

Аутотрансформація кліток млекопитаючих

В. А. Кордюм, С. П. Шпилева, Т. А. Рубан, Е. М. Сухорада, В. И. Андриенко

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, 03143, Украина

Представлены результаты экспериментов по доказательству переноса генетического материала между клетками млекопитающих, подтвердившие наличие такого переноса с экспрессией маркерных генов в клетках-реципиентах. Процесс проходил в обычных физиологических условиях без каких бы то ни было посторонних воздействий. Такой характер переноса позволяет считать его нормальным процессом, а обмен генетическим материалом между клетками млекопитающих — одной из составляющих межклеточных взаимодействий.

Ключевые слова: спонтанная трансформация, клетки млекопитающих, перенос ДНК, маркированные линии.

В клеточных сообществах всех уровней — от культур клеток до организма — практически всегда при использовании адекватных методов исследований тестируется различная по размерам внеклеточная ДНК [1, 2].

Ее количество, определяемое разными авторами, колеблется в очень широких пределах [3, 7]. Происхождение этой ДНК может быть разное — от остатков погибших клеток до вновь синтезируемой и прижизненно выводимой из нормальных жизнеспособных клеток [1, 8].

Такая внеклеточная ДНК, по крайней мере частично, поглощается клетками, не относящимися к «мусорщикам» (к которым принадлежат специализированные клетки, например, макрофаги, одной из функций которых является очистка организма от циркулирующих в нем ненужных продуктов) [9—13].

Поглощение клетками внеклеточной ДНК может осуществляться разными путями, в том числе и по специализированному рецептор-опосредованному механизму [14]. Способность клеток поглощать ДНК (без носителей) детально анализировали в некоторых работах в связи с проблемой генной

вакцинации. Было показано, что «голая» ДНК эффективно поглощается многими клетками организма [15—21]. Наконец, в сообщениях разных авторов убедительно доказано, что внеклеточная ДНК (как апоптического, так и прижизненного выделения) после поглощения ее нормальными клетками разного происхождения и в культуре, и в организме способна включаться в геном реципиента и функционировать в нем [8, 22].

Особо следует подчеркнуть, что во всех подобных работах исследовали естественные процессы, а не искусственную трансформацию (при которой вводимая извне ДНК находится на различных носителях — поликатионах, отрицательно заряженных липосомах, «одетая» в капсиды вирусных белков и т. д.). Фактически, сегодня выделение ДНК из клеток, ее циркуляция во внеклеточном пространстве (как в культурах, так и в интактных организмах), поглощение клетками, интернализация и функционирование не вызывают ни возражений, ни сомнений. Однако уровень такого функционирования и смысл самой циркуляции (как естественного процесса) остаются непонятными. Для выяснения этого нами проделаны серии экспериментов, первая из которых и является содержанием настоящей публикации.

Материалы и методы. Клетки. В работе использовали две линии клеток (СНО-K1 и L-M), полученные из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург).

Л и н и я СНО-K1 (клон линии СНО, выделенный из яичников китайского хомячка). Клетки этой линии являются эпителиеподобными и субстратзависимыми. Нами получена сублиния с генотипом СНО-K1, pro^- , neo^R , gfp^+ . Указанным клеткам присущи такие свойства: они ауксотрофны по пролину, устойчивы к антибиотику G-418, обладают флуоресценцией в зеленой части спектра. Растут на питательной среде, состоящей из 90 % среды F10 («Sigma», США) и 10 % эмбриональной телячьей сыворотки («Вектор», Украина).

Л и н и я L-M (TK⁻, APRT⁻) (штамм линии NTCT L929, полученной из соединительной ткани мышей линии СЗН), дефектна по тимидинкиназе и аденинфосфорилтрансферазе, а также устойчива к 5-бромдезоксипуридину и 8-азаденину. Клетки фибробластоподобные, культивируются в ростовой среде DMEM («Sigma») с 10 % эмбриональной телячьей сыворотки («Вектор»).

К питательным средам для обеих линий добавляли 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мг/мл стрептомицина. При пересеве клетки снимали с поверхности стекла или пластика 0,25 %-м раствором трипсина и 0,02 %-м раствором Версена в соотношении 1:1.

Клетки культивировали при температуре 37 °С в атмосфере, содержащей 5 % CO₂.

Эмбриональные клетки получали из печени 16—17-дневных эмбрионов мыши линии ICR по разработанной нами методике.

Результаты и обсуждение. Исходным постулатом, закладываемым в идеологию экспериментов, служило предположение о том, что циркуляция ДНК (как в культуре клеток, так и в организме) является проявлением постоянно (и нормально) идущего обмена генетическим материалом [22]. Сам же такой обмен может происходить по различным каналам, из которых выделение ДНК из клеток и ее поглощение извне являются лишь одним из таких механизмов (возможно, даже далеко не самым эффективным). Поэтому основополагающей особенностью данного процесса должно быть максимально естественное взаимодействие клеток, а не искусственно организуемая трансформация с использованием воздействий (электропора-

ция, хлоркальциевый преципитат, поликатионы и катионные липиды и т. д.), нарушающих нормальное состояние и мембран, и клеточных взаимодействий, и внутриклеточных процессов. Для экспериментальной проверки настоящего предположения была сконструирована специальная система из двух разноклеточных партнеров. В качестве одного из них использовали особо маркированную сублинию, прототипом которой явилась линия СНО-K1.

Особенность маркировки состояла в сочетании селективных и визуальных маркеров. Получение такой линии и ее свойства описаны в нашей предыдущей работе [21].

В первой серии экспериментов применяли лишь часть введенных маркеров. Для подтверждения того, что результаты не являются следствием особых свойств СНО-K1, использовали также маркированную линию L-M (исходные линии L-M и СНО-K1 получены из Российской коллекции клеточных культур).

Вторым партнером были клетки печени 16—17-дневных эмбрионов мыши линии ICR. Основанием для выбора именно этих клеток послужил очень высокий уровень в них всех процессов метаболизма.

Сублиния СНО-K1 имела генотип СНО pro^- , neo^R , gfp^+ (по выбранным маркерам). Соответственно культура не росла на среде без пролина, была устойчива к G-418 и флуоресцировала зеленым светом в области 525 нм при облучении синего-голубым светом с длиной волны 470 нм.

Генотип (по тем же маркерам) клеток эмбриональной печени мыши был соответственно pro^+ , neo^S , gfp^- . Они могли расти без свободного пролина, были чувствительны к G-418 и не обладали зеленой флуоресценцией.

Теоретически возможными являются различные сочетания маркеров при их переносах с последующим получением и селекцией трансформантов. Для четкости результатов в данной серии экспериментов мы остановились на самой очевидной комбинации у ожидаемых трансформантов, а именно — pro^+ , neo^R , gfp^+ . Ни клетки эмбриональной печени, ни клетки сублинии СНО-K1 не могли расти на среде без пролина в присутствии G-418 и люминесцировать. Такой рост ожидался только у клеток, в которых имелись маркеры от обоих партнеров. Принципиальная схема постановки одного из таких опытов представлена на рис. 1, а на рис. 2 визуализированы результаты вариантов такого опыта.

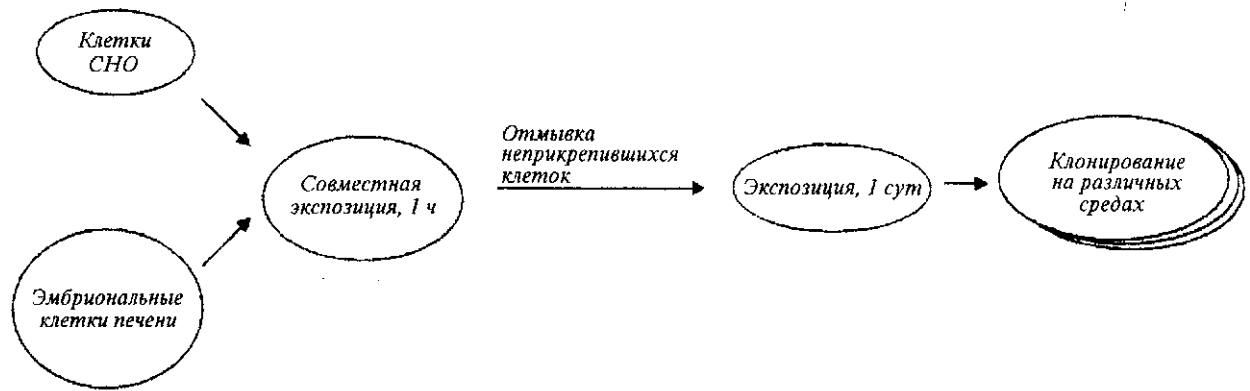


Рис. 1. Принципиальная схема постановки опыта по межклеточному переносу генетической информации

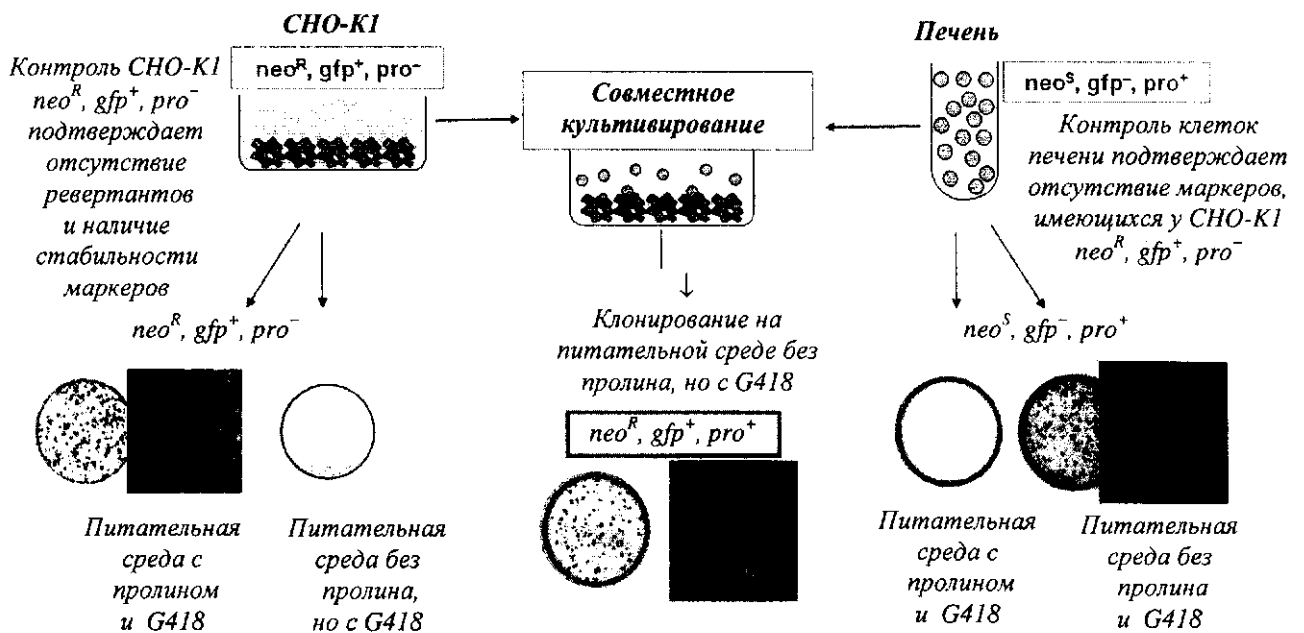


Рис. 2. Визуализированные результаты одного из опытов по межклеточному переносу генетической информации

Эмбриональные клетки печени мыши наслаивали на монослой клеток CHO-K1, pro^- , neo^R , gfp^+ или L-M (TK⁻, APRT⁻) через 24—48 ч после посева их на чашки Петри. Время контакта клеток составляло 1 ч. Затем неприкрепившиеся эмбриональные клетки смывали питательной средой без сыворотки, а оставшиеся — заливали средой для роста.

Через 24 ч эти клетки рассевали на различные селективные среды. После образования колоний часть их окрашивали метиленовым синим (2 %-й водный раствор) и производили учет. А часть колоний просматривали в люминесцентном микроскопе для выявления флуоресценции клеток в зеленой части спектра (длина волны 525 нм) при

облучении сине-голубым светом с длиной волны 470 нм.

Принципиальной особенностью результатов всех независимых экспериментов таких опытов (в общей сложности их проведено более 10) являлась исключительно высокая эффективность переноса маркеров. Она многократно превосходит таковую в обычных опытах по искусственной трансформации экзогенной ДНК и колеблется в разных независимых экспериментах на уровне нескольких десятков процентов от количества жизнеспособных клеток CHO-K1. Данные одного из таких экспериментов приведены в таблице. Результат опыта зависел от полноценного состояния клеток. Если же само сме-

Результаты одного из независимых опытов по межклеточному переносу генетической информации

Вариант опыта	Количество посеянных клеток	Питательная среда с пролином и G-418		Питательная среда без пролина, но с G-418	
		Абсолютное число выросших колоний	Эффективность клонирования, %	Абсолютное число выросших колоний	Эффективность клонирования, %
СНО-K1 (neo ^R , gfp ⁺ , pro ⁻)	400	361	90,25	0	0
Клетки печени (neo ^S , gfp ⁻ , pro ⁺)	4000	0	0	0	0
СНО-K1 (neo ^R , gfp ⁺ , pro ⁻) (neo ^S , gfp ⁻ , pro ⁺) (экспозиция в течение 1 сут)	400	370	92,5	83	20,8

шивание партнеров происходило в присутствии G-418 на среде без пролина (т. е. в условиях, отрицательно влияющих на обоих партнеров, в момент, когда отсутствовал даже контакт клеток) эффекта не было. Действие переноса маркеров носило стабильный (а не транзиторный) характер. При повторных посевах нескольких произвольно выросших колоний на среде с G-418 без пролина все они давали в последующих пассажах полноценный рост. Такова феноменология. Что касается механизмов данного процесса и его особенностей, то это требует дополнительных исследований, составляющих предмет последующих серий экспериментов.

V. A. Kordium, S. P. Shpilevaya, T. A. Ruban, O. M. Sukhorada, V. I. Andriyenko

Autotransformation of mammalian cells

Summary

The experiments to prove genetic material transfer between mammalian cells have been planned and performed. They show the existence of such transfer with subsequent expression of the marker genes in the recipient cells. The transfer takes place in physiological conditions without any outside influence. This gives the possibility to consider such transfer as a normal process, and the exchange of genetic material between mammalian cells as one of the components of the intercellular interactions.

Key words: spontaneous transformation, mammalian cells, transfer of DNA, marked lines

V. A. Кордюм, С. П. Шпильова, Т. А. Рубан, О. М. Сухорада, В. І. Андрієнко

Автотрансформація клітин ссавців

Резюме

Представлено результати експериментів з доказу переносу генетичного матеріалу між клітинами ссавців, які підтвердили наявність такого переносу з експресією маркерних генів у клітинах-реципієнтах. Процес проходив за звичайних фізіологічних умов без будь-яких сторонніх впливів. Такий характер переносу дозволяє вважати його нормальним процесом, а обмін генетичним матеріалом між клітинами ссавців — однією зі складових міжклітинних взаємодій.

Ключові слова: спонтанна трансформація, клітини ссавців, перенос ДНК, марковані лінії.

ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Липская Л., Житкович А., Васюхин В., Цветков А., Сальников К. Участие эндонуклеазы в образовании экстрахромосомальной ДНК и возможные механизмы возникновения амплификации генов // Цитология.—1993.—35, № 1.—С. 70—78
2. Anker P., Stroun M., Maurice P. A. Spontaneous release of DNA by human blood lymphocytes shown *in vitro* system // Cancer Res.—1975.—35.—P. 2375—2382.
3. Stroun M., Anker P., Maurice P. A., Gahan P. B. Circulating nucleic acids in higher organisms // Int. Rev. Cytol.—1977.—51.—P. 1—48.
4. Stroun M., Anker P., Lyantey J., Lederrey C., Maurice P. A. Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients // Eur. J. Cancer Clin. Oncol.—1987.—23.—P. 707—712.
5. Федоров Н. А., Янева К. С. Экскреция ДНК лимфоцитами человека // Успехи соврем. биологии.—1982.—93, № 2.—С. 171—182.
6. Казаков В. И., Божков В. М., Линде В. А., Репина М. А., Михайлов В. М. Внеклеточная ДНК в крови беременных женщин // Цитология.—1995.—37, № 3.—С. 232—236.
7. Владимиров В. Г., Шерлина С. С. Влияние различающихся по своей природе экстремальных факторов на распределение повторяющихся последовательностей во внеклеточной ДНК // Радиационная биология. Радиоэкология.—2002.—42, № 6.—С. 754—758.
8. Bergsmedh A., Szeles A., Henriksson M., Bratt A., Folkman M. J., Spetz A.-L., Holmgren L. Horizontal transfer of oncogenes by uptake of apoptotic bodies // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—2001.—98, N 11.—P. 6407—6411.
9. Bennett R. M., Gabor G. T., Merritt M. M. DNA binding to human leucocytes // J. Clin. Invest.—1985.—76, N 12.—P. 2182—2190.
10. Woodruff E., Abdalla R., Daniel M. Hepatic binding of DNA is mediated by a receptor on nonparenchymal cells // Amer. J. Pathol.—1988.—133.—P. 54—60.
11. Loke S. L., Stein C. A., Zhang X. H., Mori K., Nakanishi M., Subasinghe C., Cohen J. S., Neckers L. M. Characterization of oligonucleotide transport into living cells // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1989.—86.—P. 3474—3478.
12. Takagi T., Hashiguchi M., Mahato R. J., Takuda H., Takakura Y. Involvement of specific mechanism in plasmid DNA uptake by mouse peritoneal macrophages // Biochem. and Biophys. Res. Commun.—1998.—245.—P. 729—733.
13. Al-Mousa S., Nicholls P. J., Gumbleton M. Evidence for the role of caveolae in gene delivery // J. Pharm. and Pharmacol.—1999.—51.—P. 178—183.
14. Siess D., Vedder C. T., Merckens L., Tanaka T., Freed A., McCay S., Heinrich M., Deffebach M., Bennett R., Hereneider

- S. A human gene coding for a membrane-associated nucleic acid-binding protein // *J. Biol. Chem.*—2000.—275, N 43.—P. 33655—33662.
15. Li X., Sambhara S., Li C. X., Ewasyshyn M., Parrington M., Caterini J., James O., Cates G., Du R.-P., Klein M. Protection against respiratory syncytial virus infection by DNA immunization // *J. Exp. Med.*—1998.—188, N 4.—P. 681—688.
16. Triyatni M., Jilbert A. T., Qiao, Miller D. S., Burrell C. J. Protective efficacy of DNA vaccines against duck hepatitis B virus infection // *J. Virol.*—1998.—72, N 1.—P. 84—94.
17. Tiollais P., Michel M.-L. La vaccination genetique. Perspectives pour la prevention et le traitement de l'hepatite B // *C. r. Acad. Sci. Ser. 3.*—1999.—322, N 11.—P. 979—981.
18. Weiner D. B., Kennedy R. C. Genetic vaccines: Vaccines crafted from genetic material might one day prevent AIDS, malaria and other devastating infections that defy current immunization technologies. They may even help treat cancers // *Sci. Amer.*—1999.—281, N 1.—P. 34—41.
19. Gurunathan S., Klinman D. M., Seder R. A. DNA vaccines: Immunology, application, and optimization // *Annu. Rev. Immunol.*—2000.—18.—P. 927—974.
20. Ishii K. J., Suzuki K., Coban C., Takeshita F., Itoh Y., Matoba H., Kohn L. D., Klinman D. M. Genomic DNA released by dying cells induced the maturation of APCs1'2 // *J. Immunol.*—2001.—167.—P. 2602—2607.
21. Кордюм В. А., Топорова Е. К., Окунев О. В., Похолоенко Я. А., Сухорада Е. М., Рубан Т. А., Андриенко В. И., Иродов Д. М. Новая множественно маркированная линия клеток — производная от CHO-K1 // *Биополимери і клітина.*—2003.—19, № 3.—С. 252—256.
22. Кордюм В. А. Наша «шагренивая кожа» — это наша проблема. Нам ее и решать. 3. Недостающее звено // *Биополимери і клітина.*—2003.—19, № 6.—С. 473—492.

УДК 87.086.8

Надійшла до редакції 09.03.04