

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 577.155+577.151.042+575.224.46

©Коллектив авторов

СТАБИЛЬНАЯ ТРАНСФЕКЦИЯ КЛЕТОК DAOY АНТИСМЫСЛОВЫМ ВЕКТОРОМ ПРОТИВ GM3 СИНТАЗЫ И ВРЕМЕННОЕ УМЕНЬШЕНИЕ УРОВНЯ ГАНГЛИОЗИДОВ

Н.А. Шевчук^{1,2}, Дж. Манила^{1,3}, Е.А. Нусинович^{1,2}, С. Ладиш^{1,2}

¹Центр онкологических и иммунологических исследований, Научно-исследовательский институт педиатрии, г. Вашингтон, округ Колумбия, 20010, США; факс: +1 (202) 884-3929; эл. почта: niash@gwu.edu; тел.: +1 (202) 884-5802

²Программа по молекулярной и клеточной онкологии, Институт биомедицинских наук, Университет Джорджа Вашингтона, г. Вашингтон, округ Колумбия, 20037, США; факс: +1 (202) 994-0967;

³настоящий адрес: корпорация Human Genome Sciences, г. Роквилл, штат Мэриленд, 20850, США; Факс: +1 (301) 309-8512

Клеточные ганглиозиды участвуют во взаимодействиях между раковой опухолью и иммунной системой пациента. Для исследования их роли в формировании опухоли и ангиогенезе, мы разработали модель, основанную на антисмысловом ингибировании GM3-синтазы, одного из базовых ферментов в биосинтезе ганглиозидов. Получен ряд трансфицированных клонов клеточной линии DAOY (медуллобластомы человека), из которых выделены несколько клонов, которые стабильно экспрессировали 560-нуклеотидный фрагмент кДНК GM3-синтазы в смысловой или антисмысловой ориентации, а также клонов, трансфицированных пустым вектором. Все клеточные клоны перманентно интегрировали экспрессионные вектора в свою геномную ДНК. Полученные клоны были проанализированы на содержание ганглиозидов при помощи экстракции клеточных липидов, выделения ганглиозидов и применения высоко эффективной тонкослойной хроматографии. У одного из антисмысловых клонов, названного 7.2A, уровень ганглиозидов был снижен на 70%. Во всех контрольных клонах (трансфицированных смысловым и "пустым" векторами) содержание ганглиозидов не отличалось от нетрансфицированных клеток DAOY. Тем не менее, после 10-ти пассажей в культуре, уровень ганглиозидов у клона 7.2A возвращался к норме, несмотря на неизменно высокий уровень экспрессии антисмысловой мРНК. Следовательно, трансфекция клеток антисмысловой РНК может иногда вызывать только временное ингибирование экспрессии продукта-мишени.

Ключевые слова: ганглиозиды, GM3 синтаза, антисмысловая мРНК, трансфекция, медуллобластома.

ВВЕДЕНИЕ. Ганглиозиды - это гликосфинголипиды, содержащие один или несколько остатков сиаловой кислоты. Они находятся в мембране клеток млекопитающих, особенно в мембране нервных клеток [1]. В последние десятилетия установлен сброс ганглиозидов клетками опухоли в систему кровообращения [2, 3]. Известно, что внеклеточные ганглиозиды обладают целым

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ: р/мин - распадов в минуту, ВЭ-ТСХ - высоко эффективная тонко-слойная хроматография, ОТ-ПЦР - обратная транскрипция с последующей ПЦР; СЛСК - связанная с липидом сиаловая кислота, PBS - физиологический раствор (phosphate buffered saline).

рядом свойств в организме, например иммуносупрессия, усиление роста опухоли, ангиогенез и сигнальная трансдукция (посредством модуляции механизмов действия факторов роста) [4].

В настоящей работе представлено успешное получение стабильного антисмыслового трансфектанта клеток DAOY, у которого значительно уменьшено суммарное содержание ганглиозидов. Однако отмеченное сокращение уровня ганглиозидов было временным и клеточный клон возвращался к нормальному уровню экспрессии ганглиозидов несмотря на стабильную экспрессию антисмысловой РНК к GM3-синтазе. Насколько нам известно, такого рода реверсия антисмыслового эффекта ранее не была показана в литературе. Из этого явления можно сделать несколько выводов, а именно, что стабильная трансфекция антисмысловой РНК не всегда гарантирует равно стабильный эффект ингибирования, а также что необходимо тщательно проверять фенотип успешных антисмысловых трансфектантов непосредственно перед последующими экспериментами, особенно после многочисленных пассажей в культуре клеток.

МЕТОДИКА. *Получение стабильных трансфектантов.* Суммарная РНК была выделена из клеток DAOY (медуллобластомы человека) при помощи набора RNeasy mini kit ("Qiagen", США), и первая копия кДНК была получена при помощи набора RT-PCR kit ("Stratagene", США). Последовательность нуклеотидов кДНК GM3-синтазы была взята из GenBank (accession number AB018356). Праймеры для ПЦР были выбраны при помощи интернет-программы Primer 3 (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi) и синтезированы компанией "Integrated DNA Technologies, Inc." (США). К каждому праймеру был добавлен рестрикционный сайт с 5'-конца в соответствии с сайтами, находящимися в векторе, для вставки в смысловой или антисмысловой ориентации. Область ~530 оснований в кДНК GM3-синтазы, позиции 188-721, покрывающая иницирующий кодон трансляции (позиция 278), была амплифицирована при помощи ПЦР.

Общий левый праймер нес рестрикционный сайт Mlu I на 5'-конце. Правый праймер для антисмысловой конструкции содержал сайт Nhe I на 5'-конце и праймер для контрольной смысловой конструкции содержал сайт Sal I. Это позволило вставить указанный выше фрагмент кДНК в вектор pCI-neo в противоположной ориентации для смысловой и антисмысловой конструкции. Продукты ПЦР были очищены при помощи электрофореза в агарозе и экстрагированы с использованием набора Qiaex II kit ("Qiagen") и далее обработаны рестриктазами Mlu I и Nhe I (антисенс) или Sal I (сенс).

Сборка антисмыслового вектора. Вектор экспрессии (5,5 т.п.о.) для клеток млекопитающих pCI-neo ("Promega", США) был обработан ферментами Mlu I и Nhe I (антисенс) или Sal I (сенс) и лигирован с очищенным в агарозном геле антисмысловым или смысловым фрагментом. Аликвота из реакции лигирования была использована для трансформации компетентных клеток XL1-Blue ("Stratagene", США), и рекомбинантные клоны были найдены при помощи экспресс-очистки ДНК набором Plasmid Miniprep ("Qiagen") и рестрикционного анализа. Правильная ориентация вставок была подтверждена секвенированием (Отдел секвенирования при Центре исследования рака, Чикагский университет, США).

Трансфекция и отбор стабильных клонов. Клетки DAOY были трансфицированы антисмысловым вектором при помощи электропорации (Gene Pulser II, "BioRad", США) и посажены в чашках диаметром 10 см, содержащих Complete EMEM, с добавлением 10% сыворотки телёнка. Таким же образом был введён смысловой вектор; в качестве "пустого" контроля, третью аликвоту клеток DAOY трансфицировали вектором pCI-neo, не содержащим вставки и четвёртую аликвоту клеток обрабатывали физиологическим раствором без ДНК. По прошествии 48 часов в питательную среду было добавлено 400 нг/мл антибиотика G418 (генетицин) и через 11 дней отдельные колонии были выбраны для дальнейшего анализа. Каждую колонию сначала переносили в 6-луночные планшеты и растили до достижения конfluence и далее в карели размером

25-см², с последующим переносом в карели размером 75-см² и 175-см². Поскольку антисмысловая экспрессионная кассета и ген устойчивости к антибиотику сцеплены в векторе pCI-neo после того как он интегрирует в геном, приведённый выше метод селекции позволил получить клетки, которые: а) стабильно инкорпорировали вектор экспрессии pCI-neo в свой геном (одну или несколько копий); б) экспрессируют достаточное количество антисмысловой мРНК и фермента устойчивости к генетицину. Перед геном неомицин-фосфотрансферазы находится ранний промотор и энхансер SV40, в то время как средне-ранний энхансер/промотор CMV, связанный со вставкой, способствует сильной конститутивной экспрессии в самых разных клеточных линиях млекопитающих. Контрольные клетки, обработанные физиологическим раствором без ДНК, все погибли после селекции на антибиотике. Аликвота из каждого выжившего клона была заморожена для дальнейшего анализа.

Выделение и количественный анализ ганглиозидов. Семнадцать устойчивых к генетицину клеточных клонов (двенадцать клонов, экспрессирующих антисмысловую мРНК (основанную на последовательности из кДНК) и три контроля со смысловой мРНК, а также нетрансфицированные и “пустые” контрольные клоны) были выращены приблизительно до 20×10^6 клеток каждый. Конфлюентные клетки DAOY были трипсинизированы и небольшие аликвоты были взяты для анализа количества белков. Процедура скрининга включала следующие этапы. Ганглиозиды антисмысловых трансфектантов и контролей были выделены при помощи хлороформ-метаноловой экстракции и очищены как описано ранее [5]. Состав ганглиозидов анализировали при помощи высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭ-ТСХ) с визуализацией резорциноловым реагентом [5]. Денситометрический анализ пластинок ТСХ был выполнен при помощи программы Scion Image (NIH, Bethesda, США), и суммарное содержание ганглиозидов в каждом клоне пересчитано на 10^8 клеток. В качестве подтверждения суммарное содержание ганглиозидов было также пересчитано на микрограмм суммарного клеточного белка.

Анализ количества белков. Образцы $2,5 \times 10^4$ клеток каждый в PBS были лизированы одной третью объёма 1 М NaOH и инкубированы в течение 5 дней (с ежедневным перемешиванием). Далее анализ количества белков проводили в соответствии с протоколом в наборе BioRad DC Protein Assay (BioRad, США).

ОТ-ПЦР (ПЦР с обратной транскрипцией) и анализ геномной ДНК. Клоны SH1, 3.2S, 7.2A, 6.2A (последний является одним из антисмысловых клонов с нормальным содержанием ганглиозидов) и нетрансфицированные клетки DAOY были выращены до конфлюентности в карелях размером 75-см², и ДНК и РНК были выделены согласно протоколу производителя TRIzol reagent (“Invitrogen”, США). Около 1 мкг РНК каждого клона было использовано для приготовления первой копии кДНК при помощи набора ImProm-II Reverse Transcriptase (“Promega”). Полученную кДНК и геномную ДНК анализировали с использованием обычной ПЦР на присутствие антисмысловой и смысловой кассеты. 2,5 мкл раствора неочищенной кДНК или геномной ДНК было добавлено к 12,5 мкл PCR Master Mix (“Promega”), 9 мкл воды для ПЦР и 0,5 мкл каждого праймера. Праймеры, специфичные для вектора pCI-neo, с антисмысловой или смысловой вставкой были разработаны при помощи веб-программы Primer3 (<http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3-www.cgi>) и синтезированы компанией “IDT DNA”, (США). Правый праймер: GCTCGAAGCATTAACCCCT-CACTAAAGG; левый антисенс-праймер: CCTCCGCTTCCAATAACCACACAG; левый сенс-праймер: AGCAATGCCAAGTGAGTACACSTATGTG. Продукты ПЦР анализировали в 1% агарозном геле с окрашиванием бромистым этидием.

Метаболическое радио-мечение клеточных ганглиозидов. Клетки DAOY, трансфицированные антисмысловым или смысловым вектором против GM3-синтазы (клоны 7.2A и 3.2S), культивировали в среде EMEM содержащей 10% сыворотки телёнка и 0,1 мг/мл генетицина в карелях размером 75-см²

до достижения конfluence. Далее 1,6 мКи D-[6-³H] глюкозамин-гидрохлорида (30,9 Ки/ммоль) и D-[6-³H] галактозы (35 Ки/ммоль, "New England Nuclear", США) были добавлены на 1 мл питательной среды, клетки культивировались в течение 48 часов и были ополоснуты свежей средой. Одна партия карелей была трипсинизирована, в то время как другая часть оставлена инкубироваться ещё 48 часов в обычной среде без радиоизотопов и затем также собрана. После этого, осадки клеток использовали для выделения ганглиозидов как описано выше в соответствующей секции. Радиоактивно-меченные ганглиозиды были проанализированы количественно при помощи Beckman LS-6500 multipurpose scintillation counter ("Beckman-Coulter", США).

Количественный анализ антисмысловой мРНК. Клетки клона 7.2A на пассажах 9 и 13 а также одного из антисмысловых клонов с нормальным уровнем ганглиозидов (6.2A) были выращены до конfluence в карелях размером 25-см² и РНК была выделена при помощи Trizol reagent ("Invitrogen"). 2 мкг РНК из каждого образца анализировали полуколичественно на уровень экспрессии антисмысловой мРНК против GM3-синтазы при помощи набора IntraSpec Comparative RT-PCR kit ("Ambion", США). Вкратце, первая копия кДНК, меченная [α -³²P]dATP, была синтезирована при помощи праймеров Tag10RT, Tag50RT и Tag10RT (содержатся в наборе) для клонов 6.2A, 7.2A пассаж 9 и 7.2A пассаж 13 соответственно. Праймеры Tag10RT и Tag50RT добавляют последовательности различной длины (первый на 40 оснований короче второго) к 3'-концам кДНК, таким образом, что все кДНК, полученные из клона 7.2A пассаж 9, на 40 оснований длиннее чем кДНК из клонов 6.2A и 7.2A пассаж 13. Поскольку попарные смеси кДНК из этих клонов будут конкурировать за те же самые праймеры в полимеразной цепной реакции, различная интенсивность полос в агарозном геле должна выявить различия в количестве антисмысловой мРНК в данных трёх образцах. Каждая реакционная смесь с первой копией кДНК была очищена на колонках NucAway (содержатся в наборе) и концентрация кДНК в элюатах была рассчитана на основании величины удельной радиоактивности (сцинтиляционный счётчик Beckman LS-6500). Равные молярные количества каждой кДНК были смешаны попарно и амплифицированы при помощи праймеров Outer Tag (содержится в наборе) и AmbAS: АСТАТАГГСТАГСАТГТССА. Последний специфичен к антисмысловому конструкту, т.к. покрывает фрагмент экспрессионного вектора в районе промотора и часть антисмысловой вставки против GM3-синтазы. Мы использовали набор PCR Master Mix (Promega) для амплификации при следующих условиях: для каждой 25 мкл реакционной смеси смешивали 12,5 мкл PCR Master Mix, 3 мкл 2-микромольного праймера Outer Tag, 0,5 мкл 50-микромольного праймера AmbAS, 3 мкл воды и около 6 мкл каждой попарной смеси элюатов кДНК антисмысловых клонов, указанных выше. Первая смесь содержала 2,4 мкл и 3,5 мкл элюатов клонов 6.2A и 7.2A пассаж 9 соответственно. Вторая смесь содержала 3,5 мкл и 2,9 мкл элюатов клонов 7.2A пассаж 9 и 7.2A пассаж 13 соответственно. Третья смесь содержала 2,4 мкл и 2,9 мкл элюатов клонов 6.2A и 7.2A пассаж 13 соответственно. Условия реакции (всего 35 циклов): первая денатурация 95°C 2 мин; все последующие стадии денатурации: 95°C 30 сек; отжиг 50°C 30 сек; удлинение 72°C 45 сек; последняя стадия: хранение при 4°C. Все циклы ПЦР были выполнены на амплификаторе Gradient Cycler PTC-225 ("MJ Research", США) с подогреванием крышки. Контрольные ПЦР, содержащие кДНК только одного клона (каждого из трёх), были выполнены аналогичным образом. Все продукты анализировали при помощи электрофореза в 2% агарозном геле, содержащем бромистый этидий.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. *Содержание ганглиозидов в клонах клеток DAOY.* Семнадцать лекарственно-устойчивых клонов клеток DAOY, трансфицированных антисмысловым (12 клонов), смысловым (3 клон) или пустым (2 клон) плазмидным вектором были проанализированы на суммарное содержание ганглиозидов. На рисунке 1 (верхний гель) показаны данные для всех

17 клонов, а также два измерения для нетрансфицированных клеток DAOY. У одного из двенадцати антисмысловых клонов, 7.2A, на 5-м пассаже уровень ганглиозидов был понижен на 70%, по сравнению с клонами, экспрессирующими смысловую мРНК и "пустыми" контролями (рис. 2). Качественных изменений в составе ганглиозидов клона 7.2A не было замечено (рис. 1, верхний гель). Ингибирование синтеза ганглиозидов не было так явно выражено у других клонов, трансфицированных антисмысловой конструкцией против GM3-синтазы (рис. 1, верхний гель и рис. 2).

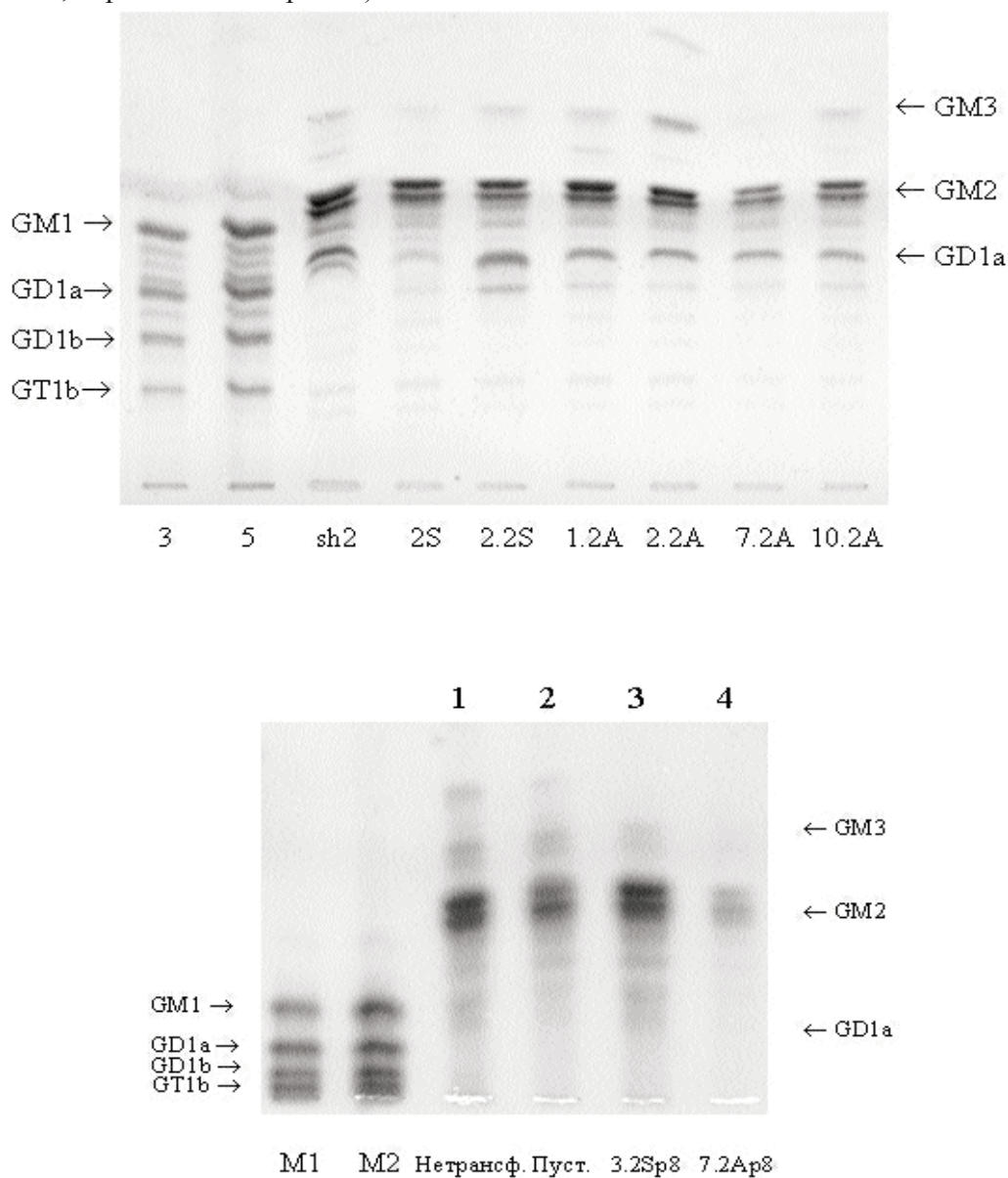


Рисунок 1.

ВЭ-ТСХ анализ ганглиозидов, выделенных из пассажей 5 и 8 клонов клеток DAOY, трансфицированных антисмысловой или смысловой конструкцией.

На каждую дорожку были нанесены аликвоты ганглиозидов, соответствующие 3×10^6 клеток.

Сверху, пассаж 5: "3" и "5" соответствуют 3 и 5 нанолям СЛСК ганглиозидов из мозга человека (маркеры); SH2 - пустой контроль; 2S, 2.2S - клоны DAOY, трансфицированные смысловой конструкцией; 1.2A, 2.2A, 7.2A, 10.2A - антисмысловые трансфектанты.

Снизу, пассаж 8: M1 и M2 соответствуют 3 и 6 нанолям СЛСК ганглиозидов из мозга быка (маркеры); дорожка 1 - нетрансфицированные клетки DAOY; дорожка 2 - клетки, трансфицированные пустым вектором ("пустой" контроль); дорожка 3 - клон 3.2S (трансфицирован смысловой конструкцией); дорожка 4 - клон 7.2A (пассаж 8 после трансфекции антисмысловой конструкцией).

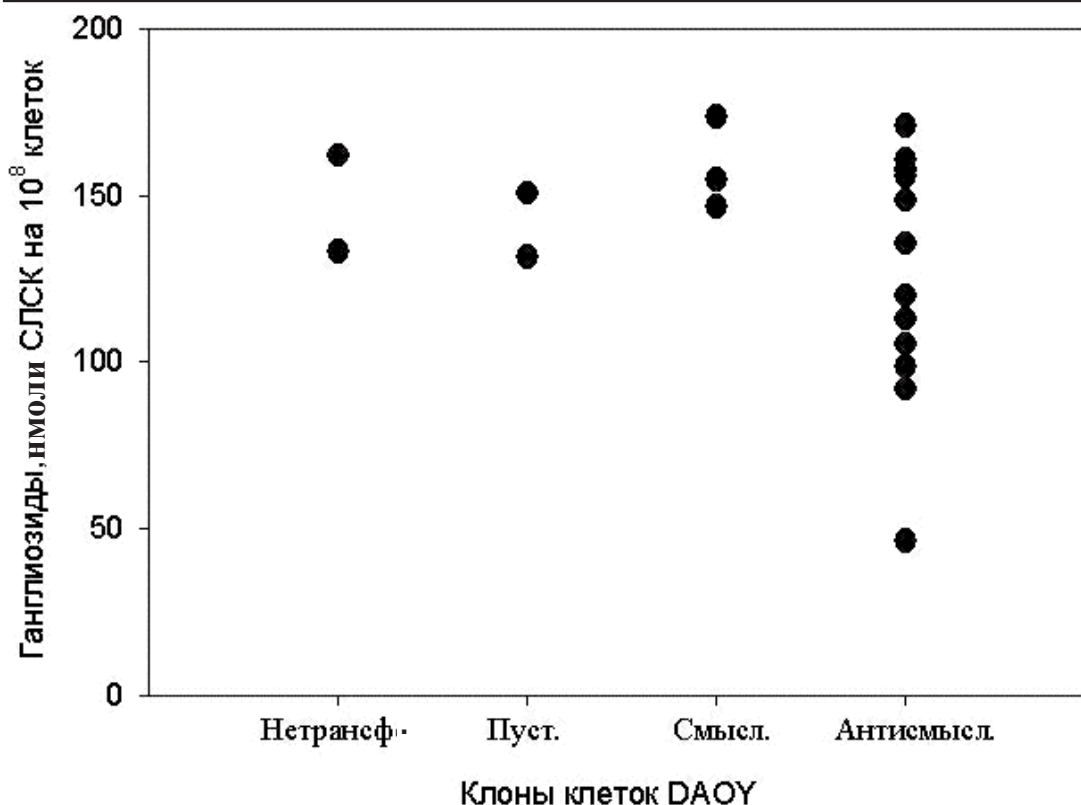


Рисунок 2.

Денситометрический количественный анализ данных ВЭ-ТСХ

Содержание ганглиозидов в различных клонах клеток DAOY, трансфицированных антисмысловым вектором против GM3-синтазы, а также смысловым и пустым вектором, показано в виде точки для каждого отдельного клона.

Дальнейший анализ клона 7.2A на более позднем пассаже (восьмом) подтвердил вышеуказанный ингибиторный эффект антисмысловой трансфекции, а именно, сокращение суммарного уровня ганглиозидов приблизительно на 70% (рис. 1, нижний гель). Ингибирование было подтверждено как в пересчёте на число клеток (46 наномолей связанной с липидом сиаловой кислоты (СЛСК) на 10^8 клеток), так и в пересчёте на суммарный клеточный белок (0,85 нмоль СЛСК на мг клеточного белка), по сравнению с нетрансфицированными клетками DAOY (148 нмоль СЛСК на 10^8 клеток (среднее двух измерений, рис. 2) или 2.7 СЛСК на мг клеточного белка). Эти значения коррелируют с ранее опубликованными данными по содержанию ганглиозидов в клетках DAOY [6, 7].

Экспрессия антисмысловой РНК. Для того чтобы подтвердить, что ингибирование синтеза ганглиозидов было вызвано антисмысловой трансфекцией против GM3-синтазы, мы проанализировали экспрессию антисмысловой мРНК у клона 7.2A (рис. 3, верхний гель). ОТ-ПЦР продемонстрировала, что на 9-м пассаже антисмысловая мРНК активно экспрессировалась в клетках клона 7.2A (рис. 3, верхний гель), в то время как контрольный фрагмент смысловой мРНК также экспрессировался в одном из случайно выбранных клонов, трансфицированных контрольной смысловой конструкцией. Как антисмысловая, так и смысловая (контрольный фрагмент) мРНК отсутствовали в клетках DAOY, трансфицированных пустым вектором, и в нетрансфицированных клетках (рис. 3, верхний гель). Анализ скорости деления клеток клонов 7.2A и 3.2S на пассаже 9 показал что значительной разницы между двумя клонами не наблюдается и время удвоения составляет примерно 24 часа, что коррелирует с ранее опубликованными данными для клеток DAOY [7].

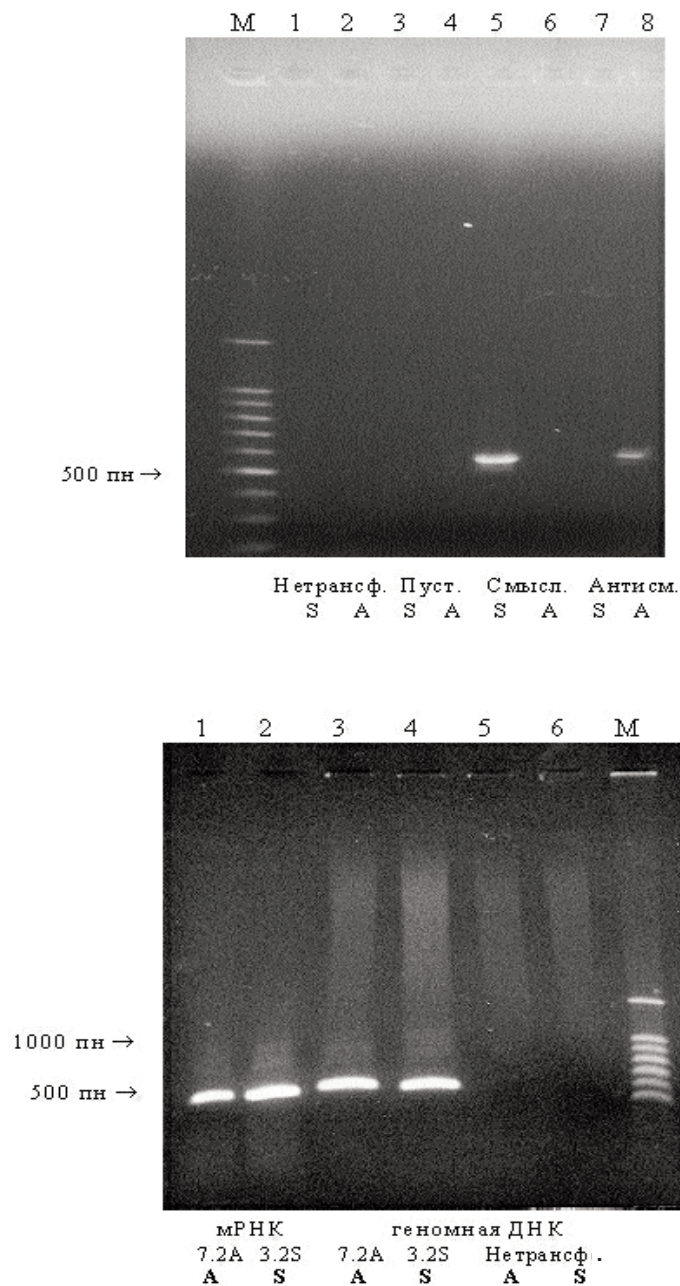


Рисунок 3.

ОТ-ПЦР анализ экспрессии антисмысловой мРНК у клона 7.2A (пассажи 9 и 13) и контрольных клонов.

Также показан ПЦР анализ геномной ДНК клона 7.2A на присутствие антисмысловой кассеты против GM3-синтазы. Для всех реакций был использован общий правый праймер. Левый праймер специфичный к смысловой (контрольной) кассете помечен буквой "S" на рисунке, а левый праймер специфичный к антисмысловой кассете или транскрипту помечен буквой "A". В каждой реакции использовался только один из двух левых праймеров.

Сверху, пассаж 9: М - маркеры мол. веса ДНК ("Promega"); 1 - мРНК нетрансфицированных клеток, праймер S; 2 - то же, но с праймером A; 3 - мРНК из клеток DAOY, трансфицированных пустым вектором, праймер S; 4 - то же, но с праймером A; 5 - мРНК клона 3.2S (трансфицирован смысловой конструкцией), праймер S; 6 - то же, но с праймером A; 7 - мРНК антисмыслового клона 7.2A (пассаж 9), праймер S; 8 - то же, но с праймером A.

Снизу, пассаж 13: 1 - мРНК антисмыслового клона 7.2A (пассаж 13), праймер A; 2 - мРНК клона 3.2S (пассаж 13, трансфицирован смысловой конструкцией), праймер S; 3 - геномная ДНК антисмыслового клона 7.2A (пассаж 13), праймер A; 4 - геномная ДНК клона 3.2S (пассаж 13, трансфицирован смысловой конструкцией), праймер S; 5 - геномная ДНК нетрансфицированных клеток DAOY, праймер A; 6 - геномная ДНК нетрансфицированных клеток DAOY, праймер S; М - маркеры мол. веса ДНК ("Promega").

ТРАНСФЕКЦИЯ КЛЕТОК DAOY АНТИСМЫСЛОВЫМ ВЕКТОРОМ

Анализ клеточного синтеза ганглиозидов. Далее мы исследовали активность GM3-синтазы в клонах, экспрессирующих антисмысловую или смысловую мРНК, при помощи метаболического радиоактивного мечения (рис. 4). Эти эксперименты были проведены на клетках пассажа 13. Довольно неожиданно, анализ показал отсутствие значительной разницы между ферментативной активностью в клетках клона 7.2A (антисенс) и активностью в контроле экспрессирующем смысловую мРНК (рис. 4, слева), указывая на то что антисмысловой эффект не проявлялся. Это наблюдение подтолкнуло нас на повторный анализ экспрессии антисмысловой РНК у клона 7.2A.

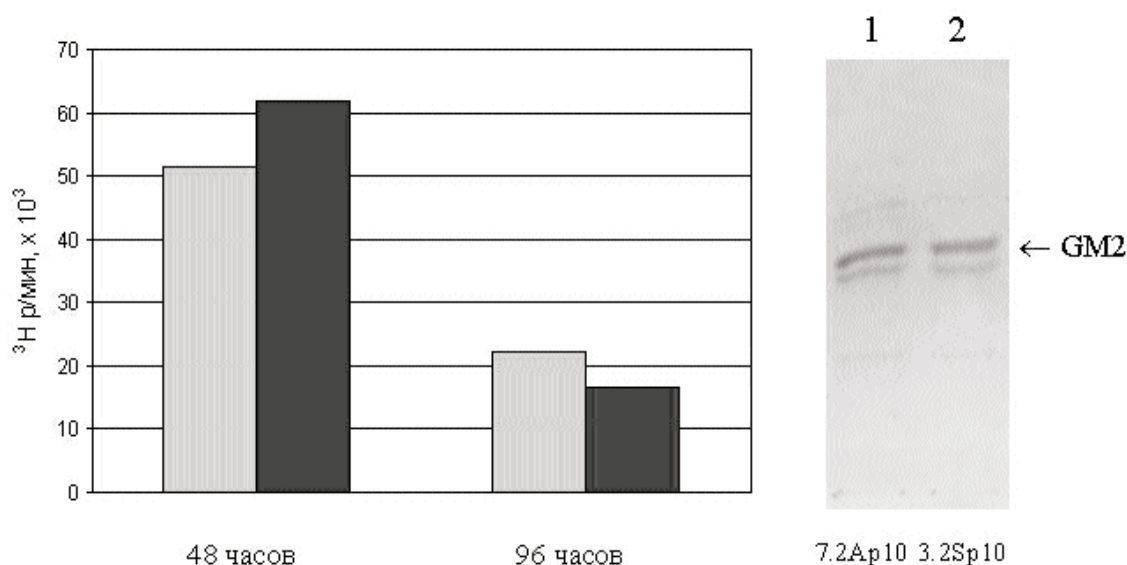


Рисунок 4.

Метаболическое радиоактивное мечение клеточных ганглиозидов (анализ активности GM3-синтазы) в клонах клеток DAOY, экспрессирующих антисмысловую или смысловую мРНК (пассаж 13).

Слева: каждый прямоугольник представляет собой данные для $1,8 \times 10^6$ клеток; светлые прямоугольники - клон 7.2A (экспрессирует антисмысловую мРНК); тёмные прямоугольники - клон 3.2S (экспрессирует смысловую мРНК). Клетки 13-го пассажа были культивированы в присутствии 1,6 мКи/мл D-[6- ^3H]глюкозамин-гидрохлорида (30,9 Ки/ммоль) и D-[6- ^3H]галактозы в течение 48 часов, затем часть клеток собирали и измеряли радиоактивность ганглиозидов (прямоугольники обозначенные "48 часов"). Оставшиеся клетки были отмыты от среды с меткой и культивированы в течение дополнительных 48 часов (прямоугольники обозначенные "96 часов").

Справа показаны результаты измерения количества ганглиозидов в клоне 7.2A (пассаж 10). Дорожка 1 - клон 7.2A (пассаж 10, экспрессирует антисмысловую мРНК); дорожка 2 - клон 3.2S (экспрессирует смысловую мРНК).

Дальнейший анализ клона 7.2A. Так как уровень ферментативной активности оказался одинаковым в эксперименте и контроле, мы проанализировали содержание ганглиозидов в клоне 7.2A в третий раз, на пассажах 10 и 13 (пассаж 10 показан на рис. 4, справа). Анализ показал что антисмысловой клон 7.2A вернулся к нормальному (неингибированному) уровню ганглиозидов в клетках начиная с пассажа 10. Это внезапное исчезновение антисмыслового эффекта (между пассажами 8 и 10, рис. 1, нижний гель и рис. 4, справа) не повлияло на устойчивость к антибиотику клона 7.2A, поскольку все клоны кроме нетрансфицированного были культивированы в среде содержащей 0,1 мг/мл генетицина (G418). К тому же, ПЦР анализ (рис. 3, нижний гель) показал что: А) антисмысловая касета присутствовала в геномной ДНК клеток 7.2A; Б) антисмысловая мРНК по-прежнему экспрессировалась на пассаже 13.

Измерение уровня экспрессии антисмысловой мРНК. Чтобы определить действительно ли исчезновение антисмыслового эффекта было вызвано изменением уровня экспрессии антисмысловой мРНК на поздних пассажах клона 7.2А, мы использовали полуколичественную (сравнительную) ОТ-ПЦР для сравнения двух пассажей клона 7.2А, а также другой антисмысловый клон, 6.2А, у которого не наблюдалось сокращения уровня клеточных ганглиозидов. Самый ранний пассаж клона 7.2А, который имелся в нашем распоряжении к этому времени, был пассаж 8 (он же пассаж, на котором в последний раз было подтверждено ингибирование клеточных ганглиозидов). Соответственно самый ранний пассаж для измерения уровня мРНК был номер 9 (пассаж 8, выращенный до конfluence в карели размером 25 см²). Мы провели попарные сравнения концентраций антисмысловой мРНК между кДНК выделенных из трёх видов клеток: клон 7.2А пассаж 9, клон 7.2А пассаж 13 и клон 6.2А пассаж 8. На рисунке 5 показаны результаты этого эксперимента, и видно, что уровень экспрессии антисмысловой мРНК у клона 7.2А примерно одинаков на пассажах 9 и 13. У клона 6.2А уровень антисмысловой РНК был близок к уровню клона 7.2А (рис. 5, дорожка 1), и экспрессия антисмысловой РНК не уменьшилась от пассажа 9 к пассажи 13 клона 7.2А (рис. 5, дорожка 2).

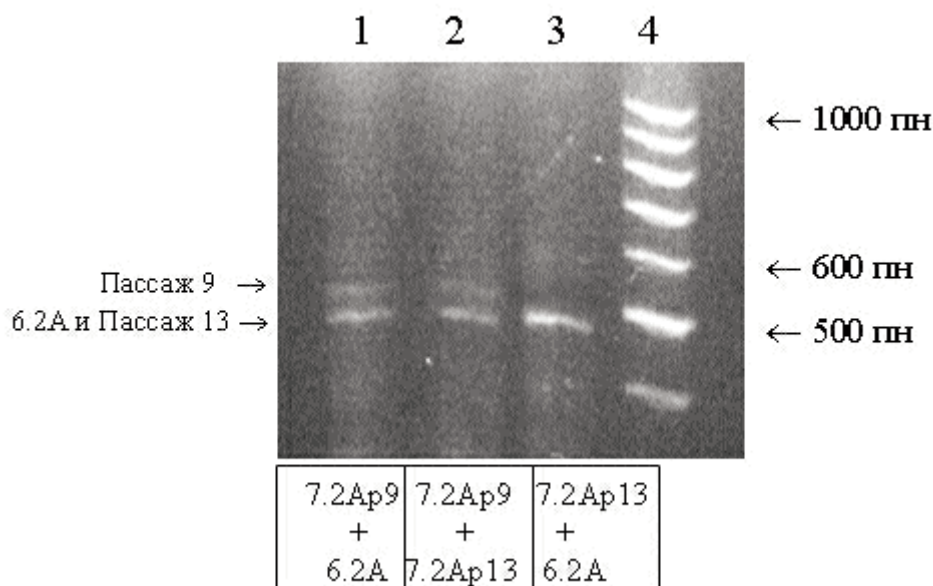


Рисунок 5.
Сравнительный ОТ-ПЦР анализ экспрессии антисмысловой мРНК в нескольких клонах и пассажах.

Равные молярные количества кДНК клонов 6.2А пассаж 8, 7.2А пассаж 9 и 7.2А пассаж 13 были смешаны попарно и амплифицированы при помощи праймеров специфичных к антисмысловому конструкту (мРНК) против GM3-синтазы. кДНК были получены при помощи набора IntraSpec Comparative RT-PCR Kit ("Ambion") таким образом, что все возможные кДНК клона 7.2А пассажа 9 на 40 нуклеотидов длиннее чем кДНК полученные из клонов 6.2А и 7.2А пассаж 13. Поскольку попарные смеси кДНК будут конкурировать за те же самые праймеры в реакциях ПЦР, разная интенсивность полосок при электрофорезе продуктов будет указывать на различия в количестве антисмысловой мРНК между вышеуказанными тремя образцами.

Дорожка 1: сравнение уровня антисмысловой мРНК между клонами 7.2А 9-й пассаж (верхняя полоска) и 6.2А 8-й пассаж (нижняя полоска). **Дорожка 2:** сравнение уровня антисмысловой мРНК между клонами 7.2А 9-й пассаж (верхняя полоска) и 7.2А 13-й пассаж (нижняя полоска).

Дорожка 3: смесь продуктов ОТ-ПЦР из клонов 7.2А 13-й пассаж и 6.2А 8-й пассаж (оба в нижней полоске). М - маркеры мол. веса ДНК ("Promega").

Согласно этим данным, антисмысловой клон 7.2А, у которого суммарная продукция ганглиозидов была ингибирована на 70% на пассажах 5 и 8, не проявлял антисмыслового эффекта на пассаже 10, несмотря на продолжающуюся лекарственную устойчивость к неомицину (генетицину) и экспрессию антисмысловой мРНК.

Модель ингибирования для клеточных ганглиозидов (нокдаун) насущно необходима для изучения функции ганглиозидов опухолевого происхождения и могла бы быть использована для выяснения роли ганглиозидов в формировании опухоли и ангиогенезе *in vivo* и *in vitro*. В настоящей работе представлен первый успешный случай нокдауна (генетического ингибирования) GM3-синтазы человека - ключевого фермента в биосинтезе ганглиозидов. Несмотря на то, что GM3-синтаза и целый ряд других ферментов биосинтеза ганглиозидов, например GD3-синтаза и глюкозилцерамидсинтаза, были успешно нокаутированы или ингибированы генетически у мышей [8], успешная модель ингибирования человеческой GM3-синтазы ранее не была получена, и на сегодняшний день не существует химического ингибитора или генетической модели для GM3-синтазы человека. С другой стороны, успешная супрессивная модель для GM3-синтазы человека оказалась бы потенциально полезным инструментом для изучения свойств ганглиозидов опухолевого происхождения.

Как было отмечено выше, один из полученных нами антисмысловых клонов, 7.2А, содержал на 70% меньше ганглиозидов, чем контроль, что было дважды подтверждено при помощи липидного анализа на пассажах 5 и 8. Это ингибирующее действие на активность GM3-синтазы носило лишь временный характер, и, несмотря на стабильную экспрессию антисмысловой мРНК, клон 7.2А вернулся к нормальному уровню экспрессии клеточных ганглиозидов после пассажа 10 в культуре. Насколько нам известно, случаи реверсии фенотипического эффекта антисмысловой РНК не были показаны ранее в литературе. Есть сообщения [9], что стабильная антисмысловая трансфекция часто даёт множество клонов, экспрессирующих антисмысловую РНК, но без фенотипических проявлений (отсутствие ингибирования), что имело место и в настоящей работе. Однако реверсия успешного стабильного клона с ингибиторным эффектом к дикому фенотипу ранее не была показана. Следует отметить, что в случае глюкозилцерамидсинтазы наши антисмысловые трансфектанты сохраняли ингибированный статус клеточных ганглиозидов в течение многих лет и многочисленных пассажей в культуре [10].

Для того чтобы понять возможные механизмы такого рода реверсии, стоит вкратце взглянуть на историю и современные достижения в области антисмысловой РНК. Первые сообщения успешной супрессии генов при помощи эндогенной или синтетической РНК появились около 1985 года [11]. Это совпало с открытием регуляторной роли естественной антисмысловой РНК в мобильных элементах и бактериях [12]. Основным механизмом действия природной РНК у бактерий считалось её связывание с мРНК-мишенью и подавление трансляции. С тех пор был описан целый ряд встречающихся в природе антисмысловых РНК против генов, кодирующих белки у высших организмов, включая человека [13]. Тем не менее, функция этих РНК в отношении к регуляции экспрессии и процессингу соответствующей смысловой мРНК не была установлена. Среди возможных механизмов действия приводятся: двухцепочечная РНК-специфичная аденозиндезаминаза, белковые факторы, связывающиеся и стабилизирующие двухцепочечную РНК, двухцепочечные РНКазы [14], а также конкурентное ингибирование на различных стадиях генной экспрессии, таких как транскрипция, процессинг РНК и трансляция [15]. Считается что двухцепочечная РНК-специфичная аденозиндезаминаза - это мультиферментный комплекс, который распознаёт дуплексы РНК и дезаминирует аденозины в этих районах РНК [14]. Это приводит к дестабилизации взаимодействий РНК-РНК, как, например, при сплайсинге, редактировании РНК и трансляции, и в конечном счёте ведёт к

супрессии данного гена [14]. В соответствии с этим наблюдением, были описаны несколько белковых факторов, которые могут защищать РНКовые дуплексы от модификации двухцепочечной аденозиндезаминазой и, следовательно, могут быть также вовлечены в механизмы антисмысловой регуляции экспрессии генов [16]. До недавнего времени, очень мало было известно о двухцепочечных РНКах млекопитающих; у бактерий одним из хорошо известных ферментов такого рода является РНКазы III [17]. С появлением большого количества данных об интерференции РНК (РНК-и) в клетках млекопитающих [18], двухцепочечная РНКазная активность, как, например, РНКазы III-подобный фермент дайсер [19], была найдена в ядре и цитоплазме клеток человека. Механизм супрессии генов посредством РНК-и был подробно изучен в клетках дрозофилы *in vitro* и, вероятно, опосредован действием большого мультиферментного комплекса, который активируется короткими дуплексами РНК (21-25 пар нуклеотидов) и транспортируется к РНК идентичной последовательности, что приводит к её расщеплению и деградации [20]. Данные о том, что антисмысловая РНК, которая экспрессируется эндогенно, может запускать механизм РНК-и отсутствуют. Можно предположить, что формирование протяжённых дуплексных районов из антисмысловой РНК и РНК-мишени может активизировать расщепление при помощи дайсера, приводя к образованию малых интерферентных РНК и мобилизации РНК-зависимого супрессивного комплекса (RISC).

Большая часть усилий в области антисенса направлена на атаку различных стадий процессинга РНК при помощи синтетических дезокси- и рибоолигонуклеотидов, в отличие от введения в клетку трансгенов, экспрессирующих антисмысловую мРНК [15]. Эксперименты с антисмысловыми олигонуклеотидами показали, что подавление мРНК-мишени может быть опосредовано ингибированием кэппинга, сплайсинга, полиаденилирования, экспорта из ядра (только косвенно, посредством предыдущих трёх механизмов) и различных стадий трансляции [15]. В настоящее время не ясно, могут ли вышеописанные явления играть роль в механизме действия протяжённой антисмысловой РНК (от 100 до 800 нуклеотидов), которая экспрессируется эндогенно, как, например, в результате трансфекции.

Несмотря на широкое использование, точный механизм антисмыслового ингибирования в результате трансфекции клеток экспрессионными векторами, которые продуцируют антисмысловую РНК, остаётся неизвестным [9]. Из того что известно, можно заключить, что в случае успешного применения этого подхода, до 95% смысловой мРНК-мишени может быть связано с антисмысловой РНК в ядре и суммарное количество мРНК-мишени часто значительно уменьшено [21]. Некоторые данные указывают на то, что для успешной супрессии гена-мишени необходим 10- или даже 50-кратный избыток антисмысловой РНК над смысловой РНК [22]. Было показано, что антисмысловая кДНК полной длины является неэффективной [23], и обычно должен быть найден более короткий (100-500 п.н.) район внутри зрелой мРНК-мишени (методом подбора), который бы успешно работал как антисмысловой супрессор соответствующего гена [9]. Некоторые исследователи ранее показали успешное ингибирование генов при помощи антисмысловых конструкций, которые направлены против сигналов сплайсинга в первичном транскрипте, вероятно путём, блокирования экспорта из ядра непротранспортированной РНК [15]. В настоящей работе мы обнаружили клон, в котором наблюдалось значительное сокращение содержания клеточных ганглиозидов антисмысловой конструкции, основанной на кДНК, где мишенью являлась область зрелой мРНК GM3 синтазы размером 530 оснований.

Во многих сообщениях [24, 25], только у небольшой части клонов, трансфицированных антисенсом, наблюдалось ингибирование целевого гена, несмотря на активную экспрессию антисмысловой мРНК. Такое же явление имело место и в нашей работе. Одним из возможных объяснений такого разнообразия фенотипов могло бы быть присутствие разного количества копий антисмысловых

кассет в геноме трансфектантов, что позволило бы некоторым клонам достичь высокого уровня экспрессии антисмысловой мРНК, необходимого для запуска механизмов антисенса. Однако это не объясняет исчезновение ингибирования на более поздних пассажах нашего клона, и анализ показал, что реверсия фенотипического антисмыслового эффекта не сопровождалась уменьшением уровня экспрессии антисмысловой мРНК. Быстрота реверсии (в течение 2 пассажей, между пассажем 8 и 10) исключает возможность мутации в антисмысловой кассете, которая могла бы повлечь реверсию, поскольку в этом случае мутация должна была бы произойти в миллионах клеток одновременно.

Можно предположить, что механизм действия антисмысловой мРНК регулируется динамически на эпигенетическом уровне [25] и может включать усиление и ослабление действия определённых ферментов, действующих на двухцепочечную РНК, а также РНК-связывающих факторов, вызванное присутствием антисмысловой или дуплексной РНК или продуктов их деградации [14]. Небольшие различия в экспрессии или функциональности этих факторов между различными клонами высоко мутабельной клеточной линии, такой как линия медуллобластомы человека DAOY, могли бы привести к различным ответам клеток на антисмысловую мРНК.

Стабильная трансфекция клеток опухоли антисмысловой РНК не-обязательно приведёт к стабильному ингибиторному эффекту и, следовательно, если получены успешные антисмысловые клоны, их необходимо периодически проверять на наличие ингибирования, в частности, непосредственно перед и после экспериментов исследующих функциональный эффект антисмысловой трансфекции.

Авторы выражают благодарность Рейшанг Ли и Симон Хетмер за помощь с анализом ганглиозидов и белков. Работа была финансирована из гранта NIH RO1 CA61010.

ЛИТЕРАТУРА

1. Derry D.M., Wolfe L.S. (1967) *Science*, **158**, 1450-1452.
2. Kloppel T.M., Keenan T.W., Freeman M.J., Morre D.J. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 3011-3013.
3. Young W.W. Jr., Borgman C.A., Wolock D.M. (1986) *J. Biol. Chem.*, **261**, 2279-2283.
4. Meuillet E., Cremel G., Dreyfus H., Hicks D. (1996) *Glia*, **17**, 206-216.
5. Ladisch S., Gillard B. (1987) *Methods Enzymol.*, **138**, 300-306.
6. Chang F., Li R., Noon K., Gage D., Ladisch S. (1997) *Glycobiology*, **7**, 523-530.
7. Chang F., Li R., Ladisch S. (1997) *Exp. Cell. Res.*, **234**, 341-346.
8. Yamashita T., Hashiramoto A., Haluzik M., Mizukami H., Beck S., Norton A., Kono M., Tsuji S., Daniotti J. L., Werth N., Sandhoff R., Sandhoff K., Proia R. L. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 3445-3449.
9. Weiss B., Davidkova G., Zhou L. W. (1999) *Cell. Mol. Life Sci.*, **55**, 334-358.
10. Deng W., Li R., Guerrero M., Liu Y., Ladisch S. (2002) *Glycobiology*, **12**, 145-152.
11. Crowley T.E., Nellen W., Gomer R.H., Firtel R.A. (1985) *Cell*, **43**, 633-641.
12. Mizuno T., Chou M. Y., Inouye M. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 1966-1970.
13. Adelman J.P., Bond C.T., Douglass J., Herbert E. (1987) *Science*, **235**, 1514-1517.
14. Dolnick B. J. (1997) *Pharmacol. Ther.*, **75**, 179-184.
15. Baker B.F., Monia B.P. (1999) *Biochim. Biophys. Acta*, **1489**, 3-18.
16. Saccomanno L., Bass B. L. (1994) *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 5425-5432.
17. Westphal H., Crouch R.J. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 3077-3081.
18. Caplen N.J., Parrish S., Imani F., Fire A., Morgan R.A. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 9742-9747.
19. Provost P., Dishart D., Doucet J., Frendewey D., Samuelsson B., Radmark O. (2002) *EMBO J.*, **21**, 5864-5874.
20. Bernstein E., Caudy A.A., Hammond S.M., Hannon G.J. (2001) *Nature*, **409**, 363-366.

21. Власов В.В., Свиначук Ф.П. (1987) Мол. биология, **21**, 28-32.
22. Harland R., Weintraub H. (1985) J. Cell. Biol., **101**, 1094-1099.
23. Szczakiel G., Far R.K. (2002) Curr. Opin. Mol. Ther., **4**, 149-153.
24. Rabbani S.A., Gladu J., Liu B., Goltzman D. (1995) Endocrinology, **136**, 5416-5422.
25. Hanchett L.A., Baker R.M., Dolnick B.J. (1994) Somat. Cell. Mol. Genet., **20**, 463-480.

Поступила: 28. 01. 2004

**STABLE TRANSFECTION OF DAOY CELLS WITH A GM3 SYNTHASE ANTISENSE
CONSTRUCT AND TRANSIENT REDUCTION IN GANGLIOSIDE CONTENT**

N.A. Shevchuk^{1,2}, J. Manela^{1,3}, Ye.A. Nusinovich^{1,2}, S. Ladisch^{1,2}

¹Center for Cancer and Immunology Research, Children's Research Institute, 111 Michigan Ave NW, Washington, DC 20010, USA; fax: +1 (202) 884-3929; e-mail: niash@gwu.edu; tel.: +1 (202) 884-5802

²Molecular and Cellular Oncology Program, Institute for Biomedical Sciences, The George Washington University, Washington, DC 20037, USA; fax: +1 (202) 994-0967

³current address: Human Genome Sciences, Inc., Rockville, 14200 Shady Grove Road, MD 20850, USA; fax: +1 (301) 309-8512

Tumor cell gangliosides are bioactive molecules involved in tumor-host interactions. To investigate their role in tumor formation and angiogenesis, we sought to develop an inhibitory model targeting human GM3 synthase, an essential enzyme in the ganglioside synthesis pathway, by antisense transfection. We prepared a number of transfectants from DAOY human medulloblastoma cells and isolated clones that stably expressed a 560-bp fragment of human GM3 synthase cDNA, in either sense or antisense orientation, as well as clones transfected with an empty vector. Both sense and antisense clones permanently incorporated mammalian expression vectors into their genomes. The DAOY cell clones were screened for ganglioside content using total lipid extraction, ganglioside isolation, and HPTLC. One antisense-transfected clone, 7.2A, in which total ganglioside content was reduced by 70%, was selected for further study. All sense- and sham-transfectants had ganglioside levels not different from that of untransfected DAOY cells. After 10 passages however, while antisense mRNA expression was fully maintained, the ganglioside content of 7.2A cells had reverted to normal levels. Antisense RNA transfection can sometimes have a reversible effect on the expression of a target. Possible regulatory mechanisms of this previously unrecognized process of reversion to wild type phenotype are discussed.

Key words: gangliosides, GM3 synthase, antisense mRNA, transfection, medulloblastoma.