

УДК 612.1.577.617.96

© Коллектив авторов

ТРАНСФЕКЦИЯ ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК ГЕНОМ ЦИТОХРОМА СУР450 2В6: ПОЯВЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К ЦИКЛОФОСФАМИДУ.

*С.Н. Коломейчук^{1,2}, О.Ю. Абакумова¹, М.А. Маслов², Е.А. Калашикова³,
Н.Г. Морозова², Г.А. Серебренникова², В.И. Швеиц², Н.Н. Соколов¹*

¹ГУ НИИ БМХ РАМН, 119121 Москва, Погодинская ул., 10;
тел./факс: (095) 245-05-09; 245-08-57; эл. почта: sokolov@ibmh.msk.su

²Московская Государственная академия тонкой химической
технологии им. М.В. Ломоносова, 117571 Москва, пр. Вернадского, 86

³ГУ Медико-генетический научный центр РАМН,
115478 Москва, ул. Москворечье, 1

Исследована чувствительность к циклофосфамиду клеток эпителия почки человека линии 293 после их трансфекции геном цитохрома Р450. Трансфекцию проводили комплексами ДНК с катионными липосомами, полученными из смеси липидов и холестерина в различных молярных соотношениях. Протокол эксперимента включал трансфекцию клеток почки человека комплексами ДНК-липосомы, селекцию клонов в среде с антибиотиком Geneticin G418, наращивание отобранных клонов и их обработку циклофосфамидом выживших клонов, а также оценку цитотоксического эффекта препарата. Показано, что добавление 0,25 мМ циклофосфамида вызывает гибель 40-45% трансфицированных клеток.

Ключевые слова: цитохром Р450 2 В6, трансфекция, циклофосфамид, катионные липиды, катионные липосомы, генотерапия.

ВВЕДЕНИЕ. В генотерапии злокачественных новообразований можно выделить 4 основных направления, широко применяемых в клинике: использование антисмысловых олигонуклеотидов и рибозимов, опухолевые "вакцины", введение генов-супрессоров опухолей и применение генов "суицида" [1].

Гены "суицида" в трансфицированных клетках экспрессируют ферменты, превращающие малотоксичные лекарственные препараты в высоко активные цитотоксические метаболиты непосредственно в опухоли. Известно, что эти гены либо отсутствуют в клетках опухолей млекопитающих (как, например, ген тимидинкиназы вируса простого герпеса), либо уровень их экспрессии невысок, что характерно для генов цитохрома человека и животных. Это обстоятельство свидетельствует об актуальности данного подхода. Опухолевые клетки, трансфицированные генами "суицида", становятся чувствительными к противоопухолевым лекарствам, требующим для проявления своей токсичности метаболической активации [2,3]. Для достижения подобного эффекта методами

Список сокращений: АСМ - атомно-силовая микроскопия, ИФА - ифосфамид, КЛ - катионные липосомы, КЛИП - катионный липид, Хол - холестерин, ЦФА - циклофосфамид, ЭТС - эмбриональная телячья сыворотка.

ТРАНСФЕКЦИЯ КЛЕТОК ГЕНОМ ЦИТОХРОМА СУР450 2В6

традиционной химиотерапии требуются большие дозы препаратов, что неизбежно вызывает множество нежелательных побочных реакций. Вторым преимуществом применения данной стратегии является то, что трансфицированные клетки, активируя лекарственный препарат, создают высокие локальные концентрации метаболитов, способных проникать в окружающие клетки, не содержащие гена "суицида" и поражать их. Это явление получило название "эффекта присутствия" ("bystander effect"). Как было показано на животных моделях, "эффект присутствия" позволяет получить ремиссию опухоли даже при 10%-ной эффективности трансфекции клеток-мишеней [4].

Ранее нами была сконструирована и охарактеризована плаزمид, экспрессирующая рекомбинантный каталитически активный цитохром человека СУР450 2В6 [5]. Данную конструкцию мы предполагали ввести в клетки и оценить их чувствительность к циклофосфамиду.

Целью данной работы являлась разработка стратегии комбинированной терапии опухолей человека с помощью гена цитохрома СУР450 2В6 и циклофосфамида *in vitro*.

МЕТОДИКА. В работе использовали ламинар фирмы "Flow Lab" (Великобритания), СО₂-инкубатор "Flow Lab" (Великобритания), мультискан "Bio-Tek Instruments" (США), пластик, плашки и фильтры фирмы "Nalge Nunc International" (Дания), среды, антибиотики и сыворотки фирмы "ПанЭко" (Россия), краситель Кристалл фиолет ("Sigma", США), антибиотик Geneticin G418 ("ICN", США).

Определение цито- и генотоксичности катионных липидов. Поскольку мы предполагали использовать в нашей работе невирусную систему доставки генетического материала в клетки, то в качестве такого носителя были выбраны катионные липосомы. Катионные липиды для получения липосом выбирали из 10 соединений, синтезированных и охарактеризованных в лаборатории Г.А. Серебрянниковой (МИТХТ, каф. химии и технологии тонкого органического синтеза) [6]. Для катионных липидов использовали два теста: на цитотоксичность (МТТ-тест) и генотоксичность.

Опыты проводили на линии клеток невриномы гассерова узла крысы НГУК1, культивируемых при 37°C в среде RPMI-1640 без фенолового красного в присутствии 10% ЭТС и антибиотика гентамицина (40 мкг/мл) в 48-луночных планшетах. При пассировании клеток в каждую лунку вносили 45×10^3 клеток в 0,3 мл культуральной среды.

К клеткам в состоянии плотного монослоя добавляли катионные липиды в концентрациях 5 и 10 мкг/мл (согласно литературным данным [7]) и культивировали еще 24 часа.

Цитотоксичность катионных липидов (МТТ-тест). Через 24 часа культивирования клетки инкубировали с 0,15 мл 0,5%-ного раствора МТТ в течение 4 часов, затем добавляли 0,3 мл 25%-ного раствора ДДС-На и оставляли на 24 часа при 37°C. Измерение проводили при длине волны $\lambda = 530$ нм.

Генотоксичность катионных липидов. Генотоксичность катионных липидов также исследовали на клетках НГУК1. Интенсивность синтеза ДНК оценивали по включению ¹⁴С-тимидина (1,5 мкКи/мл, "Изотоп", Россия), добавленного к культуральной среде через 20 час. после внесения исследуемых препаратов, после чего клетки культивировали в течение 5 ч [8]. Опыт останавливали промывкой клеточного монослоя ледяным раствором Эрла. Затем фиксировали клеточный монослой ледяной смесью этанол:уксусная к-та (9:1). Клетки окрашивали 0,2%-ным кристалл-фиолетом в 2 %-ном этаноле. После отмывки водой не связавшегося красителя проводили элюцию 10%-ной уксусной кислотой. Оптическое поглощение раствора (E) измеряли при длине волны $\lambda = 540$ нм. Количество клеток рассчитывали, исходя из следующей пропорции: $E_{540} = 0,1$ соответствует $32,5 \times 10^3$ клеток НГУК1. Стандартную радиометрию с использованием жидкости Брея [9] проводили после лизиса клеток 0,6 N КОН. Полученные результаты выражали в имп/мин $\times 10^6$ клеток.

Получение катионных липосом. Липосомы, состоящие из катионных липидов и холестерина (Хол), получали по методу, описанным в работе [10]. Модификация метода заключалась во введении 5 циклов замораживания-оттаивания суспензии липосом и их экструзию через поликарбонатные мембраны с определенным диаметром пор. Для экструзии были выбраны мембраны с диаметром пор 200 нм. Другой подход включал в себя применение экструзии через поликарбонатные мембраны с определенным диаметром пор после формирования липосом по стандартной методике. Экструзию раствора липосом проводили на приборе фирмы "Avestin" (Канада). По результатам лазерной корелометрии размер катионных липосом после экструзии составил 190 ± 15 нм. С помощью АСМ были обнаружены частицы размером 150-200 нм, что близко к экспериментальным данным, полученным методом корелометрии. Обработанный таким образом препарат липосом сохранял стабильность в течение 4 месяцев при $+4^\circ\text{C}$. Эффективность трансфекции при этом повысилась до 17-23%.

Определение цито- и генотоксичности катионных липосом in vitro. В опытах использовали клетки феохромоцитомы крысы РС12, культивируемые в тех же условиях, что и клетки НГУК1. Цито- и генотоксичность липосом оценивали с помощью методов, описанных ранее. Исследовали препараты липосом в двух концентрациях (5 и 10 мкмоль).

Трансфекция клеток эпителия почки человека линии НЕК293 комплексами катионные липосомы - ДНК цитохрома СYP 450 2В6. За день до трансфекции 1×10^6 клеток пассировали в 75 см^2 культуральные матрасы в 3 мл среды RPMI 1640 с 10% ЭТС. В день трансфекции 1 мкг плазмиды смешивали со 100 мкл НЕРЕС буфера (НЕРЕС рН 7,4, 150 мМ NaCl), отдельно готовили смесь из 7,5 мкл КЛ и НЕРЕС буфера, доводя объем до 100 мкл. Перемешивали 5 мин переворачивая пробирку вверх-вниз, затем инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Через 10 мин к раствору ДНК добавляли раствор КЛ, аккуратно встряхивали и инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре. Далее полученные комплексы добавляли к клеткам и перемешивали содержимое культурального матраса. Через 24 часа после смены среды вносили антибиотик Geneticin® G418 в конечной концентрации 400 мкг/мкл. Клетки культивировали в течение 14 суток при 37°C в CO_2 -инкубаторе. Отобранные после селекции клоны использовали для тестов на чувствительность к ЦФА.

Исследование чувствительности клеток к ЦФА. 3×10^4 клеток эпителия почки человека линия 293, трансфицированные геном цитохрома СYP45022В6, пассировали в 6-ти луночные плашки в 2 мл среды RPMI 1640, содержащей 10% ЭТС и пенициллин-стрептомицин. Через 24 часа добавляли от 0,063 до 5 мМ ЦФА, растворенного в среде RPMI 1640. Через 6 дней инкубации, клетки окрашивали Кристалл-виолетом и определяли количество клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. *Тестирование катионных липидов на цитотоксичность.* При тестировании 10 катионных липидов на цито- и генотоксичность было обнаружено, что наименее токсичными для клеток оказались катионные липиды КЛИП-3 и КЛИП-4. Эти катионные липиды и были отобраны для получения липосом (рис. 1).

Если рассматривать полученные результаты с точки зрения зависимости структуры соединения от проявляемой токсичности, очевидно, что соединения, содержащие пиридиновую полярную головку (рис.2), были наименее токсичны для клеток, что согласуется с данными работы [11]. Замена гидроксильной группы в полярной головке на пиридиновую создает ряд преимуществ: снижение цитотоксичности, возможность варьирования соотношения КЛИП-ДНК при образовании комплексов.

Тестирование катионных липосом на цито- и генотоксичность. Липосомы, состоящие из смеси КЛИП-3 и КЛИП-4 и Хол, получали по модификации метода, описанного в работе [8].

Оба липосомальных препарата при концентрациях КЛИП-3 и КЛИП-4 2,5 и 5 мкг стимулировали синтез ДНК в клетках РС12. При этом величина стимуляции

ТРАНСФЕКЦИЯ КЛЕТОК ГЕНОМ ЦИТОХРОМА СУР450 2В6

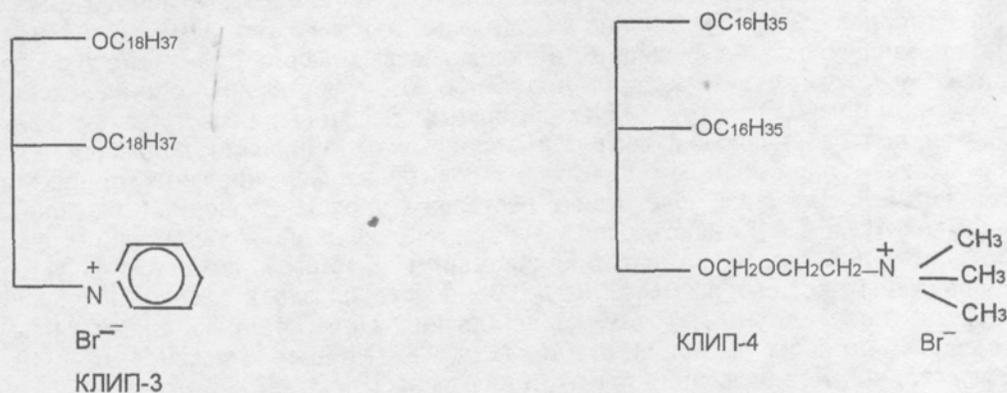


Рисунок 1.

Структура катионных липидов, использованных в тестах на цито- и генотоксичность.

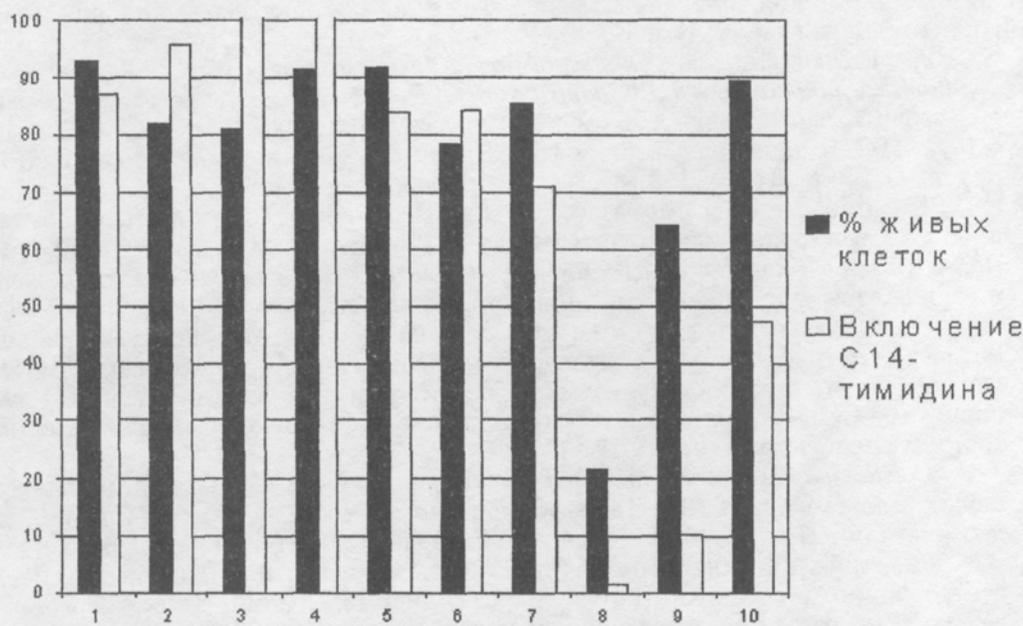


Рисунок 2.

Влияние катионных липидов на рост клеток НГУК1 и синтез ДНК в них. По оси ординат - процент живых клеток по отношению к нативным клеткам (контроль). По оси абсцисс (1-10) - номера препаратов КЛИП. Результаты выражены как среднее 3-х независимых экспериментов.

зависела от состава липосом. Оказалось, что наименьший стимулирующий эффект на синтез ДНК проявляли катионные липосомы состава КЛИП-3:Хол (50:50) - увеличение на 32% при 5 мкг препарата в пробе. С увеличением содержания КЛИП-3 в составе липосом синтез ДНК усиливался; так, при соотношении равном КЛИП-3:Хол - 60:40 и 70:30 он составил 65% и 74% соответственно. Снижение синтеза ДНК наблюдалось только при увеличении концентрации КЛИП до 10 мкг. В случае КЛИП-4 усиление стимуляции синтеза ДНК было еще более заметным (особенно при концентрации препарата в пробе 2,5 мкг).

Усиление синтеза ДНК при действии катионных липидов может быть связано как со стимуляцией роста клеток, так и с последующей фрагментацией ДНК с дальнейшим вступлением клеток в апоптоз [12]. Также можно предположить, что трансфекция клеток возможна в узком диапазоне концентраций липосомального препарата от 1 до 5 мкг.

Исходя из вышеизложенного, для введения ДНК цитохрома P450 2B6 в клетки *in vitro* в качестве средства доставки был выбран липосомальный препарат состава КЛИП-3:Хол (50:50) в диапазоне концентраций 1-5 мкг.

Таблица 1. Влияние катионных липосом различного состава на синтез ДНК в клетках феохромоцитомы крысы РС12.

Липосомы в пробе, мкг	Состав КЛИП-3:Хол			Состав КЛИП-4:Хол		
	50:50	*60:40	70:30	50:50	60:40	70:30
1	100,2±6	145±8	152±9	160±10	137±6	143±7
2,5	121,1±5	157,1±8	173,9±10	188,4±12	151,5±7	172,6±9
5	131,9±6	164,9±11	162,5±9	165,1±11	175,4±7	132,5±7
10	83,5±5	146,1±6	154,2±8	166,4±11	150,6±8	113,1±7

Примечание: *Результаты выражены в процентах к контролю. Представлены средние из 3-х независимых экспериментов.

Трансфекция клеток эпителия почки человека 293 геном цитохрома человека CYP 2B6. В качестве объекта для трансфекции были выбраны эпителиальные клетки почки человека HEK293, которые ранее были успешно использованы Lohr и соотр. для генотерапии панкреатической карциномы как *in vitro*, так *in vivo* [13]. Данные клетки не содержат эндогенных вирусов, которые впоследствии могли бы вызвать стойкую инфекцию биологического объекта.

Из литературы известно, что введение генетической конструкции, экспрессирующей цитохром печени крысы CYP 2B1, делает клетки опухоли чувствительными к химиотерапевтическим агентам, таким как ИФА и ЦФА [14]. Следует отметить, что предыдущие работы проводились с геном животных (мышь, кролика и крысы) [11,12,15]. В нашем исследовании мы применили конструкцию, содержащую ген человека - изоформа CYP 2B6, что предполагает дальнейшее ее использование в экспериментах *in vivo*. Эффективность трансфекции определяли по эксперименту с модельной плазмидой pCMV-βgal ("Promega"), подсчитывая количество окрашенных клеток. Процент трансфицированных клеток оказался невысоким и составил 17-23%. Тем не менее, по литературным данным при использовании гена "суицида" для гибели большей части опухолевых клеток достаточно уже 10% трансфицированных клеток.

Вторым, косвенным способом оценки количества трансфицированных клеток является подсчет живых клонов после селекции с помощью антибиотика Geneticin G418. Этот антибиотик является модифицированным аналогом неомицина, который блокирует синтез белка на рибосомах эукариот и позволяет вести отбор клеток, содержащих плазмиду с геном устойчивости к этому антибиотику. В ходе эксперимента мы выяснили, что процесс селекции зависит от концентрации клеток в объеме: чем их меньше, тем лучше идет отбор. Оптимальное количество клеток составило 3×10^4 на лунку диаметром 3 см. При данном количестве клеток действие антибиотика в концентрации 400 мкг/мл было специфичным: погибали нетрансфицированные клетки, не содержащие плазмиду с геном устойчивости. Гибель основной массы клеток происходила в течение 3-4 дней, затем клетки оставшихся в живых клонов начинали пролиферировать. Через 14 дней отбирали выжившие после селекции клетки и проводили тест на чувствительность к ЦФА.

Следует отметить, что действие антибиотика на клетки зависело от их плотности в культуре: при количестве 3×10^4 на 3 см лунку селективное действие оказывало 400 мкг G418, при увеличении количества клеток на порядок, более эффективным было добавление 800 мкг антибиотика. Оптимальный срок селекции составил 14 дней: только по истечении такого времени погибают все нетрансфицированные клетки и тесты на цитотоксичность дают реальную картину. Клетки, не содержащие плазмидной ДНК с геном цитохрома CYP 2B6,

ТРАНСФЕКЦИЯ КЛЕТОК ГЕНОМ ЦИТОХРОМА СУР450 2В6

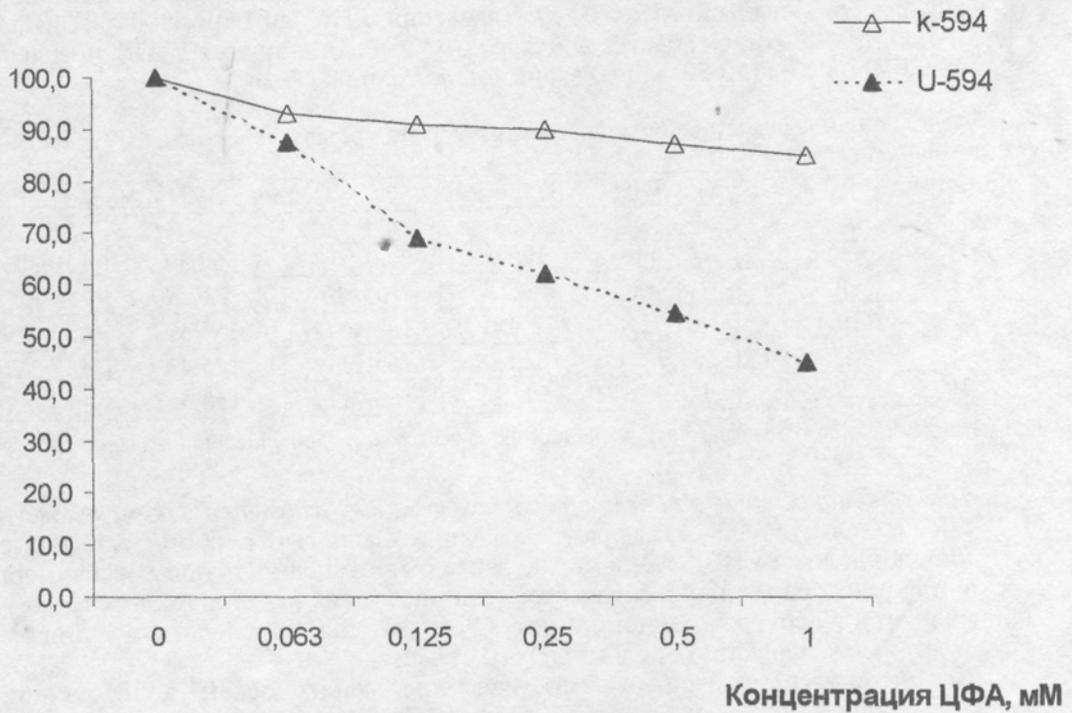


Рисунок 3.

Цитотоксическое действие ЦФА на клетки эпителия почки человека линии 293. По оси ординат - процент живых клеток по отношению к контролю, по оси абсцисс - концентрации ЦФА, ммоль. Обозначения: k - контроль, U - клетки, трансфицированные комплексами КЛ-ДНК СУР2В6. Представлены средние значения из 3-х независимых экспериментов.

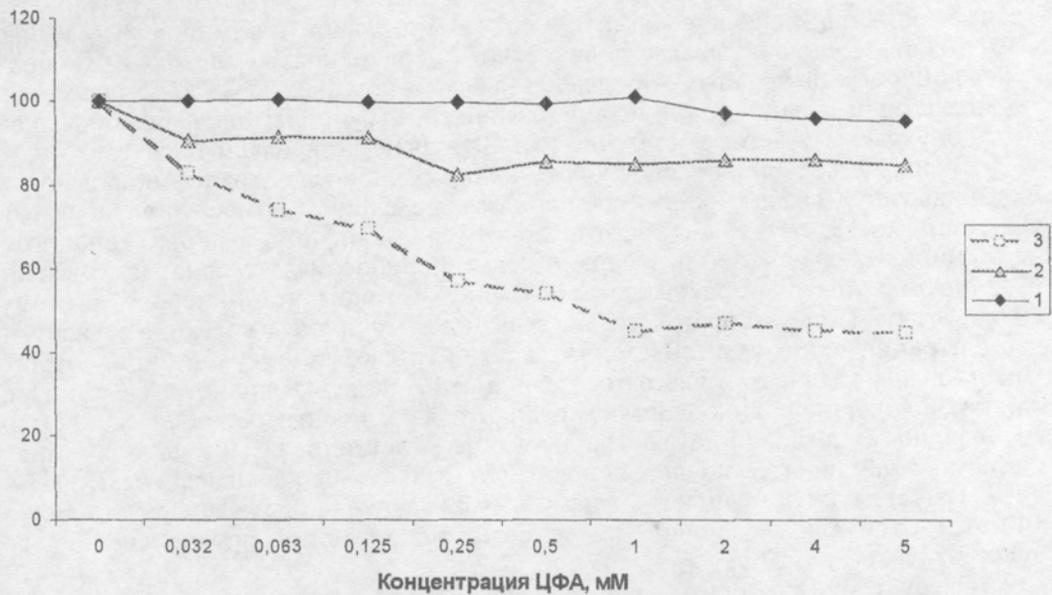


Рисунок 4.

Чувствительность клеток эпителия почки человека 293 к ЦФА после их культивирования в течение 1 месяца без антибиотика G418. По оси ординат - процент живых клеток, по оси абсцисс - концентрации ЦФА, ммоль. Обозначения: 1 - нативные клетки (контроль), 2 - клетки, трансфицированные комплексами КЛ-ДНК СУР2В6, 3 - клетки, трансфицированные комплексами КЛ-ДНК СУР2В6 и культивированные в течение 10 суток в среде без Geneticin G418. Представлены средние значения из 3-х независимых экспериментов.

являются не чувствительными к ЦФА в низких концентрациях 0-4 мМ (рис. 3), тогда как количество живых клеток, трансфицированные генетической конструкцией, уменьшалось после добавления 0,25 мМ ЦФА. Однако при повышении концентрации лекарственного препарата до 5 мМ и выше, дальнейшего снижения клеточной популяции не происходило. Вероятно, экспрессируемый фермент после конверсии определенного количества субстрата в данном случае - ЦФА каким-то образом повреждается продуктами реакции. Вторым объяснением данного факта может быть низкая экспрессия рекомбинантного белка в трансфицированных клетках. В пользу этого свидетельствует длительный период инкубации белка в тесте на субстратную специфичность. Кроме того, доставка ДНК невирусной системой (такой как липосомы) может обеспечить временную экспрессию терапевтического гена. По нашим данным после инкубации клеток, трансфицированных геном СУР2В6, без антибиотика в течение 1 месяца они теряли плазмиду и возвращались к исходному генотипу (рис. 4). Таким образом, показано, что клетки эпителия почки человека линии 293, трансфицированные геном цитохрома человека СУР2В6, становятся чувствительными к ЦФА. Это может быть использовано для разработки генотерапевтического протокола.

Работа поддержана Проектом 05 Миннауки РФ "Генотерапия и генодиагностика социально значимых заболеваний человека".

ЛИТЕРАТУРА

1. Соколов Н.Н., Яценко А.Н., Покровская М.В. (1999) *Вопр. мед. химии*, **45**, 462-71.
2. Mountain A. (2000) *Trends Biotechnol.*, **18**, 119-128.
3. Beltinger C., Uckert W., Debatin K.M. (2001) *J. Mol. Med.* **78**, 598-612.
4. Kammertoens T., Gelbmann W., Karle P., Alton K., Saller R., Salmons B., Gunzburg W.H., Uckert W. (2000) *Cancer Gene Ther.* **7**, 629-36.
5. Коломейчук С.Н., Покровская М.В., Борисова А.А., Жгун А.А., Солодарь Л.И., Соколов Н.Н., Швец В.И., Гервазиев Ю.В., Эльдаров М.А., Арчаков А.И. (2001) *Вопр. мед. химии*, **47**, 609-619.
6. Маслов М.А., Сычева Е.В., Морозова Н.Г., Серебренникова Г.А. (1999) *Изв. Академии Наук, Сер. Хим.* **7**, 1381.
7. Promega. *Transfection guide*. (1999) p.60.
8. Abakumova O.Yu., Podobed O.V., Tsvetkova T.A., Yakusheva I.V., Moskvitina T.A., Kondakova L.I., Navasardyantz D.G., Medvedev A.E. (1998) *J. Neural. Transm. Suppl.* **52**, 87-91.
9. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. (1991) *Справочник биохимика*. Москва, Мир.
10. Papahadjopoulos D., Szoka F. (1980) *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **9** 467-508
11. Smisterova J., Wagenaar A., Stuart M.C., Polushkin E., ten Brinke G., Hulst R., Engberts J.B., Hoekstra D. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 47615-47622.
12. Fillion M.C., Phillips N.C. (1997) *Biochim. Biophys. Acta*, **1329**, 345-356.
13. Lohr M., Hummel F., Faulmann G., Ringel J., Saller R., Hain J., Gunzburg W.H., Salmons B. (2002) *Cancer Chemother. Pharmacol.* **49**, Suppl. 1: S21-24.
14. Lohr M., Muller P., Karle P., Stange J., Mitzner S., Jesnowski R., Nizze H., Nebe B., Liebe S., Salmons B., Gunzburg W.H. (1998) *Gene Ther.*, **5**, 1070-1078.
15. Manome Y., Wen P.Y., Chen L., Tanaka T., Dong Y., Yamazoe M., Hirshowitz A., Kufe D.W., Fine H.A. (1996) *Gene Ther.*, **3**, 513-520.

Поступила 20.06.02.

TRANSFECTION OF EUKARIOTIC CELLS USING HUMAN
CYTOCHROME P450 2B6 GENE MAKES THEM SENSITIVE
TO CYCLOPHOSPHAMIDE

*S.N.Kolomeichuk^{1,2}, O.Yu.Abakumova¹, M.A.Maslov², E.A.Kalashnikova³,
N.G.Morozova², G.A.Serebrennikova², V. I. Shvets², N.N.Sokolov¹.*

¹Institute of Biomedical Chemistry RAMS, Pogodinskaya str. 10, 119121, Moscow, Russia
tel: (095) 245-05-09; e-mail: sokolov@ibmh.msk.su

²Lomonosov Moscow State Academy of Fine Chemical Technology, Pr. Vernadskogo 86,
117571, Moscow, Russia

³Centre of Medical Genetics RAMS, Ul.Moskvorechye 1, 148057, Moscow, Russia.

Sensitivity of 293 human epithelial kidney cells transfected by human cytochrome CYP450 gene to cyclophosphamide was investigated. Transfection was carried out by plasmid DNA containing CYP2B6 gene complexed with cationic liposomes. Liposomes were prepared from mixture of cationic lipids and cholesterol at different molar ratios. Experimental protocol included the following steps: transfection of epithelial kidney cells by complexes of plasmid DNA-cationic liposomes, clone selection in the medium with antibiotic Geneticin G418, selected clone harvesting and their treatment by cyclophosphamide as following cytotoxicity evaluation. It was shown that addition of 0.25 mM of cyclophosphamide resulted in death of 40-45% transfected cell population.

Key words: cytochrome P450 2 B6, transfection, cyclophosphamide, cationic lipids, cationic liposomes, gene therapy.