

ПЕРЕНОС ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ ЧЕРЕЗ ТРАНСПЛАЦЕНТАРНЫЙ БАРЬЕР В ЗАРОДЫШИ МЫШИ¹

© 2010 г. А. М. Ефремов*, А. О. Буглаева*, С. В. Орлов ***, С. В. Буров ***,
И. А. Игнатович**, Э. Б. Диде**, В. С. Шавва*, А. П. Перевозчиков*,**

*Санкт-Петербургский государственный университет
199034 Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 7/9

**Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины РАМН
197376 Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12

***Институт высокомолекулярных соединений РАН
199004 Санкт-Петербург, В. О., Большой пр., д. 31
E-mail: app@iem.sp.ru

Поступила в редакцию 15.05.09 г.
Окончательный вариант получен 22.07.09 г.

Генетическая модификация зародышей млекопитающих является важным подходом к моделированию различных нарушений развития человека, а также инструментом для изучения функций отдельных генов млекопитающих. Используя собственный опыт в разработке средств доставки млекопитающим генетических конструкций невирусным путем, приводятся данные о возможности доставки эукариотического вектора экспрессии зародышам мышей через трансплацентарный барьер с помощью гидродинамических внутривенных инъекций беременным самкам комплексов ДНК с гибридным пептидом, имеющим катионную часть для взаимодействия с ДНК и включающим структуру лиганда к рецепторам рилизинг-фактора лютеинизирующего гормона (люлиберина). Преимуществами предлагаемого нами метода является простота, экономичность, неиммуногенность для самок и, как следствие, возможность многократного повторения процедуры, т.е. на его основе может быть разработана системная доставка генов в ткани зародышей млекопитающих.

Ключевые слова: перенос генетических конструкций, зародыши млекопитающих, трансплацентарный барьер, гидродинамические инъекции, производные люлиберина.

Невирусные средства доставки генетических конструкций в организм млекопитающих в отличие от вирусных, хотя и имеют невысокую эффективность, характеризуются низкой токсичностью и отсутствием иммуногенности. Однако отмечается относительная кратковременность действия генов, доставленных с помощью невирусных средств, например путем липофекции посредством липосом или катионных пептидов (Li, Huang, 2000). Перенос чужеродных генетических конструкций путем рецепторопосредованного эндоцитоза комплексов ДНК с катионными пептидами-конъюгатами (гибридами поликатионов и лигандов специфичных поверхностных рецепторов) имеет ряд преимуществ в направленном переносе генов в клетки и в ряде случаев в продолжительном сохранении в клетках чужеродных генетических конструкций по сравнению с другими невирусными средствами (Molas et al., 2003).

Генетическая модификация зародышей млекопитающих (мыши с нокаутом гена и трансгенные) является важным подходом к моделированию различных нарушений развития, а также инструментом для изучения функций отдельных генов человека. Перенос ДНК в зародыши млекопитающих (мыши и крысы) через трансплацентарный (гемато-плацентарный) барьер пытаются осуществить достаточно давно для разработки методов, альтернативных созданию трансгенных лабораторных животных (Lipshutz et al., 1999; Türkay et al., 1999; Coutelle et al., 2005). Для решения этих задач использование вирусных средств доставки нецелесообразно вследствие высокой вероятности побочных эффектов и осложнений при протекании беременности (Douar et al., 1996; Endoh et al., 2002). В то же время трансплацентарный барьер, по-видимому, достаточно проницаем для небольших фрагментов ДНК *in vivo*. В ходе эмбрионального развития можно наблюдать перемещение генетического материала от зародыша к матери и обратно, а в случаях трисомий у плода поток зародышевой ДНК в систему циркуляции матери возрастает (Sekizawa et al., 2003; Wataganara, Bian-

¹ Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 06-04-49784).

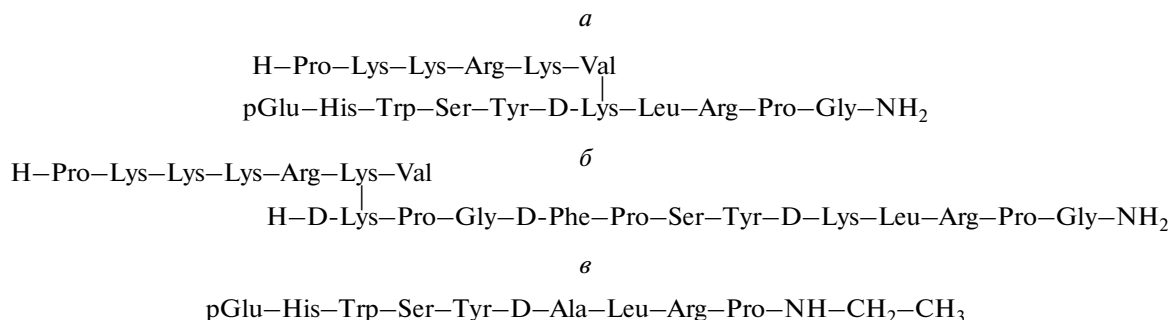


Рис. 1. Структура пептидных конъюгатов NLS-LHRH (а) и Nuk1 (б), содержащих катионную (NLS-сигнал ядерной локализации, вверху) и лигандную (синтетический агонист и антагонист люлиберина соответственно, внизу) части, и пептида аларелина — агониста люлиберина (в).

chi, 2004). Изучение процессов перемещения экзогенного генетического материала от матери к зародышу и наоборот поможет, по всей вероятности, пролить свет и на процессы такой циркуляции ДНК, способные осуществляться *in vivo*.

Одним из подходов, представляющимся перспективным для осуществления внутриутробного переноса, является метод внутривенных гидродинамических инъекций ДНК (Liu et al., 1999; Zhang et al., 1999). Суть его заключается во введении в кровотоки мышей раствора ДНК при гидродинамическом усилии (объем 1–3 мл за несколько с). При инъекциях в хвостовую вену мыши почти две трети всей экзогенной ДНК попадает в клетки печени, главным образом, в гепатоциты. Попавшая в клетки ДНК сохраняется в клеточных ядрах в эписомном виде (Акифьев и др., 2004). Этот метод был использован для приматов (Zhang et al., 2001), и в скором времени, по-видимому, может быть применен при лечении человека.

Используя собственный опыт разработки средств доставки млекопитающим генетических конструкций невирусным путем (Акифьев и др., 2004; Диге и др., 2006; Ignatovich et al., 2003), мы приводим данные о возможной доставке эукариотического вектора экспрессии зародышам мышей через трансплacentарный барьер с помощью гидродинамических внутривенных инъекций беременным самкам комплексов ДНК с гибридным пептидом, имеющим катионную часть для взаимодействия с ДНК и включающим структуру лиганда к рецепторам гонадотропинвысвобождающего гормона (ГНВГ) (Schally et al., 1999). Многочисленные рецепторы этого природного декапептида находятся на поверхности клеток трофобласта плаценты и гипофиза млекопитающих, а также у более чем 50% различных типов опухолевых клеток (Schally et al., 1990; Schally, 1999).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В работе использованы реагенты, реактивы и среды фирм “Sigma”, “Gibco Life Technologies”, “Invitrogen” (США), “Serva” (Германия), “Pharmacia” (Швеция), “Boehringer Mannheim” (Германия), а также отечественного производства (квалификации х. ч. и ч. д. а), а также ферменты для генно-инженерных работ производства “Fermentas” (Литва) и НПО “СибЭнзим” (Новосибирск).

Фибробласты кожи (диплоидные клетки) человека VH10 и клетки гепатомы человека HepG2 получены из банка клеточных культур Института цитологии РАН. Для экспериментов использовали самок мышей линии C57BL/6 со сроком беременности от 17 до 19 дней, полученных из питомника “Рапполово” РАН.

Твердофазный синтез олигопептидов Nuk1, NLS-LHRH, проявляющих свойства соответственно антогониста и агониста ГНВГ и содержащих катионную часть для связывания с ДНК *in vitro*, которая является вместе с тем сигналом ядерной локализации — NLS (H-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val), а также синтез пептида аларелина (агониста ГНВГ) (рис. 1) проводили на полуавтоматическом синтезаторе NPS-4000 (“Neosystem Lab., Франция).

Флуоресцентную метку в Nuk1 вводили по ε-аминогруппе D-лизина с использованием изотиоцианата флуоресцеина в водном растворе [D-Lys⁶]-ГНВГ по стандартной методике (Ignatovich et al., 2003).

В работе использовали плазмиду pCMVluc, сконструированную ранее (Акифьев и др., 2004) и представляющую собой вектор экспрессии кДНК копии гена люциферазы светляка *Photinus pyralis* (luc) под контролем промотора ранних генов цитомегаловируса CMV. Все работы по получению генетических конструкций выполняли в соответствии с описанными методиками (Маниатис и др., 1984).

Клетки линий HepG2 и VH10 высевали на покровные стекла и культивировали в стандартных условиях (при 37°C и 5% CO₂) в течение ночи. Непосредственно перед экспериментом их промывали

раствором Хенкса и заменяли среду на Opti-MEM ("Invitrogen", США). Для исследования внутриклеточной локализации пептида Nuk1 к клеткам добавляли флуоресцентно меченный пептид в концентрации 10 мкМ. Через определенные интервалы времени клетки трижды промывали холодным раствором фосфатно-солевого буфера (pH 7.5), содержащего гепарин (58 мкг/мл), фиксировали 4%-ным параформальдегидом и дополнительно обрабатывали антителами против белка grp58 человека, меченными родамином. Анализ интернализации флуоресцентно меченных пептидов проводили с помощью метода конфокальной лазерной микроскопии с использованием микроскопа Leica TCF SL (Германия).

Формирование комплексов ДНК с пептидом Nuk1 проводили в фосфатно-солевом буфере (pH 7.5) при различном соотношении зарядов ДНК и пептида в реакционной среде. Комплексы ДНК/пептид готовили следующим образом: ДНК и указанные выше пептиды растворяли в равных объемах раствора Рингера. Раствор пептида по каплям добавляли к раствору ДНК с тщательным перемешиванием после каждой капли для предотвращения выпадения осадка. Полученный раствор использовали для внутривенных инъекций животным. Анализ сформированных комплексов ДНК/пептид осуществляли методом задержки комплексов в агарозном геле при электрофорезе в соответствии с описанной ранее методикой (Ignatovich et al., 2003).

Трансфекцию клеток HepG2 препаратами комплексов ДНК/Nuk1 и ДНК/NLS-LHRH выполняли на основании метода, предложенного ранее (Gottschalk et al., 1996). Клетки плотностью 10^4 кл/см² высевали в чашки Петри диаметром 30 мм и выращивали до состояния 60–70%-ного монослоя в среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной сыворотки телят ("Биолот", Россия) при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Комплексы ДНК/пептид с разными соотношениями зарядов ДНК и пептида готовили из расчета 12 мкг ДНК на чашку Петри в 500 мкл фосфатно-солевого буфера. После инкубации клеток с комплексами в течение 2 ч клетки отмывали от непоглощенных комплексов раствором гепарина (58 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере) и инкубировали в среде DMEM с 10%-ной сывороткой в течение 24 ч.

В экспериментах использовано 20 беременных самок и проанализировано 78 зародышей (17–19 дней развития). Очищенные с помощью равновесного ультрацентрифугирования в градиенте плотности хлорида цезия плазмиду pCMVluc, а также комплексы pCMVluc/Nuk1 инъецировали в хвостовую вену беременных самок массой 20–30 г (из расчета 10–20 мкг ДНК на мышь) – медленно в 200 мкл раствора Рингера или гидродинамическим способом: за 4–5 с в 1–3 мл раствора Рингера (в зависимости от веса мыши). Для гидродинамических инъекций непосредственно перед экспериментом отбирали группу мышей с указанными выше

массами ± 1 г относительно среднего значения ($m_{\text{ср}}$). Точный объем вводимого раствора (V) вычисляли в мл по формуле: $V = 0.057143 \times m_{\text{ср}} + 0.5143$ (Акифьев и др., 2004).

Ядра клеток тканей животных изолировали центрифугированием гомогената клеток (2000g, 20 мин, +4°C) в градиенте сахарозы (2.2 М), осадок ядер суспендировали в гипотоническом буфере (20 mM KCl, 10 mM *tris*-HCl, pH 7.4), нехромосомную ядерную ДНК изолировали по методу Хёрста, как описано ранее (Браун, Скотт, 1989).

Доставку конструкции, содержащей ген люциферазы, в ткани зародышей мыши подтверждали с помощью ПЦР-анализа ДНК с использованием праймеров к участку кДНК люциферазы (744 п.н.), подобранных с помощью программы Primer3.

Прямой праймер: 5'-ATCCACGCTGTTTTGAC-CTCC-3'.

Обратный праймер: 5'-AATCTCACGCAG-GCAGTTCT-3'.

Активность люциферазы в экстрактах культивированных клеток определяли в соответствии с протоколом производителя ("Promega", США). Ферментативную активность определяли на люминометре "Turner Biosystem 20/20" (США) выражая ее в относительных световых единицах (RLU), представляющих собой число вспышек в минуту на миллиграмм белка клеточных лизатов (RLU/мг белка). Фоновые значения люминесценции не превышали 120 RLU. Определение концентрации белка в клеточных экстрактах проводили по методу Брэдфорд.

Животных умерщвляли в соответствии с общепринятыми правилами, затем изолировали различные органы, плаценту и зародыши. Объекты гомогенизировали в лизирующем буфере ("Promega", США), аликвоту гомогената центрифугировали для удаления остатков клеток, и из пробирок отбирали надосадочную жидкость, которую хранили при температуре –70°C. Активность люциферазы в образцах надосадочной жидкости определяли, как описано выше.

Достоверность различий средних оценивали методом непарного *t*-теста. Различия считались статистически достоверными при $p < 0.05$; все расчеты выполняли с использованием пакета программ Statistica 5.0 ("StatSoft, Inc.", США). Представлены средние значения в трех-пяти повторностях. Планки погрешностей соответствуют стандартной ошибке среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Комплексы ДНК/Nuk1 проникают в опухолевые клетки, содержащие рецепторы к люлиберину. Синтетические аналоги люлиберина (как агонисты, так и антагонисты) должны связываться с рецепторами ГНВГ и интернализироваться клетками, содержащими эти рецепторы. Поскольку клетки HepG2 содер-

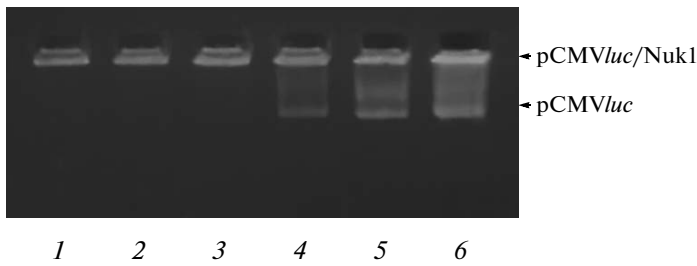


Рис. 2. Образование комплексов pCMVluc/Nuk1. Подбор соотношений зарядов ДНК: пептид методом задержки в геле; соотношение зарядов ДНК/Nuk1: 1 – 1/1.5, 2 – 1/0.9, 3 – 1/0.75, 4 – 1/0.5; 5 – 1/0.25, 6 – 1/0.15.

жат такого рода рецепторы (Schally, 1999), был проведен анализ поглощения флуоресцентно меченного олигопептида Nuk1 такими клетками с помощью метода конфокальной микроскопии. В качестве контроля использовали клетки, не содержащие рецепторы ГНВГ – диплоидные клетки кожи человека VH10. Контрастирование клеток осуществляли с помощью обработки их антителами к убиквитарному белку grp58, выявляемыми вторыми антителами, конъюгированными с родамином. Микроскопический анализ показал, что флуоресцентно меченный Nuk1 эффективно интернализуется клетками HepG2, но не клетками VH10.

Таким образом, катионная часть пептида (рис. 1), представляющая собой одновременно и сигнал ядерной локализации, который доставляет пептид в клеточное ядро, не препятствует взаимодействию лигандной части пептида с рецептором и его дальнейшей интернализации.

Формирование комплексов молекулярных конъюгатов с плазмидной ДНК при различных соотношениях электрических зарядов пептида и ДНК тестировали с помощью метода задержки комплексов при электрофорезе в агарозном геле. Установлено, что при соотношении зарядов 1 : 1 происходит полное связывание плазмидной ДНК (рис. 2). В качестве положительного контроля использовали комплексы, образованные этой ДНК с катионным пептидом K₈, свойства которого, обеспечивающие проникновение в клетки, описаны ранее (Gottschalk et al., 1996).

Способность комплексов NLS-LHRH и Nuk-1 доставлять ДНК в опухолевые клетки HepG2 была продемонстрирована с помощью люциферазного теста. Клетки подвергали трансфекции комплексами плазмиды pCMVluc с пептидными конъюгатами NLS-LHRH или Nuk-1. Оба комплекса оказались трансфекционно активными. Избыток пептида аларелина (агониста ГНВГ) в инкубационной среде приводил к снижению уровня экспрессии перенесенного гена при использовании комплекса NLS-LHRH, но не оказывал влияния на трансфекцию клеток комплексом pCMVluc/Nuk-1 (рис. 3). На основании полученных данных можно заклю-

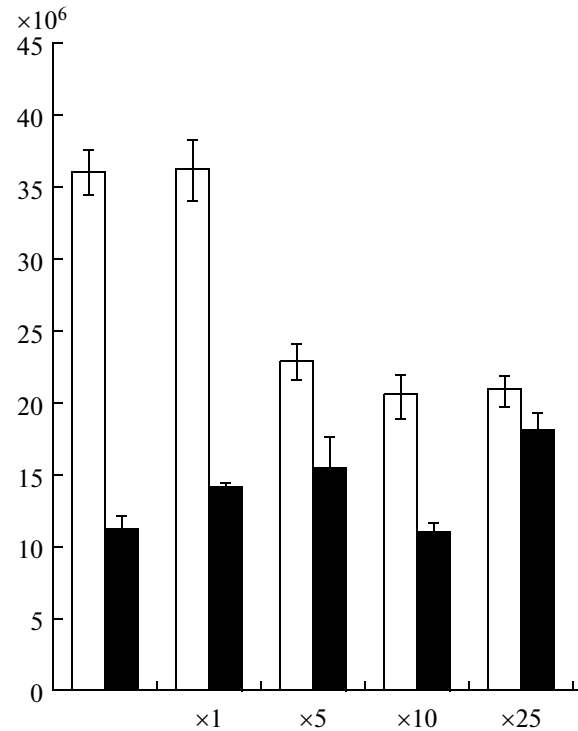


Рис. 3. Влияние избытка аларелина в среде на эффективность трансфекции клеток HepG2 комплексами pCMVluc/NLS-LHRH (□) и pCMVluc/Nuk1 (■) (люциферазный тест). По оси абсцисс – молярные избытки аларелина; по оси ординат – ферментативная активность люциферазы, RLU.

чить, что проникновение в клетки комплексов ДНК с NLS-LHRH происходит по тому же механизму, что и интернализация свободного ГНВГ – с помощью рецепторопосредованного эндоцитоза. Лигандная часть Nuk-1 соответствует по структуре антагонистам рецепторов ГНВГ, которые, как известно, взаимодействуют с рецепторами с большей аффинностью по сравнению с агонистами (Milovanovic et al., 1993). По всей вероятности, именно этим объясняется неспособность аларелина (агониста ГНВГ) препятствовать связыванию комплексов pCMVluc/Nuk-1 с поверхностью клеток.

Для доставки люциферазного вектора экспрессии (pCMVluc) в организм беременных самок и зародышам мышей использовали как свободную плазмидную ДНК, так и ее комплексы с пептидным конъюгатом Nuk1.

Указанные конструкции доставляли методом гидродинамических инъекций в хвостовую вену беременных самок, поскольку обычные внутривенные инъекции животным плазмидной ДНК (или ее комплексов с антагонистом люлиберина) не позволили выявить плазмиду в тканях зародышей (неопубл. данные). Эффект присутствия экзогенной ДНК в тканях беременных самок, в плаценте и в тканях зародышей (в основном кожно-мышечная составля-

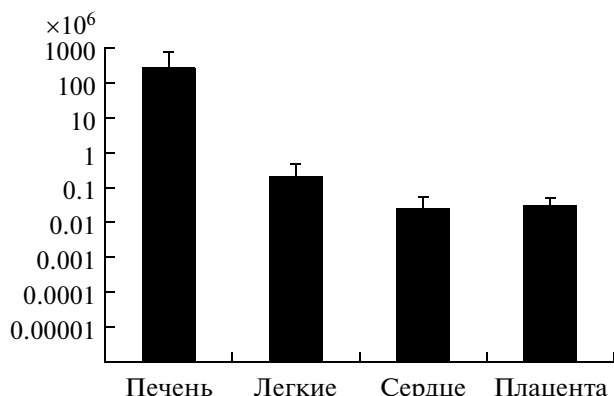


Рис. 4. Перенос плазмиды pCMVluc в хвостовую вену беременных самок мышей методом гидродинамических инъекций; определение люциферазной активности в различных тканях, RLU. Приведены средние значения шести независимых экспериментов, планки погрешности соответствуют стандартной ошибке среднего.

ющая и печень) оценивали через 24 ч после инъекций по активности люциферазы в лизатах тканей. Максимальная люциферазная активность выявлялась главным образом в печени беременных самок на уровне в среднем 1.5×10^8 RLU/мг белка (рис. 4). Люциферазная активность на невысоком уровне регистрировалась у 18% зародышей ($3.0\text{--}5.0 \times 10^2$ RLU/мг белка), у остальных зародышей уровень активности фермента не превышал фоновые значения ($1.0\text{--}1.5 \times 10^2$ RLU/мг белка).

Было сделано предположение об индивидуальном варьировании плазмидной ДНК, доставляемой в ткани зародышей. Для проверки этого предположения из тканей зародышей параллельно с определением в них люциферазной активности выделяли фракцию нехромосомной ядерной ДНК и выявляли методом ПЦР присутствие ДНК люциферазного гена (Акифьев и др., 2004). Нуклеотидная последовательность гена люциферазы была обнаружена во всех образцах плаценты беременных самок и у пяти из семи проанализированных зародышей; результаты одного эксперимента (самка № 2 и ее зародыши) представлены на рис. 5.

При введении плазмидной ДНК в виде комплекса с пептидом Nuk1 путем обычной (“медленной”) инъекции в хвостовую вену беременной мыши люциферазную активность регистрировали только в печени взрослых самок, причем уровень люминесценции составлял в среднем 5.8×10^5 RLU/мг белка, что, по меньшей мере, на три порядка ниже, чем аналогичные показатели, полученные методом гидродинамических инъекций “свободной” плазмидной ДНК взрослым самкам (среднее значение по всем экспериментам — 1.5×10^8 RLU/мг белка). Уровень люциферазной активности в плаценте и у зародышей не превышал фоновых значений ($1.0\text{--}1.8 \times 10^2$ RLU/мг белка).

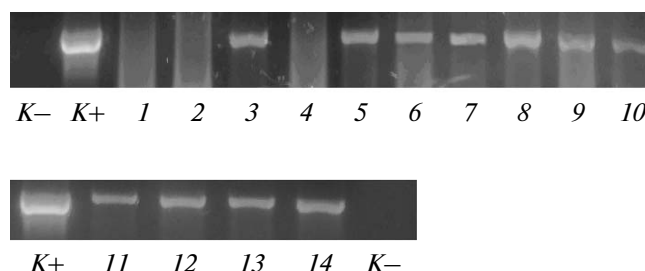


Рис. 5. Выявление кДНК гена люциферазы в низкомолекулярной ядерной ДНК, изолированной из зародышей и органов беременных самок мышей, инъецированных плазмидой pCMVluc гидродинамическим методом: (K+) — плазида pCMVluc, (K-) — печень контрольной самки, 1 — матка самки, 2 — эмбрион № 8, 3 — печень самки, 4, 5, 7 — эмбрионы № 4–6, 6 — плацента самки № 6, 8 — печень эмбриона № 3, 9 — остальные ткани эмбриона № 3, 10–14 — плацента самок № 7, 4, 3, 5, 8 соответственно.

При гидродинамической доставке комплексов ДНК с Nuk1 уровень люминесценции в печени взрослых самок оказался сопоставим с таковым при гидродинамической доставке свободной ДНК (1.3×10^8 RLU/мг белка). В это же время в 67% образцах плаценты и у 25% эмбрионов выявлялась люциферазная активность, превышающая пороговые значения; средние значения соответственно составляли $4.5\text{--}2.8 \times 10^4$ RLU/мг белка (рис. 6).

Сравнительные результаты, суммирующие данные по использованию двух разных способов доставки чужеродной ДНК в ткани зародышей мышей через трансплацентарный барьер, представлены в таблице.

Таким образом, в результате проведенных исследований были получены данные о принципиальной возможности использования внутривенных гидро-

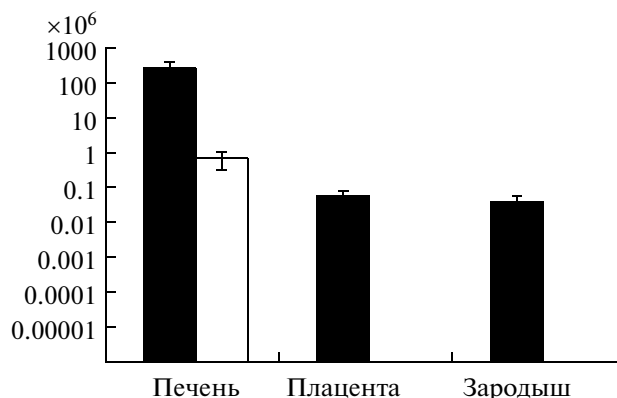


Рис. 6. Перенос плазмиды pCMVluc в комплексе с пептидным конъюгатом Nuk1 в хвостовую вену беременных самок мышей с помощью гидродинамических (■) и обычных (“медленных”) (□) инъекций: определение люциферазной активности в различных тканях, RLU.

Определение люциферазной активности в различных тканях беременной самки и в теле зародыша при различных способах доставки генетической конструкции в организм матери, % от общего числа параллельных проб в каждом эксперименте

Органы	Свободная ДНК, %	Доставка ДНК в комплексах с Nuk1, %	
		медленная	быстрая
Печень самки	100 ± 10	100 ± 10	100 ± 10
Сердце самки	100 ± 10	—	—
Плацента	23.5 ± 2.5	0	77.8 ± 7.8
Зародыши	0	0	25 ± 2.5

динамических инъекций для переноса генов в ткани зародышей мышей, поскольку трансплацентарный барьер, как оказалось, проницаем для доставляемой таким образом чужеродной ДНК, хотя эффективность переноса генетической конструкции в эмбриональные ткани невысока. Повышение эффективности переноса репортерного гена в ткани зародышей происходит при гидродинамической доставке беременным самкам мышей комплексов ДНК с пептидным конъюгатом Nuk1, часть которого представляет собой аналог люлиберина, а другая часть служит для образования полиэлектролитного комплекса с переносимой ДНК.

Несмотря на то что уже имеются литературные данные о переносе в зародыши млекопитающих плазмидной ДНК, доставляемой с использованием микровезикул *in utero* (с последующей ультразвуковой обработкой) (Endoh et al., 2002; Taniyama, Morishita, 2006), сопоставимые результаты мы получили с использованием более простого и щадящего метода. Увеличение эффективности переноса генетических конструкций в ткани зародышей может быть достигнуто как с применением специфичных агентов, способствующих переносу, так и с изменением места введения раствора с ДНК (например, гидродинамические инъекции внутрь брюшной полости беременных самок). Преимуществами предложенного нами метода является простота, экономичность, неиммуногенность для самок и, как следствие, возможность многократного повторения процедуры – таким образом, на его основе может быть разработана системная доставка генов интереса в ткани зародышей млекопитающих.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Акифьев Б.Н., Дижэ Э.Б., Ефремов А.М. и др. Перенос гена аполипопротеина А1 человека мышам методом гидродинамических инъекций: факторы, влияющие на эффективность и продолжительность экспрессии гена в печени животного // Молекуляр. биология. 2004. Т. 38. С. 1076–1084.

Браун Э.М.К., Скотт М.Р.Д. Ретровирусные векторы // Новое в клонировании ДНК. М.: Мир, 1989. С. 272–307.

Дижэ Э.Б., Игнатович И.А., Буров С.В. и др. Комплексы ДНК с катионными пептидами: условия формирования и факторы, влияющие на их проникновение в клетки млекопитающих // Биохимия. 2006. Т. 71. С. 1659–1667.

Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. Методы генетической инженерии. М.: Мир, 1984. 477 с.

Coutelle C., Themis M., Waddington S.N. et al. Gene therapy progress and prospects: fetal gene therapy // Gene Ther. 2005. V. 22. P. 601–1607.

Douar A.M., Themis M., Coutelle C. Fetal somatic gene therapy // Mol. Hum. Reprod. 1996. V. 2. P. 633–641.

Endoh M., Koibuchi N., Sato M. et al. Fetal gene transfer by intrauterine injection with microbubble-enhanced ultrasound // Mol. Ther. 2002. V. 5. P. 501–508.

Gottschalk S., Sparrow J.T., Hauer J. et al. A novel DNA-peptide complex for efficient gene transfer and expression in mammalian cells // Gene Ther. 1996. V. 3. P. 448–457.

Ignatovich I.A., Dizhe E.B., Pavlotskaya A.V. et al. Complexes of plasmid DNA with basic domain 47–57 of the HIV-1 Tat protein are transferred to mammalian cells by endocytosis-mediated pathways // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. P. 42625–42636.

Li S., Huang L. Nonviral gene therapy: promises and challenges // Gene Ther. 2000. V. 7. P. 31–34.

Lipshutz G.S., Sarkar R., Flebbe-Rehwaltdt L. et al. Short-term correction of factor VIII deficiency in a murine model of hemophilia A after delivery of adenovirus murine factor VIII *in utero* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. P. 13324–13329.

Liu F., Song Y., Liu D. Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA // Gene Ther. 1999. V. 6. P. 1258–1266.

Milovanovic S.R., Monje E., Szepeshazi K. et al. Effect of treatment with LHRH analogs containing cytotoxic radicals on the binding characteristics of receptors for luteinizing-hormone-releasing hormone in MXT mouse mammary carcinoma // J. Cancer Res. Clin. Oncol. 1993. V. 119. P. 273–278.

Molas M., Gomez-Valades A.G., Vidal-Alabró A. et al. Receptor-mediated gene transfer vectors: progress towards genetic pharmaceuticals // Curr. Gene Ther. 2003. V. 3. P. 468–485.

Schally A.V. Luteinizing hormone-releasing hormone analogs: their impact on the control of tumorigenesis // Peptides. 1999. V. 20. P. 247–1262.

Schally A.V., Srkalovic G., Szende B. et al. Antitumor effects of analogs of LH-RH and somatostatin: experimental and clinical studies // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 1990. V. 37. P. 1061–1067.

Sekizawa A., Yokokawa K., Sugito Y. et al. Evaluation of bidirectional transfer of plasma DNA through placenta // Hum. Genet. 2003. V. 113. P. 307–310.

Taniyama Y., Morishita R. Development of plasmid DNA-based transfer // YAKUGAKU ZASSHI. 2006. V. 126. P. 1039–1045.

- Türkay A., Saunders T., Kurachi K.* Intrauterine gene transfer: gestational stage-specific gene delivery in mice // *Gene Ther.* 1999. V. 6. P. 1685–1694.
- Watananara T., Bianchi D.W.* Fetal cell-free nucleic acids in the maternal circulation // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2004. V. 1022. P. 90–99.
- Zhang G., Budker V., Wolff J.A.* High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA // *Hum. Gene Ther.* 1999. V. 10. P. 1735–1737.
- Zhang G., Budker V., Williams P. et al.* Efficient expression of naked DNA delivered intraarterially to limb muscles of nonhuman primates // *Ibid.* 2001. V. 12. P. 427–438.

Transfer of Genetic Constructions through the Transplacental Barrier into Mice Embryos

**A. M. Efremov^a, A. O. Buglaeva^a, S. V. Orlov^{a,b}, S. V. Burov^c, I. A. Ignatovich^b, E. B. Dizhe^b,
V. S. Shavva^a, and A. P. Perevozchikov^{a,b*}**

^a *St. Petersburg State University, Universitetskaya nab. 7/9, St. Petersburg, 199034 Russia*

^b *Institute of Experimental Medicine, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Akademika Pavlova 12, St. Petersburg, 197376 Russia*

^c *Institute of Macromolecular Compounds, Russian Academy of Sciences, Bolshoi pr. 31, St. Petersburg, 199004 Russia*

*e-mail: app@iem.sp.ru

Abstract—Genetic modification of mammalian embryos is an important way to model various changes in human development; also, it is an instrument for studying the functions of certain genes in mammals. Using our own experience in developing modes of delivery of genetic constructions to mammals in a nonviral way, we present here data on the delivery of a eukaryotic expression vector to mice embryos through the transplacental barrier with the use of hydrodynamic intravenous injections of DNA–hybrid peptide complexes to pregnant females. The peptide has a cationic part for interaction with DNA and includes a ligand structure towards receptors of the releasing factor of luteinizing hormone (RFLH, luliberin). Advantages of the suggested method are simplicity, economy, nonimmunogenicity for females, and the ability to multiply repeat the procedure. On the basis of the method, systemic gene delivery into tissues of mammalian embryos may be developed.

Key words: transfer of genetic constructions, mammalian embryos, transplacental barrier, hydrodynamic injections, luliberin derivative