

На правах рукописи

Шугурова Ирина Михайловна



**ВЛИЯНИЕ РЕГУЛЯТОРНЫХ ГЕНОВ ВИЧ-1 *tat* И *nef* НА
ПРОЛИФЕРАЦИЮ, МОРФОЛОГИЮ И ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ
КЛЕТОК ГРЫЗУНОВ *in vitro***

03.00.03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Москва 2005

Работа выполнена в Лаборатории молекулярной генетики соматических клеток Отдела вирусной и клеточной молекулярной генетики Института молекулярной генетики РАН.

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:

кандидат биологических наук
Гривенников Игорь Анатольевич

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

доктор биологических наук, профессор
Гараев Мансур Мухаметович
кандидат биологических наук,
Арман Инга Павловна

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ: Научно-исследовательский институт
вирусных препаратов им. О.Г. Анджапаридзе РАМН

Защита состоится «30» мая 2005 г. в 12 часов на заседании
диссертационного совета Д 001.020.01 в Институте вирусологии им. Д.И.
Ивановского РАМН по адресу: г. Москва, ул. Гамалеи, д. 16

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Института
вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН по адресу: г. Москва, ул. Гамалеи,
д. 16

Автореферат разослан «26» апреля 2005 года

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор медицинских наук

Н.П. Косякова

2005-4
47939

2064516

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

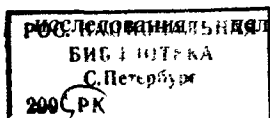
Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) - этиологический агент синдрома приобретенного иммунодефицита, названного чумой XX-ого века. По прогнозу, в 2005 году, в России число инфицированных ВИЧ достигнет 1 миллиона человек. Серьезность этой проблемы для всего мирового сообщества не вызывает сомнений.

Главным клиническим показателем СПИДа является резкое уменьшение количества CD4+ Т-лимфоцитов. Белки оболочки ВИЧ связываются с молекулой CD4, что в результате эндоцитоза приводит к проникновению вируса внутрь клеток субпопуляции T_H.

Иммунный дефицит, возникающий в результате инфицирования ВИЧ, сопровождается развитием ряда сопутствующих патологических изменений: нейропатией, энтеропатией, нефропатией, миопатией, нарушением гематопоеза, опухолеобразованием. Частота таких изменений у ВИЧ-носителей возрастает в десятки и тысячи раз, по сравнению со средними показателями в популяции. Однако до сих пор детальные молекулярные механизмы их возникновения остаются неизвестными.

После обнаружения ВИЧ и вируса иммунодефицита обезьян (ВИО) были начаты исследования механизмов взаимодействия между этими вирусами и клетками. Особое внимание было уделено влиянию вирусов иммунодефицита и их отдельных генов на клеточный метаболизм и зависимость репликации вирусов от многих факторов клеток-хозяев (Свердлов, Тарантул, 1992).

В первых же экспериментах было показано, что в ряде патологических процессов, сопровождающих ВИЧ-инфекцию, могут участвовать продукты как структурных, так и регуляторных генов ВИЧ/ВИО. Глубокое и всестороннее изучение функций вирусных генов позволит получить информацию для



координированном взаимодействии его отдельных генов между собой и с геномом клетки-хозяина. Большое внимание в этих исследованиях было обращено на изучение роли регуляторных генов ВИЧ/ВНО, которые участвуют не только в регуляции экспрессии и репликации вирусного генома, но также оказывают существенное влияние на метаболизм клеток. Это делает возможным поиск более эффективных медикаментозных способов борьбы с клиническими проявлениями ВИЧ-инфекции.

Объектами наших исследований являлись два регуляторных гена ВИЧ-*tat* и *nef*. Эти гены, по существовавшим к началу настоящей работы данным, имели разнонаправленное влияние на экспрессию и репликацию ВИЧ в клетках. Ген *tat* рассматривался как трансаактиватор транскрипции ВИЧ, а ген *nef* как негативный фактор экспрессии вирусных генов и репликации вируса. При этом мало было известно относительно влияния этих генов на клеточные гены. Однако уже первые исследования по влиянию продуктов регуляторных генов на клеточный метаболизм показали, что существует тесная взаимосвязь между этими процессами. Постепенно накапливались данные, указывающие на плейотропные эффекты генов *tat* и *nef* на клетки, и их участие в развитии некоторых патологий, сопутствующих СПИДу.

Продукт гена *tat* представляет собой секретируемый фактор, который является трансаактиватором транскрипции как вирусных, так и отдельных клеточных генов, влияет на рост и пролиферацию клеток, их миграцию, апоптоз и ангиогенез. Наряду с этим ген *tat* иногда оказывает и ингибирующее воздействие на экспрессию клеточных генов. Показана нейротоксичность белка Tat, которая проясняет молекулярные механизмы некоторых нейропатологий, сопровождающих СПИД. Важным было обнаружение у гена *tat* онкогенного потенциала, который, по-видимому, ассоциирован с развитием лимфом и саркомы Капоши у ВИЧ-инфицированных пациентов. В дальнейшем было определено, что многие из эффектов гена *tat* на клетки осуществляются в результате взаимодействия белка Tat с определенным набором клеточных белков.

Ген *nef* участвует в многочисленных процессах, происходящих в клетках, в частности, в негативной и в позитивной регуляции экспрессии генов ВИЧ/ВИО и клеточных генов, а также в репликации вируса. Кроме того был обнаружен эффект гена *nef* на эндоцитоз и ряд других процессов. На астроцитах человека был выявлен модулирующий эффект гена *nef* на уровень TNF- α , что проявлялось в задержке апоптоза (Robichaud, Poulin, 2000). В настоящее время ясно, что продукт гена *nef*, также как и гена *tat*, взаимодействует в клетках с большим числом белков, участвующих в передаче клеточных сигналов и транспорте белковых продуктов (Benichou *et al.*, 1994; Collette *et al.*, 1996).

Таким образом, имеющиеся данные указывают на полифункциональность генов *nef* и *tat* ВИЧ-1 на клетки. Однако в полной мере молекулярные механизмы влияния продуктов этих генов на процессы метаболизма в клетках и их роль в развитии различных патологий у ВИЧ-инфицированных пациентов остается неизвестной. Остается также много вопросов, связанных с ткане- и видо-специфическими эффектами продуктов этих двух регуляторных вирусных генов.

В связи с этим представляется важным проведение экспериментов по изучению влияния регуляторных генов ВИЧ на непермиссивные к вирусу нормальные, псевдонормальные и злокачественные клетки грызунов, что позволяет изучить общие эффекты воздействия на клетки, присущие отдельным вирусным генам.

Цель исследования

Изучение влияния регуляторных генов вируса иммунодефицита человека *nef* и *tat* на пролиферацию, морфологию и дифференцировку клеток грызунов для выяснения их роли в развитии различных патологических изменений у человека.

Задачи исследования

1. Изучение влияния продуктов регуляторных генов *nef* и *tat* ВИЧ на пролиферативную активность и морфологию различных клеточных культур крысы: псевдонормальная линия клеток (Rat-2) и линия опухолевых клеток феохромоцитомы крысы (PC12).
2. Оценка онкогенного потенциала регуляторных генов *nef* и *tat* ВИЧ на культуре первичных фибробластов эмбрионов крысы, исследование кооперативного эффекта между генами *nef* и *tat*, а также онкогенами *Ha-ras* и *c-myc*.
3. Изучение влияния регуляторных генов *nef* и *tat* ВИЧ на пролиферацию и дифференцировку эмбриональных стволовых клеток мыши.

Научная новизна и практическая ценность работы

В результате проведенной работы впервые получены данные о кооперации между геном *tat* и известными онкогенами *c-Ha-ras* и *c-myc*, а также регуляторным геном *nef* ВИЧ-1, в трансформирующем эффекте на культуры клеток крысы.

Впервые получены данные о том, что регуляторный ген *nef* ВИЧ-1 инициирует образование многоядерных синцитиальных клеток при трансфекции опухолевой линии феохромоцитомы крысы.

Проведенные эксперименты по изучению влияния регуляторных генов ВИЧ на модели непермиссивных к вирусу нормальных, псевдонормальных и злокачественных клеток грызунов позволили изучить общие эффекты воздействия на клетки, присущие отдельным вирусным генам, что в дальнейшем может быть использовано в разработке эффективных подходов к терапии ВИЧ-инфицированных больных, созданию принципиально новых высокоспецифичных медицинских препаратов.

Изучение направленной тканеспецифической дифференцировки эмбриональных стволовых клеток может быть в перспективе использовано в клеточной терапии некоторых тяжелых патологий у человека.

Апробация работы

Материалы диссертационной работы были представлены на Всероссийском симпозиуме «Клеточная биология на пороге XXI века» (Санкт-Петербург, 17-19 октября 2000 г.) и III Съезде Биохимического Общества РФ (Санкт-Петербург, 26 июня-1 июля 2002 г.). В завершённом виде результаты диссертационной работы были представлены на заседании Ученого совета Института молекулярной генетики РАН 22 ноября 2004 г. и Объединенном совещании отделов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского 23 декабря 2004 г.

Положения, выносимые на защиту

- Под влиянием регуляторного гена *tat* ВИЧ-1 увеличивается пролиферативная активность псевдонормальной линии клеток крысы (Rat-2), линии опухолевых клеток феохромоцитомы крысы (PC12) и R1 линии эмбриональных стволовых клеток мыши.
- Регуляторный ген *tat* ВИЧ-1 вызывает морфологическую трансформацию псевдонормальной линии клеток крысы (Rat-2) и формирование фокусов трансформации в эмбриональных фибробластах крысы, что свидетельствует о его онкогенном потенциале.
- Существует кооперация между геном *tat* и известными онкогенами *c-Ha-ras* и *c-myc*, а также регуляторным геном *nef* ВИЧ-1, в трансформирующем эффекте на культуры клеток крысы.
- Под влиянием регуляторного гена *nef* ВИЧ-1 уменьшается пролиферативная активность псевдонормальной линии клеток крысы (Rat-2), линии опухолевых клеток феохромоцитомы крысы (PC12) и линии R1 эмбриональных стволовых клеток мыши.
- Регуляторный ген *nef* ВИЧ-1 инициирует образование многоядерных синцитиальных клеток только при трансфекции опухолевой линии феохромоцитомы крысы (PC12), что указывает на клеточно-специфическое действие этого гена.

- Регуляторные гены *tat* и *nef* ВИЧ-1 оказывают влияние как на ранние стадии дифференцировки эмбриональных стволовых клеток (на уровне формирования эмбрионидных тел), так и на процесс спонтанной дифференцировки этих клеток в кардиомиоциты.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 4 статьи в российских и зарубежных журналах и тезисы двух докладов.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения полученных результатов, их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 101 странице машинописного текста, включает 5 таблиц и 18 рисунков. Библиография включает 125 наименований.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Культуры клеток. В экспериментах были использованы следующие культуры: псевдонормальная линия клеток фибробластов крысы Rat-2; первичные фибробласты крысы; клетки феохромоцитомы крысы линии PC12; первичные эмбриональные фибробласты мыши; эмбриональные стволовые (ЭС) клетки мыши.

Плазмиды, использованные в экспериментах.

pMT_{tat} – рекомбинантная плазида с геном *tat* под контролем промотора металлотиниенового гена мыши;

pTat-neo - рекомбинантная плазида с геном устойчивости к неомицину *neo* и геном *tat* под контролем промотора цитомегаловируса;

pNef - рекомбинантная плазмида с геном *nef* под контролем промотора цитомегаловируса;

pNef-fs - контрольная плазмида, со сдвигом рамки в гене *nef*;

pSV2neo - рекомбинантная плазмида с геном устойчивости к неомицину *neo* под контролем промотора цитомегаловируса;

pEJ6,6 - рекомбинантная плазмида с геном *Ha-ras*;

pSVc-myc - рекомбинантная плазмида с геном *c-myc*;

pEGFP-C1 (Clontech №6084-1) – плазмида, содержащая ген, кодирующий «зеленый белок» под контролем промотора цитомегаловируса;

Плазмида, содержащая ген *β -gal*.

Для экспериментальной работы по стандартной методике выделяли от 100 до 500 мкг каждой плазмиды.

Перенос генов в клетки методом электропорации. Перенос генов в клетки, находящиеся в логарифмической фазе роста, осуществляли с помощью электропорации на приборе СУМ4 (ИМБ РАН). Для каждой клеточной линии были экспериментально подобраны оптимальные параметры электропорации.

Клетки, трансфицированные различными плазмидами, содержащими ген устойчивости к неомицину, растили на селективной среде с добавлением антибиотика G418 в концентрации, подобранной в ходе эксперимента для каждой линии клеток. Эффективность переноса гена определяли по числу образовавшихся *neo*-резистентных колоний на 10-14 день культивирования. Колонии окрашивали метиленовым синим.

Получение поликлональных *tat*- и *nef*-трансфицированных культур. Для трансфекции 1 млн клеток использовали суммарно 11 мкг плазмидной ДНК. Плазмиды pMT-*tat* (10 мкг) и pNef (10 мкг) котрансфицировали в соотношении 10:1 с плазмидой pSV2neo (1 мкг) для дальнейшей селекции Нео-котрансфектантов на среде, содержащей

антибиотик G418. Параллельно ставили контрольную трансфекцию клеток плазмидой pSV2neo (1 мкг/млн кл.). Клетки после электропорации высевали по 100 тыс (Rat-2), по 250 тыс (PC12), по 1 млн (ЭС клетки) на чашки d=50 мм в стандартную культуральную среду. Селективный агент G418 добавляли через 24 ч до концентрации 1 мг/мл – для Rat-2, 0,5 мг/мл – для PC12, 0,2 мг/мл – для ЭС клеток. Поликлональные культуры получали через 10-14 дней культивирования со сменой селективной среды каждые 3-4 дня путем снятия суммарного пула резистентных клонов. Эффективность переноса генов варьировала в диапазоне от 10^{-4} до 10^{-2} .

Тестирование переноса генов. Для выявления наличия трансгена в клетках трансфицированных культур использовали ПЦР со следующими праймерами:

для гена *tat*: - 5'-GAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGC-3' и 5'-TCTGATGAGCTCTTCGTCGCTGTC-3',

для гена *nef*: - 5'-GGTGGCAAGTGGTCAAA AAGTAGTG-3' и 5'-AATCAGGGAAGTAGCCTTGTGTGTG-3'.

Изучение пролиферации клеток. Пролиферацию клеток Rat-2 оценивали по изменению их числа (подсчет проводили в камере Горяева) на 1-ый, 4-ый и 7-ой день после посева.

Пролиферацию клеток PC12 оценивали по изменению их числа каждые двое суток в течение недели. Количество клеток определяли по показателям оптической плотности с помощью метода, использующего МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид), который является витальным реагентом, имеющим тропность к митохондриям живых клеток. Для определения ростовых характеристик в каждом эксперименте клетки рассевали по 2 тыс на лунку в 96-луночные плашки, показатели снимали через 24 часа после посева, а затем каждые двое суток (3, 5, 7 день в культуре), путем инкубации с 0,1 мг/мл МТТ в течение 6 часов с

последующим 3-х часовым лизисом и определением оптической плотности при 600 нм. Полученные в результате эксперимента значения соотносили с числом клеток по предварительно построенному калибровочному графику. Калибровочный график, в котором показатели оптической плотности и соответствующее им число клеток находились в прямой зависимости, строили по 10 точкам. Индукцию экспрессии гена *tat* осуществляли добавлением ZnSO_4 до конечной концентрации 0,2 мМ в среду культивирования клеток при их посеве.

Оценку пролиферативной активности контрольных и трансфицированных линий ЭС клеток проводили цитохимическим методом с применением МТТ, как описано выше. Параллельно количество клеток в экспериментах оценивали с помощью их прямого подсчета под микроскопом в камере Горяева. Показатели снимали на 3-ий день после посева клеток.

Изучение дифференцировки клеток. Для выяснения возможного влияния гена *tat* на дифференцировку клеток PC12 под действием NGF клетки рассевали по 2 тыс на лунку в 96-луночные плашки в среду, содержащую 1 % эмбриональной сыворотки телят и 100 нг/мл NGF (фактор роста нервов). На 4-й день в культуральную среду добавляли свежий NGF до концентрации 100 нг/мл. В качестве контроля использовали исходные нетрансфицированные клетки PC12. Степень дифференцированности определяли на 7-ой день, визуально (под микроскопом, ув. x100) анализируя изменения морфологии клеток PC12. Дифференцированные под действием NGF клетки PC12 имели нейрональный фенотип.

Цитохимический тест для выявления активности щелочной фосфатазы. ЭС клетки высевали на покровные стекла с блокированным митомицином слоем фидерных фибробластов. Через сутки клетки фиксировали охлажденным ацетоном (+4° С) в течение 1 мин, высушивали на воздухе, после чего инкубировали в растворе AS-B1-фосфата и красителя

ВВ-синего в течение 1 ч при 37⁰ С. Окрашенные препараты исследовали под микроскопом. Недифференцированными считали клетки, дающие положительную реакцию на активность щелочной фосфатазы.

Иммуноцитохимический анализ. Клетки, полученные из эмбрионидных тел с сокращающимися кластерами клеток, фиксировали 4%-ным формальдегидом в фосфатно-солевом буфере (PBS) в течение 15 мин. После 4х-кратной отмывки PBS, клетки преинкубировали в PBS с 0,1% Тритон X-100 и 2-5% эмбриональной сыворотки телят в течение 5-15 мин. Для выявления кардиомиоцитов клетки инкубировали с мышинными моноклональными антителами к тропонину (любезно предоставлены проф. А.Г. Катрухой, кафедра биохимии Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова) для выявления кардиомиоцитов в течение ночи при температуре +4⁰ С, затем обрабатывали биотинилированными козьими антителами против IgG мыши и проявляли с помощью FITC, конъюгированного с авидином (ИМТЕК, Россия). Для определения экспрессии «зеленого белка» окрашенные клетки детектировали с использованием флуоресцентного микроскопа Аксиоскоп-2 (“Карл Цейсс”, Германия).

Статистическая обработка результатов экспериментов. Результаты обрабатывались с помощью программы Jandel Scientific SigmaPlot для Windows (Jandel Scientific), Statistica (StatSoft) и Origin для Windows. На графиках представлены средние значения с учетом стандартной ошибки. Определение достоверности различий проводилось с помощью теста multiway ANOVA. Достоверными считались отличия с $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Конструирование и анализ рекомбинантных плазмид с экспрессирующимися генами ВИЧ-1

pMTtat

Для конструирования рекомбинантной плазмиды с геном *tat*, экспрессирующимся в животных клетках, использовали плазмиду pRIP7 (любезно предоставлена S. Kim, США), содержащую провирус ВИЧ-1 (изолят HXB-2). Первоначально из pRIP7 выделяли 2,7 т.п.н. *EcoRI/BamHI*-фрагмент, в котором локализованы два транслируемых экзона гена *tat*, и субклонировали его в векторе pBS (плазмида pBStat). Затем в pBStat вставляли 1,75 т.п.н. *BaPI/XbaI*-фрагмент из pRIP7, содержащий часть LTR ВИЧ-1 (участки R и U5) и фланкирующую его область геномной ДНК человека (плазмида pBS/*tat* LTR). После делеции части фланкирующей области (удаление 1,4 т.п.н. *PstI*-фрагмента) в полученную плазмиду pTat вставляли 0,84 т.п.н. *EcoRI/SalGI*-фрагмент, содержащий промотор металлотионинового гена мыши. На рис. 1 приведена рестрикционная карта вставки в плазмиде pMTtat, содержащей два транслируемых экзона гена *tat* ВИЧ-1 (темные прямоугольники), промотор металлотионинового гена (MT-1) мыши (светлый прямоугольник) и длинный концевой повтор (LTR) ВИЧ-1 в качестве терминатора транскрипции (подчеркнуто).

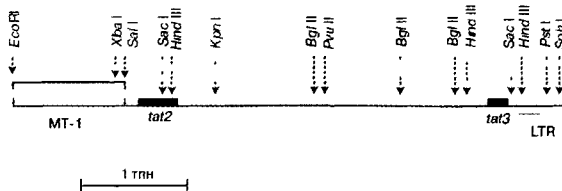


Рис. 1. Рестрикционная карта вставки в плазмиде pMTtat, содержащая два транслируемых экзона гена *tat* ВИЧ-1 (темные прямоугольники), промотор металлотионинового гена (MT-1) мыши (светлый прямоугольник) и длинный концевой повтор (LTR) ВИЧ-1 в качестве терминатора транскрипции (подчеркнуто).

pTat-neo

Для конструирования плазмиды, несущей одновременно гены *tat* и *neo* ВИЧ использовали *SalI/PstI*-фрагмент (с 5786 нуклеотида и до 3' конца провирусной ДНК, изолята HXB2, в котором делетирован участок, несущий ген *nef* - *BamHI/BglII*-фрагмент с 8475 по 9558 нуклеотид). *SalI/PstI*-фрагмент, содержащий 2-ой и 3-ий экзоны гена *tat* (1-ый и 2-ой транскрибируемые экзоны соответственно) и собственный сигнал полиаденилирования, был клонирован после затупления концов в экспрессионном векторе pcDNA3 (Invitrogen) по сайту *EcoRV*. Полученная плазмида *pTat-neo* несет ген устойчивости к неомицину и содержит ген *tat* под промотором цитомегаловируса. Структура сконструированной плазмиды представлена на рис. 2.

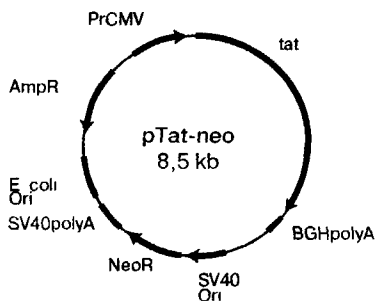


Рис. 2. Схема рекомбинантной плазмиды *pTat-neo*.

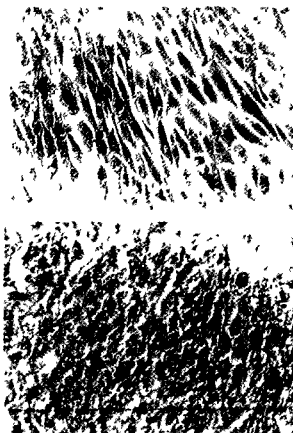
pNef и pNef-fs

Плазмида *pNef*, содержащая ген *nef* изолята HXB3 ВИЧ-1 (типа-1) (*HindIII/TaqI*-фрагмент, с 8306 по 8998 нуклеотид) под промотором цитомегаловируса (CMV) в векторе *pBC12/CMV*, а также контрольная плазмида, со сдвигом рамки в гене *nef* по сайту *XhoI* в позиции 8475 (*pNef-fs*), была любезно предоставлена докт. Hamme (Howard Hughes Medical Institute).

только плазмидой pSV2*neo* и полученную поликлональную культуру использовали как контрольную. Присутствие гена *tat* в культурах G418-резистентных клеток тестировали с помощью метода ПЦР, который показал наличие этого гена в pMT-*tat*/pSV2*neo*-трансфицированной культуре и его отсутствие в контрольных pSV2*neo*-трансфектантах. В результате проведения реакции был получен апликон размером 170 пар нуклеотидов.

Трансфицированные геном *tat* клетки Rat-2 образовали колонии, которые окрашивали метиленовым синим через 14 дней роста. Как показал морфологический анализ, сформировавшиеся колонии были многослойными. Морфология клеток (их форма) существенно изменена по сравнению с контрольными (рис. 4а, б). Еще одним контролем могут служить аналогичные эксперименты с геном *nef* (см. далее). В Rat-2, трансфицированных этим геном, также не наблюдали никаких изменений в морфологии клеток.

а



б

Рис. 4. Морфология нормальных (а) и трансфицированных геном *tat* (б) клеток Rat-2 (ув. 320 х).

Далее, для изучения влияния гена *tat* ВИЧ-1 на пролиферацию, клетки высевали на среде Игла с различным содержанием сыворотки – 1 % и 10 %. Анализ показал, что трансфицированные геном *tat* клетки характеризуются значительно более высокой пролиферативной активностью по сравнению с контрольными клетками. Наиболее существенные различия выявлялись на 4-й день при низкой концентрации сыворотки и в присутствии $ZnSO_4$, являющегося индуктором металлотионеинового промотора, контролирующего экспрессию гена *tat* в плазмиде pMT-*tat* (рис. 5).

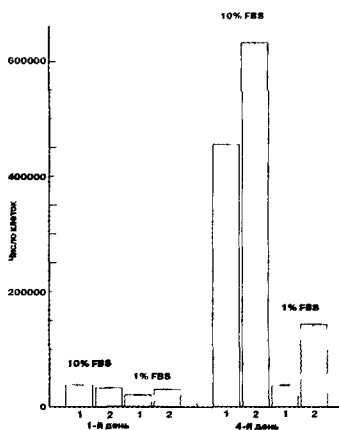


Рис. 5. Динамика роста поликлональных культур клеток Rat-2 в стандартных условиях культивирования в присутствии индуктора металлотионеинового промотора (ионов цинка). 1 – контрольная культура (трансфекция pSV2neo), 2 – *tat*-трансфицированная культура (ко-трансфекция pMT-*tat*/pSV2neo); ($p < 0,05$).

Онкогенный потенциал гена *tat* и кооперативный эффект

Для определения онкогенного потенциала гена *tat* проводили трансфекцию плазмидой pMT*tat* первичных фибробластов крысы. Через 14 дней роста клетки окрашивали метиленовым синим. В результате проведенного анализа было обнаружено, что в популяции клеток, трансфицированных плазмидой pMT*tat*, образуются фокусы трансформации,

которых не было в контроле (табл. 1). Это свидетельствует об онкогенном потенциале гена *tat*.

При котрансфекции гена *tat* с плазмидой, содержащей ген *Ha-ras*, наблюдали достоверный ($p < 0,05$) кооперативный эффект между двумя генами. Эффективность фокусообразования при совместном действии генов *tat* и *Ha-ras* была сопоставима с эффективностью фокусообразования при котрансформации клеток такими известными онкогенами, как *c-myc* и *Ha-ras*. Такой же достоверный кооперативный эффект на трансформирующую активность наблюдали у гена *tat* с геном *c-myc* и гена *tat* с геном *nef*.

Таблица 1. Эффективность образования фокусов трансформации при трансфекции первичных фибробластов эмбрионов крысы различными плазмидами*

Плазмиды, используемые для трансфекции	Число фокусов на $1,5 \times 10^5$ клеток	Эффективность трансформации	p, ошибка
контроль – трансфекция без плазмиды	не формируются	0	
pMT <i>tat</i>	$6,5 \pm 1,0$	$4,3 \times 10^{-5}$	$< 0,05$
pMT <i>tat</i> + pNef	$9,3 \pm 2,4$	$6,2 \times 10^{-5}$	$< 0,05$
pMT <i>tat</i> + pEJ6,6	$13,2 \pm 2,2$	$8,8 \times 10^{-5}$	$< 0,05$
pMT <i>tat</i> + pSVc- <i>myc</i>	$9,0 \pm 2,6$	$6,0 \times 10^{-5}$	$< 0,05$
pNef + pEJ6,6	не формируются	0	$< 0,05$
pNef	не формируются	0	$< 0,05$
pEJ6,6 + pSVc- <i>myc</i>	$15,1 \pm 1,5$	$1,0 \times 10^{-4}$	$< 0,05$

* Среднее из трех опытов

Морфология и пролиферативная активность клеток феохромоцитомы крысы (линия PC12), трансфицированных геном *tat*

Поликлональную *tat*-трансфицированную культуру клеток PC12 получали с помощью электропорации плазмидами pMT-*tat* и pSV2*neo* (в соотношении 10:1) с последующей селекцией котрансформантов на среде, содержащей антибиотик G418.

После трансфекции клетки высевали на среде RPMI с 15% сыворотки. G418-резистентные клетки, трансфицированные геном *tat*, и контрольные культуры клеток не проявляли видимых морфологических различий. Вместе с тем, как показано на рис. 6, трансфицированные геном *tat* клетки характеризовались значительно более высокой пролиферативной активностью по сравнению с контрольными клетками. Наиболее существенное различие в росте клеток (почти двукратное) выявлялось на 5-ый и 7-ой дни в присутствии $ZnSO_4$, индуктора металлотионеинового промотора, контролирующего экспрессию гена *tat* в плазмиде pMT-*tat*.

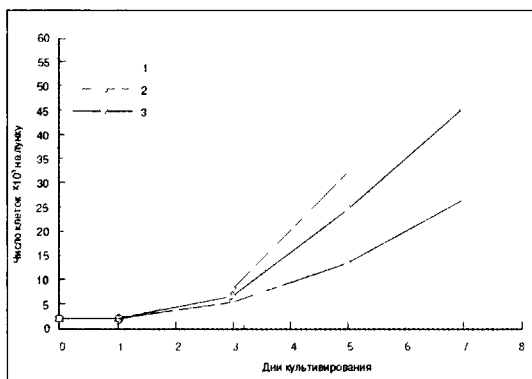


Рис. 6. Динамика роста поликлональных культур клеток PC12 в стандартных условиях культивирования 1 – контрольная культура (трансфекция pSV2neo), 2 – *tat*-трансфицированная культура (котрансфекция pMT-*tat*/pSV2neo), 3 – *tat*-трансфицированная культура в присутствии индуктора металлотионеинового промотора (ионов цинка); ($p < 0.05$).

Влияние генов *tat* и *nef* на пролиферацию и дифференцировку эмбриональных стволовых клеток мыши

В результате проведения трансфекции и последующей селекции ЭС клеток R1 были получены три различные линии клеток: *es-neok* (трансфекция

плазмидой pSV2neo) контроль, *es-tat* (трансфекция плазмидой pTatneo) и *es-nef* (трансфекция плазмидами pNef и pSV2neo). У всех трех полученных линий ЭС клеток не наблюдалось никаких изменений в морфологии. Одним из маркеров плюрипотентного статуса ЭС клеток млекопитающих является метод выявления активности щелочной фосфатазы. Все полученные линии клеток имели одинаковую положительную реакцию по активности этого фермента (рис. 7).

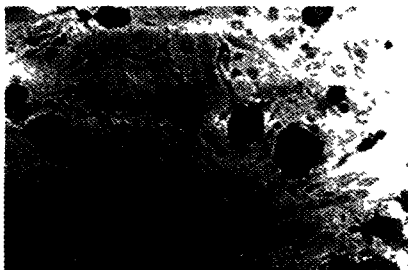


Рис 7 Выявление активности щелочной фосфатазы в ЭС клетках (окрашены колонии, сформированные ЭС клетками, неокрашены клетки фидерного слоя, ув. х 200).

Различия между линиями трансфицированных клеток обнаружены при изучении их пролиферативной активности. Пролиферация ЭС клеток линии *es-tat* выше, а пролиферация ЭС клеток линии *es-nef* ниже по сравнению с контрольными ЭС клетками линии *es-neok* (рис. 8). Использование для трансфекции плазмиды, содержащей ген *tat* под контролем металлотеининового промотора, приводило к аналогичным результатам.

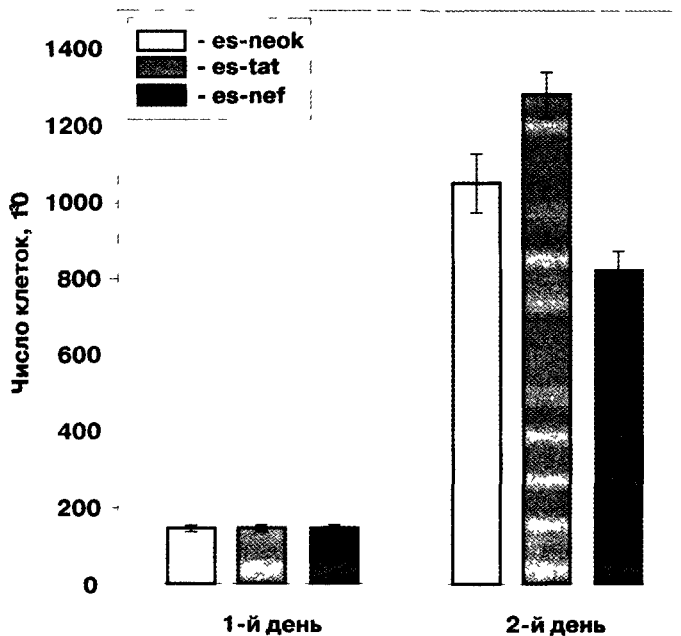


Рис. 8. Влияние регуляторных генов *tat* и *nef* ВИЧ-1 на пролиферацию ЭС клеток линии R1 ($p < 0,05$ - *es-tat* и *es-neok*; $p < 0,01$ - *es-nef* и *es-neok*).

Дифференцировка трансфицированных ЭС клеток

На следующем этапе исследовали влияние генов *tat* и *nef* на процессы спонтанной дифференцировки ЭС клеток.

Анализ спонтанной дифференцировки ЭС клеток линии R1 в отсутствие фидерного слоя фибробластов показал, что на 2-3 сутки после посева клеток формируются эмбриоидные тела. При переносе эмбриоидных тел на подложку с желатиной, они прикрепляются к субстрату, происходит миграция клеток из эмбриоидного тела по поверхности чашки и их дифференцировка в различные типы клеток (рис. 9).

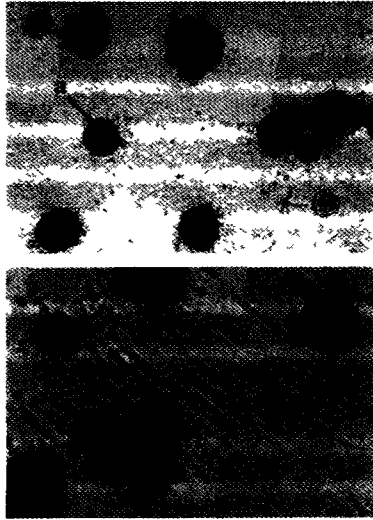


Рис. 9. Эмбрионидные тела, 3-4 сутки после прикрепления к желатиновой подложке. а - эмбрионидное тело, б - миграция клеток из эмбрионидного тела, увел.: об. х5, ок. х10.

В результате предварительных методических экспериментов показано, что эффективность образования эмбрионидных тел в клетках R1 зависит от количества клеток, высеваемых на поверхность чашки без фидерного слоя, способных образовывать эмбрионидные тела; от времени культивирования эмбрионидных тел до начала дифференцировки. При проведении экспериментов по спонтанной дифференцировке в клетках линии R1, на 4-5 сутки после прикрепления эмбрионидных тел к подложке, было обнаружено появление участков спонтанно сокращающихся клеток-кардиомиоцитов, что было подтверждено результатами иммуноцитохимического анализа с использованием антител к тропонину. Время развития кардиомиоцитов *in vitro* варьировало от 7 до 20 суток. Частота пульсации этих клеток также менялась в зависимости от времени после посева эмбрионидных тел. В первые сутки частота не превышала 60 сокращений в минуту, а затем она снижалась.

При изучении возможного влияния генов *tat* и *nef* на дифференцировку ЭС клеток проводили эксперименты, где определяли следующие показатели для всех трех линий клеток:

- 1) время, необходимое для формирования эмбрионного тела;
- 2) количество сформированных эмбрионных тел на 3-и сутки после посева клеток;
- 3) размер эмбрионного тела;
- 4) появление клеток с различной тканеспецифичностью (в наших экспериментах оценивалась дифференцировка ЭС клеток в кардиомиоциты).

В результате проведенных экспериментов было показано, что время для образования эмбрионных тел одинаково для ЭС клеток всех трех линий (*es-neok*, *es-tat*, *es-nef*). Значительных различий в размерах эмбрионных тел для этих линий также не обнаружено. Однако количество эмбрионных тел, сформированных клетками разных линий, несколько различалось: для линий *es-tat* оно было меньше, чем для линии *es-neok*, а в случае линии *es-nef*, наоборот, наблюдалось увеличение количества эмбрионных тел по сравнению с клетками линии *es-neok* (табл. 2). На 6-й день после прикрепления эмбрионных тел к подложке в ЭС клетках линий *es-neok*, *es-tat*, *es-nef* начинали появляться участки сокращающихся клеток-кардиомиоцитов. Количество эмбрионных тел с сокращающимися кардиомиоцитами увеличивалось в клетках линии *es-neok* и *es-nef* в период проведения эксперимента, а для клеток линии *es-tat* такого увеличения не наблюдалось. Процент эмбрионных тел с сокращающимися кардиомиоцитами был самый высокий для клеток линии *es-nef*, в клетках же линии *es-tat* он существенно снижался по сравнению с контрольными клетками (табл. 2).

Таблица 2. Влияние регуляторных генов ВИЧ-1 *tat* и *nef* на дифференцировку в кардиомиоциты клеток линии R1.

Линия клеток	Число эмбрионных тел на 3 день после посева 1000 кл/лунку	Число кластеров с сокращающимися кардиомиоцитами на 200 эмбрионных тел
<i>es-neok</i> (контроль)	10,00±0,80*	5,0
<i>es-tat</i>	6,27±0,33**	3,0
<i>es-nef</i>	14,05±1,80***	11,0

* $p < 0,01$ (*es-tat* и *es-neok*)

** $p < 0,05$ (*es-nef* и *es-neok*)

*** $p < 0,01$ (*es-tat* и *es-nef*)

Результаты представленных экспериментов позволяют заключить, что под влиянием гена *tat* наблюдается тенденция повышения пролиферативной активности ЭС клеток мыши и подавление ее под влиянием гена *nef*, что согласуется с данными, полученными на клетках крысы двух линий: псевдонормальных клетках Rat-2 и клетках феохромоцитомы PC12. Полученные данные также позволяют предположить, что регуляторные гены ВИЧ-1 *tat* и *nef* могут оказывать влияние как на ранние стадии дифференцировки ЭС клеток (на уровне эмбрионных тел), так и на процесс дифференцировки этих клеток в кардиомиоциты. Ген *tat* подавляет образование эмбрионных тел и препятствует их спонтанной дифференцировке в кардиомиоциты. Ген *nef* имеет противоположный эффект: способствует образованию эмбрионных тел и увеличивает долю сокращающихся кардиомиоцитов.

Результаты проведенных экспериментов показали, что повышение пролиферации клеток препятствует их дифференцировке, тогда как понижение пролиферации способствует некоторым дифференцировочным процессам.

В заключение необходимо отметить, что имеющиеся в настоящее время факты подчеркивают полифункциональность продуктов генов *tat* и *nef*, и позволяют заключить, что эффекты этих генов могут существенно отличаться в разных типах клеток, т.е. являются клеточно-специфичными.

Выводы

1. Регуляторный ген *tat* ВИЧ-1 увеличивает пролиферативную активность псевдонормальной линии клеток крысы (Rat-2), линии опухолевых клеток феохромоцитомы крысы (PC12) и R1 линии эмбриональных стволовых клеток мыши.
2. Регуляторный ген *tat* ВИЧ-1 обладает онкогенным потенциалом. Он вызывает морфологическую трансформацию псевдонормальной линии клеток крысы (Rat-2) и формирование фокусов трансформации в эмбриональных фибробластах крысы.
3. Существует кооперация между геном *tat* и известными онкогенами *c-Ha-ras* и *c-myc*, а также регуляторным геном *nef* ВИЧ-1, в трансформирующем эффекте на культуры клеток крысы.
4. Регуляторный ген *nef* ВИЧ-1 уменьшает пролиферативную активность псевдонормальной линии клеток крысы (Rat-2), линии опухолевых клеток феохромоцитомы крысы (PC12) и линии эмбриональных стволовых клеток мыши.
5. Регуляторный ген *nef* ВИЧ-1 инициирует образование многоядерных синцитиальных клеток только при трансфекции опухолевой линии феохромоцитомы крысы (PC12), что указывает на клеточно-специфическое действие этого гена.
6. Регуляторные гены *tat* и *nef* ВИЧ-1 оказывают влияние как на ранние стадии дифференцировки эмбриональных стволовых клеток (на уровне формирования эмбрионидных тел), так и на процесс спонтанной дифференцировки этих клеток в кардиомиоциты.

Список опубликованных работ по теме диссертации

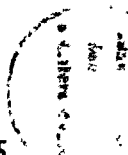
1. Шугурова И.М., Андреева Л.Е., Дубовая В.И., Зуева Л.А., Серова И.А., Тарантул В.З. Влияние генов *nef* и *tat* вируса иммунодефицита человека типа 1 на клетки грызунов *in vivo* и *in vitro*. Генетика, 1997, 33, 1202-1208.
2. Шугурова И.М., Бобрышева И.В., Гривенников И.А., Тарантул В.З. Эффекты генов *nef* и *tat* вируса иммунодефицита человека типа 1 на клетки феохромоцитомы крысы PC12. Генетика, 2000, 36, 1140-1146.
3. Шугурова И.М., Мануилова Е.С., Гривенников И.А., Тарантул В.З. Влияние генов *tat* и *nef* вируса иммунодефицита человека типа 1 на эмбриональные стволовые клетки мыши в культуре. Цитология, 2001, 43, 415-416. (Всероссийский симпозиум «Клеточная биология на пороге XXI века» (Санкт-Петербург, 17-19 октября 2000 г.).
4. Shugurova I, Bobrisheva I, Surkova I, Grivennikov I, Tarantul V. The expression of HIV-1 *tat* and *nef* genes induces cell-specific changes in growth properties and morphology of different types of rat cells. Cell Prolif. 2002 Aug; 35(4): 237-245.
5. Е.С. Мануилова, Е.Л. Арсеньева, Н.Н.Хайдарова, И.М. Шугурова, И.А. Гривенников, В.З. Тарантул. Влияние регуляторных генов (*tat*, *nef*) вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1) на пролиферацию и дифференцировку эмбриональных стволовых клеток мыши. Тезисы научных докладов III съезда Биохимического Общества, (Санкт-Петербург, 26 июня -1 июля 2002 г.) 407.
6. Мануилова Е.С., Арсеньева Е.Л., Хайдарова Н.В., Шугурова И.М., Горностаева С.Н., Иноземцева Л.С., Катруха А.И., Гривенников И.А., Тарантул В.З. Влияние регуляторных генов (*tat*, *nef*) вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1) на пролиферацию и дифференцировку эмбриональных стволовых клеток мыши. Онтогенез, 2003, 34, 204-210.

РНБ Русский фонд

2005-4

47939

19 МАЙ 2005



2293