафаз после введения рекомбинантной плазмиды *pGins in vivo*

Тип клеток Вариант	Количество крыс	Количество изу- ченных метафаз	Частота aberrантных метафаз			Частота aberrантных метафаз за вычетом контроля · 10 ⁻⁵	Отношение опыт/контроль	P
			Всего	С разрывом	С обменом ко- лоний			
Лимфоциты								
Контроль	6	500	0,60	0,60	0,00	—	—	—
<i>pGins</i>	4	200	0,50	0,50	0,00	-0,10	0,83	> 0,05
<i>pAins</i>	6	340	3,53	1,82	0,59	2,93	5,88	< 0,001
Клетки кост- ного мозга								
Контроль	3	150	1,30	1,30	0,00	—	—	—
<i>pAins</i>	4	250	5,00	3,50	1,00	3,70	3,84	< 0,001

П р и м е ч а н и е. Концентрация ДНК 75 мкг в 0,2 мл на особь. В случае лимфоцитов фиксация метафаз происходила через 5 сут, в случае клеток костного мозга — через 30 сут после инокуляции животных. В случае *pAins* встречались метафазы с эндоредупликацией хромосом. Статистическая обработка с помощью критерия Стьюдента.

приводила к статистически достоверному повышению частоты хромосомных аномалий, главным образом разрывов ($p < 0,001$). Наблюдались также единичные случаи транслокаций и эндоредупликаций, как и в исследованиях *in vitro* [3, 6].

Следует отметить, что хромосомные aberrации изучали только у тех экспериментальных животных, в крови которых наблюдалось снижение уровня глюкозы под влиянием рекомбинантных плазмид, сопоставимое с действием инсулина [8]. Итак, поскольку хромосомные aberrации были выявлены в клетках костного мозга и лимфоцитах, то можно было предположить, что мутагенной активностью обладает продукт или продукты, кодируемые *pAins* и секретируемые клетками во внеклеточную среду. А различия в действии *pGins* и двух других рекомбинантных плазмид *pBR322ins* и *pAins* обусловлены количественными и/или качественными различиями синтезированных продуктов. Исходно мы предположили, что вирусный усилитель в конструкции *pGins* компенсирует отсутствие клеточного регуляторного элемента, а это ведет к усилению и/или нормализации экспрессии гена препроинсулина. Действительно, в эксперименте было показано увеличение количества соответствующего белка, секретируемого клетками [9]. Что касается структуры белка-продукта, кодируемого экзогенным геном препроинсулина в составе рекомбинантных плазмид, то в неспецифических клетках было показано образование проинсулина

[30, 31], обладающего ослабленным инсулиноподобным действием [27]. Как уже отмечалось, помимо β -клеток, процессинг проинсулина в инсулин происходит в клетках некоторых эмбриональных тканей (мозга и печени) [26]. Предполагается, что в дифференцированных гепатоцитах возможна продукция инсулина, если ввести экзогенный ген препроинсулина с системой процессирования проинсулина [28]. Это открывает перспективный путь генной терапии инсулинзависимого сахарного диабета.

В последующих экспериментах мы проверили возможное генетическое действие препарата инсулина в концентрации 200 нг/мл *per se* и в сочетании с плазмидой *pHB320*. При выборе условий обработки (концентрации и последовательности введения двух факторов) мы основывались на наших данных о проявлении специфической функциональной активности различных препаратов инсулина в культурах клеток и генетическом действии другого регуляторного белка, лектина растительного происхождения [32]. Инсулин вводили в среду за 2 ч до обработки клеток экзогенной ДНК, также он присутствовал в среде после завершения процедуры трансфекции в течение 24 ч.

По данным двух экспериментов, инсулин не только не вызывал повышения частоты мутантных колоний, но и проявлял антимутагенное действие в отношении мутагенной плазмиды *pHB320* (табл. 5). При совместном действии белка и плазмиды

Таблица 5
Частота мутантов по локусу *hprt* после комбинированной обработки клеток препаратом инсулина и ДНК *pHB320 in vitro*

Вариант	Выборка клеток, 10^3	Эффективность клонирования	Количество мутантных колоний	Частота мутантов $\cdot 10^{-5}$	Частота мутантов за вычетом контроля $\cdot 10^{-5}$	p_1	Разница частот в опытных вариантах $\cdot 10^{-5}$	p_2
Контроль	450	0,51	2	0,86	—	—	—	—
Инсулин	500	0,44	2	0,91	0,05	$> 0,05$	—	—
<i>pHB320</i>	500	0,29	7	4,83	3,97	$< 0,05$	—	—
Инсулин + + <i>pHB320</i>	500	0,34	1	0,59	-0,27	$> 0,05$	—	$< 0,001$
Контроль	500	0,40	2	1,00	—	—	—	—
Инсулин	500	0,32	1	0,62	-0,33	$> 0,05$	—	—
<i>pHB320</i>	500	0,26	4	3,08	2,08	$< 0,05$	—	—
Инсулин + + <i>pHB320</i>	500	0,45	1	0,44	-0,56	$< 0,05$	—	$< 0,001$

П р и м е ч а н и е. Концентрация ДНК 10 мкг/мл, инсулина — 200 нг/мл. Время экспрессии мутаций 3 сут. Статистическая обработка с помощью критерия Фишера. p_1 — достоверность разницы между опытным и контрольным вариантами; p_2 — между опытными вариантами.

наблюдалось статистически достоверное снижение частоты мутантов по сравнению с мутагенным эффектом *pHB320* ($p < 0,001$). При этом значения частоты мутантных колоний в обоих экспериментах были несколько ниже контрольного уровня, в одном случае различия между опытным и контрольным вариантами статистически достоверны.

Таким образом, инсулин в концентрации 200 нг/мл, поступающий через мембранные рецепторы, не вызывал повышения частоты мутантных колоний в культуре клеток китайского хомячка. Более того, он оказывал антимуtagenное (протекторное) воздействие в отношении экзогенной ДНК. Сравнение аминокислотных последовательностей препроинсулина различных млекопитающих свидетельствует о почти полной гомологии этих белков [26]. Именно этим, по-видимому, объясняется тот факт, что инсулин свиньи оказывал генетическое действие на клетки грызунов в наших экспериментах.

Как рекомбинантная плазмида *pGins*, так и белок инсулин не обнаруживали мутагенного эффекта при данных экспериментальных условиях. Напомним, что в случае *pGins* получена новая комбинация структурных элементов, в результате чего ген препроинсулина человека оказывался под влиянием сильного вирусного промотора. В результате этого при введении в клетки млекопитающих

ДНК *pGins* наблюдался более высокий уровень экспрессии гена препроинсулина, чем в случае плазмиды *pBR322ins* [9]. Итак, компенсация делегированной части промотора вирусными регуляторными элементами усиливала функции гена препроинсулина и, как следствие, проявление антимуtagenной активности.

Вероятно, нам удалось обнаружить один из случаев так называемого «парадоксального» генетического эффекта, когда в меньшей концентрации агент вызывает мутагенный эффект, а при увеличении концентрации, наоборот, антимуtagenное действие. Это явление было обнаружено при изучении генетической активности тиоловых соединений, цистеина, цистеамина и глутатион-S-трансферазы [33]. «Парадоксальный» генетический эффект был открыт авторами работы [34] на примере цистеамина. Было показано, что цистеамин в низких концентрациях действовал как мутаген, а в более высоких концентрациях — как антимуtagen. В дальнейшем этот эффект был подтвержден другими исследователями в отношении не только собственного действия тиоловых соединений, но и их действия как модификаторов мутагенеза при совместном действии с агентами другой природы [35—37]. Он объясняется целым рядом причин. Мы остановимся только на некоторых, которые могут быть общими у тиоловых соединений и инсулина.

Во-первых, было установлено, что тиоловые соединения, как и инсулин, активируют окислительные реакции, приводящие к образованию перекиси водорода. При высоких концентрациях тиоловых соединений образовавшаяся перекись водорода быстро разрушается [33]. Кроме того, тиоловые соединения образуют генетически активные конъюгаты при окислении различных ксенобиотиков, при этом возникают ситуации, аналогичные описанной выше: при высоких концентрациях тиоловых соединений перекиси разрушаются [33].

Во-вторых, тиоловые соединения могут действовать как антиоксиданты, подавляя свободнорадикальные процессы [38]. Сахарный диабет наряду с другими болезнями относят к числу «свободнорадикальных» болезней [33]. Не исключено, что инсулин, нормализуя многие процессы в организме, одновременно снижает мутагенный потенциал свободных радикалов, образующихся при окислении ксенобиотиков. Значит, антимутагенное действие инсулина и/или проинсулина прежде всего должно было сказаться на образовании aberrаций хромосом, которые в настоящее время напрямую связывают с нарушением баланса свободных радикалов. Действительно, мы обнаружили снижение частоты хромосомных aberrаций (при введении в фибробласты млекопитающих рекомбинантной плазмиды *pGins*).

В-третьих, «парадоксальный» эффект может быть также обусловлен «феноменом максимума» [33, 35]. Суть его состоит в следующем: частота мутаций увеличивается прямо пропорционально дозе мутагена только до определенной величины — точки максимума, затем достигается плато или даже наблюдается снижение частоты мутаций. Причин этого явления несколько, но большинство из них связано с элиминацией либо клеток — носителей первичных повреждений ДНК, либо клеток-мутантов. В отношении инсулина еще предстоит изучить количественные характеристики генетического эффекта на клетки млекопитающих, но можно предположить, что предел его биологического действия, по-видимому, ограничен числом рецепторов на клеточной мембране.

Учитывая многочисленность и разнообразие функций гена препроинсулина, можно предположить участие различных клеточных механизмов в его антимутагенном эффекте. В настоящее время уже показано антимутагенное действие целого ряда регуляторных белков, в том числе и гормональных препаратов [38—41]. Предполагается также, что антимутагенное действие интерферона, биогенных аминов и регуляторов роста может реализоваться так же, как и в случае аденозина, через изменение

активности аденилатциклазного комплекса [42]. Известно, что аденилатциклазный путь играет важную роль в глюкозозависимой экспрессии гена препроинсулина [27]. Но при этом следует учитывать, что в отличие от β -клеток и гепатоцитов в фибробластах млекопитающих (а именно их использовали в экспериментах *in vitro*) экспрессия введенного гена препроинсулина не является глюкозозависимым процессом [27, 28].

Совокупность всех полученных данных позволяет высказать предположение о том, что экспрессирующий ген препроинсулина наряду с другими регуляторными генами участвует в поддержании уровня генетической стабильности или изменчивости клеточных популяций. Генетические эффекты гена препроинсулина, введенного в клетки методом трансфекции, выявлялись в период временной экспрессии этого гена [1, 2, 9] и характер его действия на соматические клетки млекопитающих зависит от изменений в регуляторном обеспечении рекомбинантной конструкции. Эти данные свидетельствуют в пользу того, что генетическое действие гена препроинсулина в клетках млекопитающих обусловлено прежде всего его экспрессией, а не интеграцией с клеточной ДНК. Как свидетельствуют данные по изучению динамики интеграционного процесса при введении в клетки высших организмов трансформирующих ДНК различного происхождения, интеграция происходит в более отдаленные сроки после сложных структурных преобразований чужеродных генетических матриц клеточными ферментами [43, 44]. А мутагенез, индуцированный экзогенными ДНК на хромосомном и геномных уровнях, связан, главным образом, с экспрессией чужеродных генов в клетках млекопитающих [45—47]. Снижение мутагенной активности гена препроинсулина за счет введения мутации в область инициации трансляции этого гена указывает на роль белкового продукта в регуляции мутагенеза [3, 4, 6]. В данной работе выявлен генетический эффект (антимутагенное действие) препарата инсулина в определенной концентрации. С одной стороны, генетическое действие экзогенного гена препроинсулина, вероятно, зависит от количества и качества соответствующего белкового продукта, от представления последнего в свободном или связанном с другими белками состоянии, от пути поступления его в клетки. С другой стороны, оно определяется генетическими особенностями и функциональным состоянием клеточной системы.

В практическом отношении результаты данной работы свидетельствуют о возможности конструирования безопасных в генетическом отношении рекомбинантных ДНК и указывают на необходимость

дальнейших исследований по созданию генетически стабильных клеточных популяций, пригодных для целей генной терапии массовых патологий [1].

Л. Л. Лукаш, С. В. Подольска, А. А. Евсеенко, О. М. Сухорада, Л. М. Неборачко, І. С. Варзанова, Т. П. Кочубей

Рекомбинантна ДНК *pGins*, що містить експресуючий ген препроінсуліну людини, не виявляє мутагенної активності

Резюме

На відміну від мутагенних рекомбінантних плазмід *pBR322ins* та *pAins*, ДНК *pGins* у концентрації 10 мкг/мл не викликає підвищення частоти генних мутацій та хромосомних аберацій у соматичних клітинах ссавців. Відсутність мутагенного ефекту *pGins* підтверджено у різних тест-системах *in vitro* та *in vivo*. Ймовірно, що це зумовлено підсиленням експресії та функцій гена препроінсуліну під впливом вірусних регуляторних елементів. Показано, що обробка клітин ссавців, що культивуються, препаратом інсуліну захищає їх від мутагенної дії рекомбінантної плазмиди *pHB320*, яка містить геном вірусу гепатиту В. Одержані дані свідчать про участь гена препроінсуліну, що експресується, у підтриманні рівня генетичної стабільності або мінливості клітинних популяцій.

L. L. Lukash, S. V. Podolskaya, A. A. Evseenko, He. M. Suhorada, L. N. Neborachko, I. S. Varsanova, T. P. Kochubei

The recombinant DNA *pGins* that contains expressing human preproinsulin gene has no mutagenic activity

Summary

Unlike recombinant plasmids *pBR322ins* and *pAins* the plasmid DNA *pGins* at the concentration of 10 μg/ml does not manifest mutagenic activity in somatic mammalian cells. The absence of *pGins* mutagenic activity is confirmed in different test-systems *in vitro* and *in vivo* and presumably is determined by the increasing of the expression and the functions of the preproinsulin gene under the action of virus regulation elements. It is shown that the preliminary treatment of somatic mammalian cells by insulin preparation protects them against the mutagenic action of recombinant plasmid *pHB320*, containing the genome of virus hepatitis B. The data obtained here testify to the participation of the expressing gene coding for insulin in the maintenance of genetic stability or cellular populations variation.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kordyum V. A., Frotkis V. V., Lukash L. L. et al. Gene therapy of mass pathologies // *Biopolimery i kletka*.—1993.—9, № 4.—С. 63—104.
2. Лукаш Л. Л., Неборачко Л. Н., Сухорада Е. М. и др. Экспрессия гена инсулина человека в культивируемых клетках млекопитающих // *Biopolimery i kletka*.—1990.—6, № 1.—С. 82—87.
3. Изучить возможное трансформирующее и мутагенное действие генноинженерных конструкций, содержащих реально ценные гены человека: Отчет о НИР (заключительный) / Институт молекулярной биологии и генетики.—ГР 01.88.0081890: Инв. №.—Киев, 1992.—97 с.
4. Рубашевский Е. Л., Пацковский Ю. В., Лысенко Е. Ф. и др. Мутагенный эффект рекомбинантной плазмиды *pBR322ins*, содержащей нативный и измененный ген инсулина человека // *Цитология и генетика*.—1993.—27, № 4.—С. 44—51.
5. Лукаш Л. Л., Подольская С. В., Сухорада Е. М. и др.

- Влияние алкилирующего агента MNNG на мутагенный эффект экзогенной рекомбинантной ДНК // *Биополимеры и клетка*.—1995.—11, № 1.—С. 87—91.
6. Rubashevsky E. L., Patskovsky Yu. V., Kirilenko S. D. et al. DNA recombinant molecules carrying different alleles of human preproinsulin gene as mutagens in Chinese hamster cells // *Там же*.—1996.—12, № 5.—С. 83—92.
7. Козловская Т. М., Пулмен П. П. Структура и экспрессия гена поверхностного антигена вируса гепатита В человека // *Молекуляр. биология*.—1986.—20, № 4.—С. 884—901.
8. Тутюк Т. Г., Костецкий И. Е., Чайковская Т. Л. и др. Трансплантация гена препроинсулина человека в организм здоровых и больных инсулинзависимым диабетом крыс // *Биополимеры и клетка*.—1993.—9, № 1.—С. 39—44.
9. Lukash L. L., Podolskaya S. V., Neborachko L. N. et al. Expression of insulin gene introduced into embryonic human cells // *Proc. of the 1994 Miami Bio/Technol. Eur. Symp. Short reports*.—Monaco, 1994.—Р. 62.
10. Маниатис Т., Фрич Е. Е., Сэмбрук Ж. Молекулярное клонирование.—М.: Мир, 1985.—420 с
11. Van der Eb A. J., Graham F. L. Assay of transforming activity of tumor virus DNA // *Meth. Enzymol.*—1980.—65, N 3.—Р. 826—839.
12. Бужиевская Т. И., Лукаш Л. Л., Подольская С. В. Экспериментальные модели для изучения мутагенеза и трансформации, индуцированных вирусами и нуклеиновыми кислотами // *Методы молекуляр. биологии*.—Киев: Наук. думка, 1986.—С. 147—158.
13. Moorhead P. S., Nowell P. C., Mellman W. I. et al. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood // *Exp. Cell. Res.*—1960.—20, N 3.—Р. 613—616.
14. Мак Грегор Г., Варли Дж. Методы работы с хромосомами животных.—М.: Мир, 1986.—272 с.
15. Монахов А. С. Микрометод культивирования лимфоцитов периферической крови кроликов и белых крыс для исследования хромосом // *Цитология*.—1982.—24, № 2.—С. 233—238.
16. Неборачко Л. М., Варзанова І. С., Подольська С. В. та ін. Генна терапія інсулінзалежного цукрового діабету // *Матеріали II з'їзду мед. генетиків України* (Львів. 18—20 жовтня 1995 року).—Львів, 1995.—С. 104—105.
17. Плохинский Н. А. Алгоритмы биометрии.—М.: Изд-во МГУ, 1980.—150 с.
18. Шапиро Н. И., Варшавер Н. Б. О темпе спонтанного мутационного процесса в соматических клетках млекопитающих и о некоторых вопросах, с ним связанных // *Генетика*.—1976.—12, № 7.—С. 132—149.
19. Lukash L. L., Buzhievskaya T. I. Role of early viral genes in mutagenesis // *Biotechnol. Curr. Progr.*—Lancaster: Techn. Publ. Co., 1991.—Р. 119—131.
20. Buzhievskaya T. I., Lukash L. L., Rubashevsky E. L. Mutagenic and transforming action of some viruses, genes and recombinant molecules // *Ibid.*—Р. 133—156.
21. Schramayr S., Caporossi D., Mak I. et al. Chromosomal damage induced by human adenovirus type 12 requires expression of the E1B 55-kilodalton viral protein // *J. Virol.*—1990.—64, N 5.—Р. 2090—2095.
22. Барон Е. М., Бобрышева И. В., Варшавер Н. Б. Плазмида *pEJ6.6*, несущая активированный онкоген *c-Ha-ras-1*, повышает частоту мутаций в клетках китайского хомячка // *Генетика*.—1992.—28, № 6.—С. 35—40.
23. Бобрышева И. В. Активированные клеточные онкогены *c-Ha-ras1* и *c-myc* как мутагены: генетическое и молекулярно-биологическое исследование: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.—М.: Мед. генет. центр РАМН, 1995.—20 с.

24. *Lusky M., Botchan M.* Inhibition of SV40 replication in simian cells by specific pBR322 DNA sequences // *Nature*.—1981.—293.—P. 79—81.
25. *Peden K. W. C., Pipas J. M., Pearson-White S., Nathans D.* Isolation of mutants of animal virus in bacteria // *Science*.—1980.—209.—P. 1392—1396.
26. *Cordell B., Goodman H. M.* Evolution of the mammalian insulin gene // *Genes and tumor genes*.—New York: Raven press, 1982.—P. 115—119.
27. *Mitanchez D., Doiron B., Chen R., Kahn A.* Glucose-stimulated genes and prospects of gene therapy for type I diabetes // *Endocr. Rev.*—1997.—18, N 4.—P. 520—540.
28. *Hayashi M., Taguchi M., Fujita T.* The IRI release from insulin gene-transduced hepatic cells responds to ambient glucose concentration // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*—1997.—233.—P. 470—475.
29. *Makino H., Manganiello V. C., Kono T.* Roles of ATP in insulin actions // *Annu. Rev. Physiol.*—1994.—56.—P. 273—295.
30. *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.
31. *Docherty K.* Gene therapy for diabetes mellitus // *Clin. Sci.*—1997.—92.—P. 321—330.
32. *Лукош Л. Л., Карпова И. С., Мирошниченко О. С. и др.* Влияние лектина соцветий на спонтанный и индуцированный алкилирующим агентом мутагенез в соматических клетках млекопитающих // *Цитология и генетика*.—1997.—31, № 5.—С. 52—60.
33. *Ранчялис В. П., Бальчюнене Л. С.* «Парадоксальное» действие тиоловых соединений // *Вестн. РАМН*.—1995.—№ 1.—С. 44—49.
34. *Delrez M., Firket H.* // *Biochem. Pharmacol.*—1968.—17.—P. 1892—1899.
35. *Rosin M. P., Stich H. F.* The inhibitory effect of cysteine on the mutagenic activities of several carcinogens // *Mutat. Res.*—1978.—54.—P. 73—81.
36. *Stark A. A., Zeiger E., Pagano D. A.* O⁶-Methylguanine, DNA methyl transferase — defective human cell mutant // *Carcinogenesis*.—1988.—9.—P. 771—777.
37. *Holme J. A., Soderlund E. J., Brunborg G. et al.* O⁶-Methylguanine, DNA strand breaks and cytotoxicity // *Ibid.*—1989.—10.—P. 49—54.
38. *Середенин С. Б., Дурнев А. Д.* Фармакологическая защита генома.—М.: ВИНИТИ, 1992.—160 с.
39. *Засухина Г. Д., Синельщикова Т. А.* Мутагенез, антимутагенез, репарация ДНК // *Вестн. РАМН*.—1993.—№ 1.—С. 9—15.
40. *Тимченко О. И., Антипенко Е. Н.* Об условиях применения тироксина как антимутагена после общего рентгеновского облучения // *Радиобиология*.—1981.—№ 2.—С. 204—207.
41. *Рушковский С. Р., Чегринец С. Е., Безруков В. Ф., Храпунов С. Н.* Влияние тимогена на уровень хромосомных aberrаций в культуре лимфоцитов периферической крови человека // *Цитология и генетика*.—1996.—30, № 5.—С. 81—85.
42. *Семенов В. В.* Мутагенез, антимутагенез и регуляторная система клетки // *Вестн. РАМН*.—1995.—№ 1.—С. 41—44.
43. *Томилин Н. В.* Генетическая стабильность клетки.—Ленинград: Наука, 1983.—158 с.
44. *Попов Л. С., Горбунова Л. В., Варшавер Н. Б. и др.* Интеграция ДНК ОВ40 в геном клеток и вирусный мутагенез // *Генетика*.—1986.—22, № 9.—С. 2213—2219.
45. *Gorbunova L. V., Varshaver N. B., Marshak M. I., Shapiro N. I.* The role of the transforming A gene of SV40 in the mutagenic activity of the virus // *Mol. and Gen. Genet.*—1982.—187, N 3.—P. 473—476.
46. *Дризе О. Б., Сокова О. И., Никашина Е. Б. и др.* Возможная роль Тантгена в индукции хромосомных aberrаций в клетках, трансформированных вирусом SV40 // *Цитология*.—1985.—27, № 1.—С. 76—82.
47. *Бобрышева И. В., Варшавер Н. Б.* Характеристика мутантов, индуцированных онкогеном, и природа мутагенного действия онкогена // *Генетика*.—1995.—31, № 12.—С. 1598—1604.

УДК 577.218

Поступила в редакцию 20.07.98