

ПЕРЕНОС ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ГЕНОВ В КЛЕТКИ ЭУКАРИОТ С ПОМОЩЬЮ НЕЙТРАЛЬНЫХ ФОСФОЛИПИДНЫХ ЛИПОСОМ

Р. И. ЖДАНОВ, О. А. БУНЕЕВА, О. В. ПОДОБЕД, Н. Г. КУЦЕНКО, Т. А. ЦВЕТКОВА, Т. П. ЛАВРЕНОВА

Институт биомедицинской химии РАН, г. Москва, 119832 Россия

Впервые осуществлена трансфекция полинуклеотидметалло(II)-липосомными комплексами на основе нейтральных липосом, содержащих глицирризиновую кислоту или α -токофероловый эфир янтарной кислоты в эукариотические клетки линии L929. Эффективность трансфекции составляла 30 — 50% от эффективности трансфекции, проведенной с использованием преципитата фосфата кальция.

Ключевые слова: нейтральные липосомы, глицирризиновая кислота, клетки эукариот, липофекция.

Введение. Трансфекция ДНК в клетки с помощью катионных липосом (липофекция) — один из наиболее распространенных методов переноса генетического материала в эукариотические клетки в целях генной терапии [1 — 3]. Известно, что стабильные комплексы с ДНК образуют не только катионные липосомы, но и нейтральные липосомы в присутствии катионов двухвалентных металлов [4, 5]. Такие полинуклеотид-металло-липосомные комплексы можно использовать для доставки генетического материала в клетки и ткани эукариот [6, 7]. Эффективность трансфекции и экспрессии трансгена зависит от ряда параметров, в частности, цитотоксичности липидов, образующих липосомы, типа трансфецируемых клеток, количества используемой ДНК, весового соотношения ДНК: липосомы, концентрации липосом, времени инкубации и т. д. [2, 3]. Принимая во внимание возможное участие экстрацеллюлярных гликопротеидов и гликолипидов в процессах взаимного “узнавания” и взаимодействия клеток [8, 9], можно предположить, что включение в состав липосом гликозидов или гликолипидов обеспечит их большее сродство к клеточной мембране и тем самым увеличит эффективность трансфекции.

Задача настоящей работы — получение эффективной трансфекции функциональных генов (плазмидной ДНК) в культивируемые эукариотические клетки с помощью некаатионных (нейтральных) липосом, содержащих глицирризиновую кислоту (ГК) или моно- α -токофероловый эфир янтарной кислоты (ЯТ) в качестве факторов слияния (фьюзогенов).

Методика. В работе использованы следующие материалы: диметилсульфоксид, глутатион, а также CaCl_2 квалификации “для культуры ткани”, L- α -фосфатидилхолин, трис. HCl, Hepes, диметилформамид, MgCl_2 , 5-бromo-4-хлоро-3-индолил-b-D-галактопиранозид (X-GAL) (Sigma), K_2HPO_4 глутаровый альдегид (Serva), глицирризиновая кислота (натриевая соль) (Институт органической химии Уфимского научного центра РАН г. Уфа), эмбриональная телячья сыворотка (ЭТС) (НПК “Биохим”, Казань), среда DMEM (HyClone Lab., Inc), версен, раствор Хенкса (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов, Москва), гентамицин (Московское предприятие по производству бактериальных препаратов), химопсин (Завод медицинских препаратов, Санкт-Петербург), ферратианид и ферроцианид калия, формальдегид (Реахим, РФ). 2 x Hepes-буферно-солевой раствор (HeBS) был приготовлен

согласно [10]. Раствор ТЕ: 100 мМ трис HCl (pH 7,4), 1 мМ ЭДТА. Все растворы и среды готовили на автоклавированной деионизованной воде и стерилизовали, используя нитроцеллюлозные фильтры фирмы Millipore (0,22 - мкм).

Липосомы формировали из смеси, содержащей яичный фосфатидилхолин и фактор слияния (9:1, мол.%), готовили методом упаривания из обращенной фазы [11, 12], использовали в течение 2 — 3 недель после получения и хранили под азотом при +4°C.

В работе были использованы плазмиды с репорерными генами β -галактозидазы (pQE-LacZ) и щелочной фосфатазы (pCSEAP). Получение и очистку плазмидной ДНК проводили согласно [13, 12].

Монослойная культура фибробластоподобных клеток фибросаркомы мышей - линия L-929 была получена из Института медицинской генетики РАМН. Клетки культивировали в среде DMEM, содержащей 10% ЭТС, 50 мкг/мл гентамицина, 20 мМ HEPES при 37°C (5% CO₂).

Для проведения опытов по трансфекции клетки пассировали на пластиковые чашки Петри диаметром 3,5 см (500 тысяч клеток на чашку). Перед формированием нуклеолипосомных комплексов липосомы встряхивали на шейкере "Vortex" в течение 2 — 3 минут. Смешивали плазмидную ДНК с липосомами в весовом соотношении 1:10, добавляли раствор до конечной концентрации 50 мМ. Суммарный объем раствора полинуклеотид-металло(П)-липосомного комплекса составлял 50 мкл. Липофекцию осуществляли по методу [10] через 20 — 30 минут после образования комплекса [12]. Клеточный монослой промывали средой без сыворотки и к клеткам добавляли бессывороточную среду, содержащую ДНК-липосомный комплекс. Клетки инкубировали в течение 5 часов при 37°C (5% CO₂), затем добавляли среду DMEM с сывороткой (конечная концентрация сыворотки 10%) и продолжали инкубацию еще 48 часов при трансфекции с pQE-LacZ и 5 суток — при трансфекции с pCSEAP. Трансфекцию с использованием преципитата фосфата кальция — ДНК осуществляли по методу [10]. Суспензию преципитата фосфата кальция ДНК готовили за 30 минут до проведения трансфекции. Для приготовления одной пробы смешивали 10 мкл ДНК (1 мкг/мл) с 125 мкл 0.1 ТЕ и 15 мкл 2.5 М CaCl₂. Смесь инкубировали при комнатной температуре 15 мин и по каплям добавляли к 150 мкл HeBS. После удаления ростовой среды и промывания клеток DMEM на клеточный монослой равномерно по каплям наносили суспензию кальций-фосфатного преципитата ДНК и оставляли на 4 часа при 37°C (5% CO₂). Затем удаляли суспензию, промывали DMEM, добавляли 25% демитилсульфоксид в DMEM, инкубировали 3 минуты при комнатной температуре, после чего промывали клетки 2 — 3 раза и инкубировали в ростовой среде при 37°C (5% CO₂) в течение 48 — 72 часов. В контрольных экспериментах клетки инкубировали в тех же условиях, но без добавления нукле-липосомных комплексов или преципитата фосфат кальция-ДНК.

Для тестирования экспрессии гена β -галактозидазы в клетках использовали метод цветной индигогенной реакции [10]. Клеточный монослой промывали средой Хэнкса и фиксировали в течение 4 мин при 4°C раствором, содержащим 0,25% глutarового альдегида; 2% формальдегида; 0,02 PBS, pH 7,4. Затем вновь промывали средой Хэнкса, добавляли окрашивающий раствор (5 мМ феррицианид калия, 2 мМ MgCl₂, 0,2% X-gal, 0,02 М PBS), приготовленный непосредственно перед употреблением, и инкубировали при 37°C. Через 12—36 ч окрашивающий раствор удаляли, клетки промывали PBS и подсчитывали под микроскопом процент окрашенных в голубой цвет клеток.

Тестирование экспрессии гена щелочной фосфатазы (плазмида pCSEAP) проводили колориметрическим методом, используя в качестве субстрата для ферментативной реакции 4-нитрофенилфосфат бис(2-амино-2-этил 1,3 - пропандиол). Для этого через 5 дней инкубации клеток с плазмидой аликвоты кондиционированной среды, предварительно прогретые при 65°C в течение 10 мин (для инактивации фосфатазы, содержащейся в сыворотке культуральной среды), помещали в 96-луночные плашки, содержащие 0,5М карбонатный буфер pH 9,8 и 20 mM субстрата. Измеряли оптическую плотность при 405 нм непосредственно после добавления субстрата и через 24 часа инкубации среды с субстратом при 37°C. Эффективность трансфекции выражали в условных единицах (УЕ) активности щелочной фосфатазы. За единицу УЕ принята активность щелочной фосфатазы, при которой за 24 часа инкубации оптическая плотность увеличивается на 0,100 ед. ОД при 405 нм.

Результаты и обсуждение. Ранее нами было показано, что в присутствии высоких концентраций ионов двухвалентных металлов и двухспиральных нуклеиновых кислот происходит слияние фосфолипидных везикул [5 — 7], при этом нуклеиновая кислота оказывается защищенной от действия различных факторов: флуоресцентных красителей, ферментов типа топоизомеразы I, ДНКазы и др. [5]. Липосомы в этих условиях могут образовывать вдоль ДНК трубчатые бислойные структуры с гексагональной симметрией [14, 15]. Такие полинуклеотид-металло(II)-липосомные комплексы, вероятно, перспективны при создании липосомальных векторов для трансфекции генетического материала в эукариотические клетки. Положительный результат уже был получен при прямых инъекциях таких комплексов с плазмидой pQE-LacZ в мышцы мыши [7]. В данной работе нейтральные фосфолипидные везикулы были впервые использованы для трансфекции чужеродного генетического материала — генов β -галактозидазы (LacZ) и щелочной фосфатазы (SEAP) в клетки эукариот *in vitro*.

Для получения эффективной трансфекции с нейтральными липосомами мы использовали некатионные липосомы, содержащие в липидной композиции не холестерин, а факторы слияния — глицирризиновую кислоту (ГК) или моно- α -токофероловый эфир янтарной кислоты (ЯТ). Известно, что природный гликозид ГК широко используется для модификации эффектов фосфолипидов, а эфир ЯТ — является аналогом фактора слияния — монохолестеринового эфира янтарной кислоты, используемого в настоящее время в работах по липофекции [2].

Эффективность липофекции оценивали по экспрессии трансгена, определяя концентрацию продуктов расщепления специфического субстрата ферментом, образуемым в результате экспрессии функционального гена, и сравнивали с эффективностью трансфекции этого функционального гена в эти же клетки классическим методом — методом кальций-фосфатной преципитации. В таблице приведены результаты трансфекции плазмидных ДНК (pQE-LacZ и pCSEAP) в эукариотические клетки с помощью их комплексов с нейтральными фосфолипидными липосомами и ионами кальция в сравнении с кальций-фосфатным методом.

Эффективность трансфекции pQE-LacZ (количество окрашенных клеток в % от всех клеток на плашке), с помощью полинуклеотид-металло(II)-липосомных комплексов на основе нейтральных липосом, содержащих ГК, составляла 0,5%, в то время как в случае фосфатидилхолин-холестериновых липосом трансфекция в те же клетки не удалась. Эффективность трансфекции pQE-LacZ кальций-фосфатным методом составила 1%. Эффективность трансфекции pCSEAP с помощью полинуклеотид-металло(II)-липосомных комплексов на основе нейтральных липосом, содержащих ГК, составляла 0,48 УЕ, а содержащих ЯТ — 0,81 УЕ, что составляет 23 и 39%

соответственно от эффективности трансфекции этого гена в те же клетки с помощью кальций-фосфатного метода (см. таблицу).

Таблица

Эффективность трансфекции плазмид pQE-LacZ и pCSEAP в клетки L929
* (Условия см. в разделе Методика)

Плазмида	pQE-LacZ		pCSEAP	
Метод трансфекции	% окрашенных клеток	% к Са-р	НУ/млн. кл.	% к Са-р
Кальций-фосфатный метод	1	100	2,1	100
Липосомы ГК без ионов Са	0	-	0	-
Липосомы ГК + ионы Са	0,5	50	0,48	23
Липосомы ЯТ + ионы Са	**	**	0,81	39

* — приведенные данные являются результатом 3 — 4 серий экспериментов

** — опыт не проводили

Принципиальным является тот факт, что использование плазмиды и тех же липосом, но без ионов кальция (50 mM), не приводило к трансфекции.

Таким образом, в настоящей работе впервые получена трансфекция функциональных генов в комплексе с нейтральными фосфолипидными липосомами, содержащими факторы слияния, в клетки эукариот.

Авторы выражают глубокую благодарность Б. Ю. Абакумовой и А. С. Борисенко за полезные советы и обсуждение и А. И. Петрову — за образец моно- α -токоферолового эфира янтарной кислоты.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Felgner P. L., Gadek T. R., and Holm M.* // Proc. Natl. Acad. Sci., 1987. V. 84. P. 7413 — 7417.
2. *Duzgunes N., Felgner P. L.* // Meth. Enzymol., 1993. V. 221. P. 303 — 306.
3. *Жданов Р. И., Куценко Н. Г., Федченко В. И.* // Вопросы мед. химии, 1997. Т. 43. No1, С. 3 — 11.
4. *Zhdanov R. I., Kuvichkin V. V.*, New Developments in Lipid-protein Interactions and Receptor function // J.-A. Gustaffson and K. W. A. Wirtz, eds. N. Y.: Plenum Press 1993. P. 249 — 262.
5. *Venanzi F. M., Zhdanov R. I., Petrelli C., Moretti P., Amici A., Petrelli F.* // Abstract book of Int. Conference "Liposomes in Drug Delivery. The Nineties and Beyond" — 1993 — London, U. K. — P. 122.
6. *Kovalenko D. V., Borisenko A. S., Fedchenko V. I., Petrov A. I., Zhdanov R. I., Kuvichkin V. V., Arslan A.* // Karadeniz J. Med. Sci., 1996. V. 8. P. 209.

7. Коваленко Д. В., Шафеев Р. А., Зеленина И. А., Семенова М. Л., Самуилова О. В., Жданов Р. И. // Генетика, 1996, No9, С. 1299 — 1301.
8. Bovin N.V., Gabius H.J. // Chemical Society Reviews, — 1995 — P. 413 — 421.
9. Vodovosova E., Gayenko G., Rasinkov V., Korchagina E., Bovin N., Molotkovsky J. // 1997 (в печати) J. Biorg. Chem.
10. Liposome-mediated transfection. Transient expression using liposomes // In: Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman I. G., Smith J. A., Struhl K. Current Protocols in Molecular Biology, 1991: N. Y., J. Wiley & Sons Press, Supplement 17, Unit 9.4.1.
11. G. Gregoriadis, ed. // Liposome Technology, CRC Press — 1985 — Vol. 1. — Ch. 3.
12. Жданов Р.И., Лавренова Т. П., Бунеева О. А., Цветкова Т. А., Серебренникова Г. А., Константинова Р. Д., Маслов М. А. // Вопр. мед. химии, 1997, Т. 43.
13. Маниатис Т. "Молекулярное клонирование", М., Мир, 1984, С. 98 — 106.
14. Gershon H., Ghirlando R., Guttman S., Minsky A. // Biochemistry. -1993 -Vol. 2. -P. 7143 — 7151.
15. Tarahovskiy Y.S., Khusainova R. S., Gorelov A. V., Nicolaev T. I., Deev A. A., Dawson A. K., Ivanitsky G. R. // FEBS Let. -1996 -Vol. 390 -P. 133 — 136.

GENE TRANSFER INTO EUKARYOTIC CELLS USING NON-CATIONIC (NEUTRAL) LIPOSOMES

R. I. Zhdanov, O. V. Podobed, O. A. Buneeva, N. G. Kutsenko, T. A. Tsvetkova and T. P. Lavrenova

Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences,
Moscow, 119832, Russia

Transfection of plasmid DNAs containing β -galactosidase gene (pQE-LacZ) or alkaline phosphatase (pCSEAP) into L929 cell line using was studied. The complexes between plasmid DNA and liposomes containing Ca ions and glycyrrhizic acid or α -tocopherol caused successful transfection of functional genes into L929 cells. The efficiency of transfection of plasmid DNAs into L929 cells using polynucleotide-metallo(II)-liposome complexes were 30 — 50% from the efficiency value of calcium phosphate coprecipitation transfection.

Key words: neutral liposomes, eucaryotic cells, lipofection, glycyrrhizic acid.