

УДК 576.3:616-003.217/-006.6:57.083.2/.085.2/.23/.25

КЛЕТКИ АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ТРАНСФЕКЦИИ IN VITRO

Рябченко А.В., Твердохлеб Н.В., Князев Р.А.

ФГБУ «НИИ биохимии» СО РАМН, Новосибирск, e-mail: borrelia@mail.ru

В работе представлен материал по исследованию возможности трансфекции клеток *in vitro* асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) с помощью белкового компонента апоА-I липопротеинов высокой плотности и трансфецирующего реагента Lipofectamin 2000 (контрольная реакция). Клетки трансфецировали плазмидными векторами (пДНК), экспрессирующими в клетках животных ген *gfp* (TagGFP2) и ген *gfp*, слитый с человеческим геном апоА-I, под контролем промотора цитомегаловируса (P_{CMVIE}). За схему трансфекции была взята схема, прилагаемая к реагенту Lipofectamin 2000. В результате работ впервые было показано проникновение апоА-I, меченного ФИТЦ, в ядра клеток АКЭ. Были исследованы различные молярные соотношения пДНК:апоА-I, от 1:1 до 1:100 соответственно, однако ни с одной из используемых пДНК положительных результатов трансфекции обнаружено не было. Впервые была показана возможность трансфекции клеток АКЭ с помощью Lipofectamin 2000, максимальный уровень трансфекции первичного пассажа на вторые сутки составлял $8,6 \pm 2,1\%$, при соотношении пДНК: Lipofectamin 2000 равном 1 мкг: 3 мкл.

Ключевые слова: трансфекция, асцитная карцинома Эрлиха (АКЭ), апоА-I, lipofectamin, *gfp*

EHRlich ASCITES CARCINOMA AS A MODEL FOR TRANSFECTION IN VITRO

Ryabchenko A.V., Tverdokhle N.V., Knyazev R.A.

Federal State Budgetary Institution «Scientific Research Institute of Biochemistry» under the Siberian Branch Russian Academy of Medical Sciences, Novosibirsk, e-mail: borrelia@mail.ru

This paper presents research results possibility transfection of cells Ehrlich ascites carcinoma (EAC) *in vitro* by the protein component apoA-I of high density lipoprotein and Lipofectamin 2000 (control reaction). Cells were transfected with plasmid vectors (pDNA). Vector contained the gene *gfp* (TagGFP2) and the gene *gfp* fusion with human gene *apoA-I*, under the control cytomegalovirus promoter (PCMV IE). Animal cells containing these plasmids express a gene *gfp*. For transfection pattern was taken protocol to the reagent Lipofectamin 2000. As a result, the work was first shown penetration of apoA-I labeled FITC (fluorescein-5-isothiocyanate) in the nucleus of EAC cells. We investigated different molar ratios of pDNA:apoA-I, from 1:1 to 1:100, respectively, but with none of the used pDNA transfection positive results were found. First it was shown transfection of EAC cells by Lipofectamin 2000. The maximum level of primary passage transfection on the second day was $8,6 \pm 2,1\%$, at a ratio of pDNA:Lipofectamin 2000 equal 1 μ g:3 μ l.

Keywords: transfection, ehrlich ascites tumor cells, apoA-I, lipofectamin, *gfp*

Известно, что липопротеины могут связывать и транспортировать, в том числе и через цитоплазматическую мембрану, ксенобиотики, жирорастворимые витамины, стероидные соединения, тиреоидные гормоны, лекарственные препараты [5, 7]. В литературе показано, что наиболее перспективными переносчиками являются липопротеины высокой плотности (ЛПВП) и их белковый компонент аполипопротеин А-I (апоА-I), образующий стабильные комплексы с биологически активными веществами [6, 11, 14]. Показано, что многие клетки обладают рецепторами к апоА-I, поэтому апоА-I нашел применение в искусственных липосомах в качестве маркера для распознавания такими клетками [12, 15]. Однако транспортной ролью функции апоА-I не ограничиваются. Показано, что апоА-I сам по себе и в комплексе с тетрагидрокартизолом (ТГК) связывается с эукариотической ДНК [1]. На коротких олигонуклеотидах было продемонстрировано, что наибольшее сродство комплекс апоА-I-ТГК имеет к олигонуклеотидам, в состав которых входит (GCC) $_n$ повторы ($n = 3,5$). При этом в местах взаимодействия образуются одно-

нитевые разрывы ДНК, в результате чего происходит увеличение копирования ДНК на 22–27% [2, 13]. Основываясь на этих данных, на специфическом (или слабоспецифическом) взаимодействии апоА-I с ДНК, мы предположили его использование для трансфекции клеток млекопитающих плазмидными ДНК (пДНК). Поскольку некоторые клетки животных, в том числе и опухолевые, имеют рецепторы к апоА-I [9, 10], конгломерат апоА-I $_{(n)}$ -пДНК может быть поглощен этими клетками. Целью настоящего исследования явилось изучение возможности трансфекции клеток асцитной карциномы Эрлиха плазмидными ДНК с помощью апоА-I.

Материалы и методы исследования

Аполипопротеин А-I выделяли из плазмы крови человека по методике [3, 6]. Качество белка анализировали в 12% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях по Леммли. Концентрацию белка измеряли спектрофотометрически по методике Варбурга и Кристиана (отношение оптической плотности раствора при 280 и 260 нм). В качестве культуры клеток использовался монослой перевиваемой линии клеток АКЭ. Животные были любезно предоставлены Калединым В.И. (ИЦиГ СО РАН, Новосибирск). Содержание, питание, уход за животными

и выведение их из эксперимента осуществляли в соответствии с требованиями «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приложение к приказу МЗ СССР от 12.08.1977 № 755). Выделение и выращивание клеток из перитонеального экссудата мышей проводилось как описано в работе [7]. Клетки высевались в 24-луночный планшет («Orange Scientific», США) предварительно обработанный раствором коллагена 0,1 мг/мл, из расчета 180 000 живых клеток на лунку. Далее клетки инкубировались ночь в CO₂-инкубаторе для формирования монослоя в атмосфере, содержащей 5% CO₂ и 95% воздуха, при 37°C. На следующие сутки производилась замена культуральной среды и инкубация с исследуемыми веществами – комплексом апоА-I-ФИТЦ или трансфицирующими реагентами (комплекс пДНК-апоА-I и пДНК-Lipofectamin 2000). Конъюгат апоА-I-ФИТЦ получали путем инкубации смеси белка с ФИТЦ (флуоресцеин-5-изотиоцианат) в течение ночи в карбонатном буфере pH 9,5, в соотношении 12,5 мкг ФИТЦ к 1 мг белка. Конъюгат от не прореагировавшего ФИТЦ отделяли с помощью гель-фильтрации на Sephadex G25 (примерно 1 мг конъюгата на 10 мл смолы, высота колонки 10 см), хроматография велась в стандартном фосфатно-солевом буфере (pH 7,4–7,5). Полученный таким образом конъюгат использовался для инкубации с клетками. Визуально конъюгат имел желто-зеленый оттенок, что говорило о присоединении флуоресцентной метки ФИТЦ к молекулам белка.

Плазмиды для трансфекции содержали ген *gfp* под контролем промотора цитомегаловируса – pTagGFP2-C, ~4,7 т.п.н. («Евроген», Россия). Второй вариант плазмиды являлся аналогичным и содержал рекомбинантную ДНК – слитые гены *gfp* и *apoA-I* человека. Плазмиды в препаративном количестве нарабатывали в клетках *E. coli*, выделяли плазмиды из клеточного набора «Plasmid MiniPrep» («Евроген», Россия), конечный продукт мог использоваться для трансфекций. Качество плазмид анализировали электрофоретически в 0,8% агарозном геле. За основу метода трансфекции был взят протокол, прилагаемый фирмой-производителем Lipofectamin 2000 («Invitrogen; Life Technologies», США). На вторые сутки после трансфекции клетки визуально анализировались с помощью флуоресцентного микроскопа Axiovert 40 CFL («Zeiss», Германия). Уровень трансфекции оценивался как отношение количества флуоресцирующих клеток к общему количеству клеток, наблюдаемых в микроскопическом поле (не менее 20 полей для каждого образца). Результаты статистически обрабатывались и были представлены в процентах как среднее значение и среднее квадратичное отклонение.

Результаты исследования и их обсуждение

На предварительном этапе работ было исследовано предположение о проникновении апоА-I в ядра клеток АКЭ. Для этого был получен конъюгат апоА-I с флуоресцирующим красителем ФИТЦ (флуоресцеин-5-изотиоцианат). Конъюгат инкубировался с клетками в течение различных промежутков времени, от 30 до 180 минут. Концентрация конъюгата так же варьировалась от 5 до 50 мкг/мл. Монослой клеток был выра-

щен в 24-луночной планшете, объем среды составлял 1 мл. По окончании инкубации клетки с конъюгатом клетки фиксировались на покровном стекле и анализировались в флуоресцентном микроскопе. В результате анализа было обнаружено зеленое свечение в ядрах некоторых клеток (рис. 1). Как и ожидалось, максимальное количество таких клеток наблюдалось в образцах, инкубированных 180 минут с концентрацией конъюгата 50 мкг/мл (рис. 1, А). Наличие выраженных светящихся ядер (и ядрышек) в клетках являлось прямым доказательством проникновения конъюгата в ядра клеток АКЭ. В контрольных клетках подобного свечения не наблюдалось, как вариант эти клетки можно видеть на рис. 1, А. В случае инкубации клеток со «свободным» ФИТЦ клетки представлялись однородными «размытыми пятнами» без выраженной структурной флуоресценции (рис. 1, В).

На рис. 1, А можно видеть, что далеко не все клетки обладали светящимся ядром. Вероятно, это следствие гетерогенной популяции клеток АКЭ, т.е. клеток, находящихся в различных стадиях пролиферации. Клетка обладает максимальным количеством активных рецепторов к апоА-I лишь в определенный промежуток своего жизненного цикла. Отсюда мы и наблюдали небольшую долю клеток со светящимися ядрами.

Подтверждение о проникновении апоА-I в ядра клеток АКЭ позволило перейти к следующему этапу исследований. Далее мы изучили возможность переноса пДНК молекулами апоА-I в ядра клеток АКЭ. Для этого предварительно инкубировали пДНК с апоА-I в фосфатно-солевом буфере или бессывороточной среде в течение 15–20 мин в различных молярных соотношениях пДНК:апоА-I, от 1:1 (1 мкг:0,01 мкг) до 1:100, т.е. в крайних точках мы предполагали посадку от 1 до 100 молекул белка на плазмиду (апоА-I_n-пДНК, где *n* равно 1, 5, 25, 50 и 100). Затем различное количество смеси добавляли к клеткам, общее количество пДНК при этом составляло от 0,5 до 5 мкг на лунку 24-луночного планшета (примерно 150000–180000 клеток на лунку). Данный вариант эксперимента проводился на двух пДНК, разница заключалась в том, что одна пДНК содержала ген *gfp*, слитый с геном *apoA-I* человека (2 вариант). Этот вариант плазмиды был специально нами заказан («Евроген», Россия), поскольку, проанализировав структуру гена *apoA-I* человека на примере известной кДНК [GenBank: AK292231.1], мы обнаружили в 3'-концевой области гена некоторое количество относительно сближенных GCC-триплетов. Расстояние между

ГСС-триплетами составляло от двух до восьми нуклеотидов (рис. 2). Это натолкнуло нас на мысль, что, может быть, с этим вариан-

том плазмиды взаимодействие белка апоА-I будет более специфичным, как и в случае с ГСС-богатыми олигонуклеотидами [2, 13].

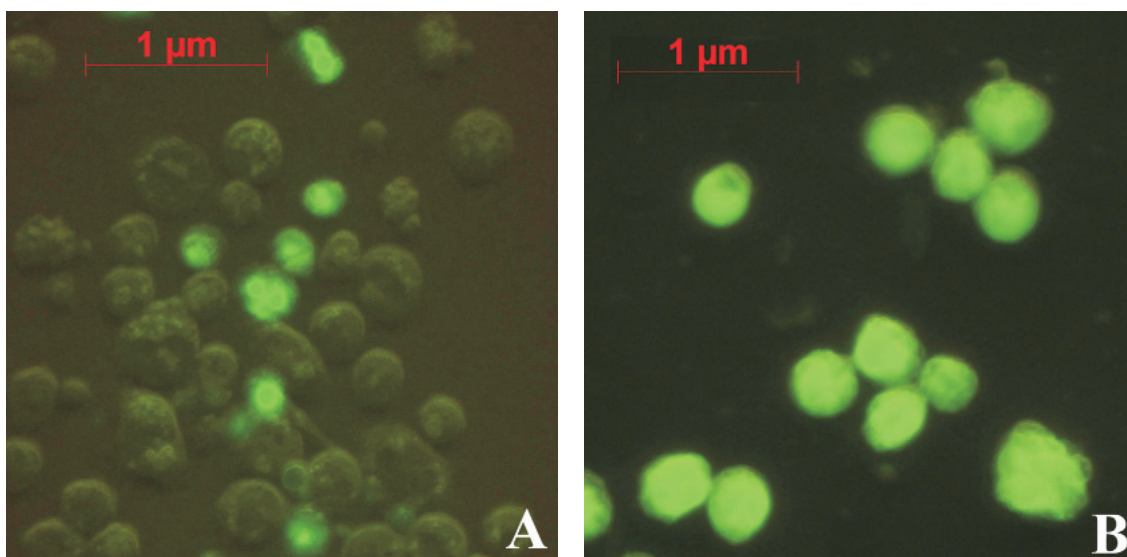


Рис. 1. А – клетки АКЭ, инкубированные 180 минут с концентрацией конъюгата 50 мкг/мл, снимок в флуоресцентном режиме; В – клетки, инкубированные со «свободным» ФИТЦ, снимок в флуоресцентном режиме

5' – ...GCCAGCGCTTGGCCGCGCGCCTTGAGGCTCTCAAGGAGAACGGCGGCGCCAGACTGGCC
GAGTACCACGCCAAGGCCACCGAGCATCTGAGCACGCTCAGCGAGAAGGCCAAGGCCCGCGCTC
GAGGACCTCCGCCAAGGCCTGCTGCC...–3'

Рис. 2. Фрагмент кДНК гена апоА-I человека, повторы GCC подчеркнуты

В качестве контроля параллельно проводился аналогичный эксперимент со «свободной» пДНК (1 вариант, пДНК содержала только ген *gfp*). Условия эксперимента были аналогичными, как и для комплекса апоА-I_(n)-пДНК.

В качестве контрольной реакции на возможность переноса пДНК в ядра клеток АКЭ параллельно проводилась трансфекция клеток с помощью зарекомендовавшего себя трансфецирующего реагента Lipofectamin 2000 (далее Lip). В постановке контрольной реакции исследовалось оптимальное для трансфекции соотношение пДНК:Lip – от 1 мкг:1 мкл до 1 мкг:5 мкл. Комплекс пДНК:Lip получали инкубацией в бессывороточной среде при комнатной температуре в течение 20 мин. согласно инструкции к Lip., затем смесь добавляли к клеткам. Суммарное количество пДНК на лунку было аналогичным, как и в случае комплекса апоА-I_(n)-пДНК. На следующие сутки, примерно после 24 часов инкубации, начинали наблюдение за клетками в флуо-

ресцентный микроскоп. Через каждые сутки инкубационная среда менялась на свежую, не содержащую трансфецирующих реагентов. Общее время инкубации клеток не превышало трех суток.

По результатам этих экспериментов в клетках, инкубированных со смесью пДНК:Lip наблюдалась характерная выраженная флуоресценция клеток, синтезирующих зеленый флуоресцирующий белок уже после суток инкубации, пример клеток представлен на рис. 3. Частота встречаемости флуоресцирующих клеток составляла от $1,8 \pm 0,7$ до $8,6 \pm 2,1\%$ и была достоверно выше, чем в контрольных клетках со «свободной» пДНК. Максимальный уровень флуоресцирующих клеток $8,6 \pm 2,1\%$ был обнаружен при соотношении пДНК:Lip, равном 1 мкг:3 мкл и общем количестве пДНК 3 мкг. Дальнейшее увеличение количества пДНК а так же увеличение количества Lip в соотношении пДНК:Lip не приводило к росту уровня трансфекции, значения оставались примерно на этом же уровне.

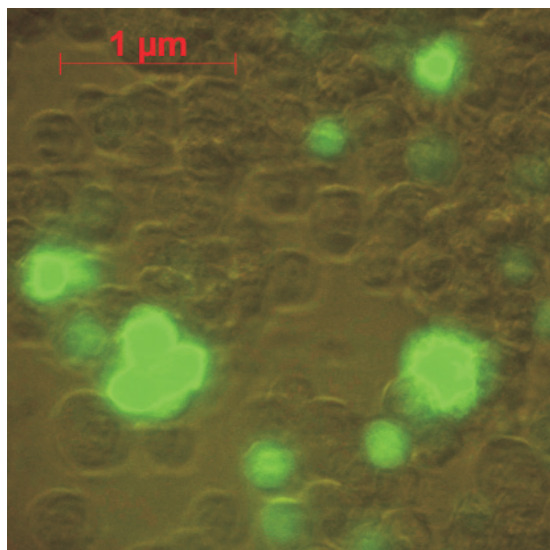


Рис. 3. Пример клеток АКЭ, инкубированных с комплексом пДНК:Lip, снимок в флуоресцентном режиме после 24 часов с начала проведения трансфекции. Клетки, экспрессирующие ген *gfp*, имели характерное ярко-зеленое свечение

В литературе отсутствуют данные о трансфекции клеток АКЭ с помощью Lip, однако в целом можно отметить низкий уровень трансфекции клеток по сравнению с известными клеточными линиями. Например, для нейронных клеток и клеток линии НЕК 293 уровень трансфекции в первом пассаже с помощью Lip по данным производителя составляет 25% и 99% соответственно [4]. Вероятно, в нашем случае низкий уровень трансфекции обусловлен особенностью клеток АКЭ и, возможно, недостаточной очисткой используемых пДНК.

В клетках, инкубированных со смесью апоА-I_(n)-пДНК (оба варианта пДНК), частота встречаемости флуоресцирующих клеток не превышала частоту клеток, инкубированных с аналогичным количеством «свободной» пДНК. Уровень трансформации в таких клетках не превышал 0,2%, и достоверного отличия с контрольными образцами обнаружено не было. Это говорит о том, что комплекс апоА-I_(n)-пДНК, в исследованных молярных соотношениях при *n*, равной 1, 5, 25, 50 и 100, не проникал в ядра клеток АКЭ. Вероятной причиной таких результатов могла быть громоздкость комплекса апоА-I_(n)-пДНК, что сделало невозможным его рецептор-опосредованный перенос в клетку и/или ядра клеток.

Заключение

В результате исследований впервые было показано проникновение апоА-I, меченного ФИТЦ, в ядра клеток асцитной

карциномы Эрлиха. Впервые была показана возможность трансфекции клеток АКЭ в условиях *in vitro* с помощью трансфецирующего реагента Lipofectamin 2000, уровень трансфекции составил до $8,6 \pm 2,1\%$ клеток. Эти данные позволяют говорить о пригодности клеток АКЭ в качестве модели для трансфекции. Показана неспособность апоА-I к переносу плазмидных ДНК размером 5–6 т.п.н. в клетки и/или ядра клеток АКЭ в исследуемых молярных соотношениях.

Список литературы

1. Гимаутдинова О.И., Кузнецов П.А., Тузиков Ф.В., Панин Л.Е. Сайты взаимодействия ДНК эукариот с комплексами аполипопротеин А-I-стероидный гормон // Бюллетень СО РАМН. – 2007. – № 5. – С. 33–37.
2. Гимаутдинова О.И., Базалук В.В., Кузнецов П.А., Клейменова Н.И. Влияние первичной структуры ДНК на связывание с комплексом «тетрагидрокортисол-апоА-I»: роль образовавшихся аддуктов в транскрипции и копировании // Бюллетень СО РАМН. – 2010. – № 2. – С. 23–27.
3. Князев Р.А. Роль аполипопротеина А-I и аполипопротеина Е в регуляции биосинтеза белка и нуклеиновых кислот в культуре нормальных и опухолевых гепатоцитов: дисс. канд. биол. наук. – Новосибирск, 2007. – С. 56–57.
4. Life Technologies: Lipofectamin 2000. URL: <https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/11668019?CID=search-product> (дата обращения 20.02.2014).
5. Поляков Л.М., Панин Л.Е. Липопротеины высокой плотности и аполипопротеин А-I: регуляторная роль и новые терапевтические стратегии лечения атеросклероза // Атеросклероз. – 2013. – № 1. – С. 42–53.
6. Панин Л.Е., Поляков Л.М., Усынин И.Ф., Суменкова Д.В., Князев Р.А. Влияние кортикостероидов в комплексе с аполипопротеином А-I на биосинтез белка в культуре гепатоцитов // Проблемы эндокринологии. – 2009. – № 3. – С. 45–47.
7. Суменкова Д.В. Участие липопротеинов высокой плотности и аполипопротеина А-I в механизмах внутриклеточной регуляции и направленном транспорте биологически активных веществ в клетки: дис. ... д-ра биол. наук. – Новосибирск, 2010. – С. 7–8.
8. Суменкова Д.В., Князев Р.А., Поляков Л.М., Панин Л.Е. Влияние липопротеинов и стероидных гормонов на биосинтез белка в клетках асцитной карциномы Эрлиха // Бюлл. СО РАМН. – 2010. – № 2. – С. 44–48.
9. Favre G., Blancy E., Tournier J.F., Soula G. Proliferative effect of high density lipoprotein (HDL) and HDL fractions (HDL1,2, HDL3) on virus transformed limfoblastoid cells // Biochim. Biophys. Acta. – 1989. – Vol.1013. – P. 118–124.
10. Farve G., Tazi K., Le G. et al. High density lipoprotein3 bindings sites are related to DNA biosynthesis in the adenocarcinoma cell line A549 // J. Lipid. Res. – 1993. – Vol. 34. – P. 1093–1106.
11. Kader A., Pater A. Loading anticancer drugs into HDL as well as LDL has little effect on properties of complexes and enhances cytotoxicity to human carcinoma cells // J. Control Release. – 2002. – Vol. 80(1–3). – P. 29–44.
12. Nakayama T., Butler J., Sehgal A., et al. Harnessing a physiologic mechanism for siRNA delivery with mimetic lipoprotein particles // Mol. Ther. – 2012. – Vol. 20. – P. 1582–1589.
13. Panin L., Gimautdinova O., Kuznetsov P., Tuzikov F. The Mechanism of Interacting Biologically Active Complexes Dehydroepiandrosterone- or Tetrahydrocortisol-Apolipoprotein A-I with DNA and their Role in Enhancement of Gene Expression

sion and Protein Biosynthesis in Hepatocytes // Current Chemical Biology. – 2011. – Vol. 5. – P. 9–16.

14. Polyakov L.M., Sumenkova D.V., Knyazev R.A., Panin L.E. The analysis of interaction of lipoproteins and steroid hormones // Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry. – 2010. – Vol.4. – № 4. – P. 362–365.

15. Rui M., Tang H., Li Y., Wei X., Xu Y. Recombinant high density lipoprotein nanoparticles for target-specific delivery of siRNA // Pharm. Res. – 2013. – Vol. 30. – P. 1203–1214.

References

1. Gimautdinova O.I., Kuznetsov P.A., Tuzikov F.V., Panin L.E. Bjulleten' SO RAMN. 2007. no. 5. pp. 33–37.

2. Gimautdinova O.I., Bazaluk V.V., Kuznetsov P.A., Klejmenova N.I. Bjulleten' SO RAMN. 2010. no. 2. pp. 23–27.

3. Knyazev R.A. Diss. kand. biol. nauk. Novosibirsk. 2007. pp. 56–57.

4. Lipofectamin2000(2014). Available at: <https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/11668019?CID=search-product> (accessed 20 February 2014).

5. Polyakov L.M., Panin L.E. Ateroskleroz. 2013. no. 1. pp. 42–53.

6. Panin L.E., Polyakov L.M., Usynin I.F., Sumenkova D.V., Knyazev R.A. Problemy jendokrinologii. 2009. no. 3. pp. 45–47.

7. Sumenkova D.V. Diss. dokt. biol. nauk. Novosibirsk. 2010. pp. 7–8.

8. Sumenkova D.V., Knyazev R.A., Polyakov L.M., Panin L.E. Bjull. SO RAMN. 2010. no. 2. pp. 44–48.

9. Favre G., Blancy E., Tournier J.F., Soula G. Biochim. Biophys. Acta. 1989. Vol. 1013. pp. 118–124.

10. Farve G., Tazi K., Le G., Bennis F. J. Lipid. Res. 1993. Vol. 34. pp. 1093–1106.

11. Kader A., Pater A. J. Control Release. 2002. Vol.80 pp. 29–44.

12. Nakayama T., Butler J., Sehgal A., et al. Mol. Ther. 2012. Vol.20. pp. 1582–1589.

13. Panin L., Gimautdinova O., Kuznetsov P., Tuzikov F. Current Chemical Biology. 2011. Vol.5. pp. 9–16.

14. Polyakov L.M., Sumenkova D.V., Knyazev R.A., Panin L.E. Biomedical Chemistry. 2010. Vol.4. pp. 362–365.

15. Rui M., Tang H., Li Y., Wei X., Xu Y. Pharm. Res. 2013. Vol. 30. pp. 1203–1214.

Рецензенты:

Гимаутдинова О.И., д.б.н., доцент кафедры медицинской химии, ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Новосибирск;

Куницын В.Г., д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории медицинской биотехнологии, ФГБУ «НИИ биохимии» СО РАМН, г. Новосибирск.

Работа поступила в редакцию 01.04.2014.