

Експресія плазміди *pEGFP* у гепатоцитах мишей *in vivo*

С. П. Шпилеза, В. І. Андрієнко, О. К. Топорова, Г. С. Єлисеєва,
Ф. Аджаміян, Л. Г. Жарова, Л. І. Лихачова, В. А. Кордюм

Інститут молекулярної біології та генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 252143, Україна

Досліджено експресію гена *gfp in vivo* в гепатоцитах мишей. Як векторну молекулу використано транзиторну плазмиду *pEGFP-C1*, яку у складі ліпосом вводили безпосередньо в печінку тварин. Підібрано умови коректного тестування напрацьованого білка GFP, які виключали можливість появи артефактного свічення в живих гепатоцитах. Зелений флюоресціюючий білок GFP був ідентифікований у цитоплазмі гепатоцитів мишей через 6, 17, 24 год і до 7 діб включно після введення матеріалу в орган.

Всуп. За останні десятиріччя широкого розповсюдження набуло застосування класу білків, відкритих вперше у медузи *Aequorea victoria* з роду *Cnidaria*, які отримали назву green-fluorescent proteins (GFP). Ці білки *in vivo* випромінюють зелене світло, отримуючи енергію від люциферазо-оксилюциферинового збуджуючого комплексу або від Ca^{2+} -активованих фотобілків в залежності від виду [1, 2]. Ген *gfp* кодує поліпептидний ланцюг із 238 амінокислотних залишків, що утворюють мономерний білок з молекулярною масою 26,8 кДа [2, 3]. Очищений білок GFP поглинає голубе світло з максимумом при 395 нм та мінорним піком при 470 нм і випромінює зелене світло при 509 нм з плечем 540 нм [4, 5]. Починаючи з робіт групи [6], які вперше використали ген *gfp* як маркерний при вивченні експресії генів нематої *Caenorhabditis elegans* і в *Escherichia coli*, експресію дикого типу *gfp* та його мутантних форм (отримано мутанти з підвищеним коефіцієнтом збудження, що проявляють у багато разів інтенсивнішу флюоресценцію [7, 8] та мутанти із зміненими максимумами збудження і/або емісії, що призводило до зміни «кольорових» властивостей білка [9]) було продемонстровано на багатьох організмах, у тому чис-

лі — на дріжджах, рослинах, комах, ссавцях [3]. Відмічено, що білок GFP як репортерний має низку переваг у порівнянні з іншими відомими маркерними білками, такими як: β -глюкуронідаза (GUS), хлорамфеніколацетилтрансфераза (CAT), β -галактозидаза (LacZ), люцифераза (LUC), лужна фосфатаза і, що є суттєвим, для флюоресценції GFP не потрібно додаткових екзогенних кофакторів і субстратів або антитіл [10]. Флюоресцентний білок GFP можна виявляти в умовах безпосереднього опромінення при довжині хвилі 395 нм і завдяки цьому він є зручним інструментом при вивченні експресії генів у об'єктів, що належать до різних систематичних груп. Ще однією особливістю GFP, яка має важливе значення при проведенні довгострокових дослідів, є його нетоксичність і відсутність помітного впливу на метаболізм клітин, у яких він накопичується, висока стійкість до вицвітання [6]. Однак умови, за яких білок GFP можна тестувати в клітинах тварин при введенні в них рекомбінантних молекул з геном, що кодує цей білок, вивчено недостатньо.

Мета наших досліджень полягала у вивченні експресії плазміди *pEGFP-C1* та відпрацюванні умов коректного виявлення продукту експресії плазміди — зеленого флюоресціюючого білка GFP у гепатоцитах мишей в різні строки після введення генетичного матеріалу безпосередньо в печінку тварини.

© С. П. ШПИЛЕЗА, В. І. АНДРІЄНКО, О. К. ТОПОРОВА,
Г. С. ЄЛИСЕЄВА, Ф. АДЖАМІЯН, Л. Г. ЖАРОВА,
Л. І. ЛИХАЧОВА, В. А. КОРДЮМ, 1999

Матеріали і методи. Плазмідни. В експериментах використали рекомбінантну плазмідну *pEGFP-C1* фірми «Clontech» (США), яка містить ген *gfp*, що знаходиться під контролем сильного промотора цитомегаловірусу людини. Цей ген є кодон-оптимізованим відносно геному людини, а також має хромофорну мутацію, яка продукує флюоресценцію, в 35 разів інтенсивнішу, ніж дикий тип GFP (рис. 1).

Як контрольну плазмідну, що не мала гена *gfp*, використовували плазмідну *pUC19*.

Ліпосоми. Плазмідну ДНК переносили в орган за допомогою від'ємно заряджених моноламельярних ліпосом розміром від 10 до 100 нм. Плазмідну ДНК вміщували в ліпосоми, як описано в попередніх роботах [11, 12].

Об'єкт та ін'єкція матеріалу. Дослідження проводили на двомісячних гібридних мишах F1 (gBALB × C₃₇Bl). Плазмідну *pEGFP-C1* у складі ліпосом вводили безпосередньо в печінку мишей.

Об'єм ін'єкцій встановлювали експериментальним шляхом, орієнтуючись на стан тканини органу. Безпосередньо в печінку тварин вводили по 100, 80, 60, 40 і 20 мкл суспензії чистих ліпосом. Тварин забивали через 3—4 доби. Великі дози суспензії ліпосом (100, 80 мкл), які ін'єкували в печінку, викликали появу патологій в органі, що проявлялися в зміні кольору печінки на блідий, жовтуватий; тканина печінки ставала рихлою, збільшувалися міжклітинні проміжки, а сама цитоплазма гепатоцитів ставала помітно вакуолізованою. На препаратах гепатоцитів в цитоплазмі клітин спостерігалися скупчення невеликого розміру крапель, що в ультрафіолетовому світлі за кольором флюоресценції були схожі з ліпідами. Ліпідна природа цих крапель підтвердилася при забарвленні препарату Родаміном 6Ж. При менших об'ємах ін'єкцій ліпосомної суспензії ліпідних крапель у цитоплазмі не спостерігалося, а сама печінка мала нормальний здоровий вигляд. Таким чином, керуючись таким показником, як стан органу, в який вводили матеріал, та його клітин, був підібраний оптимальний об'єм та склад екзогенного матеріалу, який не викликав деструктивних змін в органі, а саме: 30—60 мкл.

Експерименти продовжували від 6 год до 7 діб. Окремі досліди мали 3—5-кратну повторність. Контролем для експериментів були інтактні тварини або тварини, яким вводили за тих самих умов фізіологічний розчин чи сторонню плазмідну, яка не напрацьовувала білка GFP.

Виготовлення препаратів гепатоцитів. Цитологічні препарати виготовляли з усіх часток печінки, що дозволяло отримати інформацію про

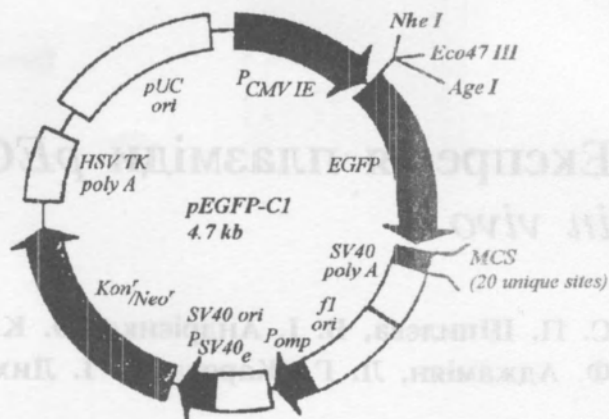


Рис. 1. Карта плазмідни *pEGFP-C1*

характер розподілу введеного екзогенного матеріалу в межах органу.

Звичайно для отримання ізольованих гепатоцитів хіміко-механічним способом використовується обробка печінки певними агентами, завдяки чому можна легко видалити розчинні солі кальцію з міжклітинного цементу [14]. Застосований нами традиційний метод обробки подрібненої тканини печінки трипсином в умовах термостату виявився непридатним для отримання окремих неушкоджених гепатоцитів через дуже швидке руйнування оболонки клітин та появу великої кількості детриту з вільними ядрами. При мацерації подрібненої тканини печінки в Na-цитратному буфері [11] зберігалася цілісність окремих клітин.

Морфологічну цілісність і функціональну інтактність гепатоцитів перевіряли на окремих препаратах, забарвлюючи їх 0,2 %-м трипановим синім [13]. Вихід неушкоджених гепатоцитів, які не забарвлювалися при відокремленні клітин, коливався в межах 85—95 %.

Дослідження цитологічних препаратів. Білок GFP, який світиться зеленим кольором при опроміненні світлом в діапазоні 340—400 нм, тестували в цитоплазмі гепатоцитів з використанням збуджуючого фільтра ФС1-2 та відсікаючих фільтрів — ЖС18 і ЖС19, об'єктиву X 40 на люмінесцентному мікроскопі МЛ-2. Мікрофотографії з препаратів зроблені на МФН-10.

Результати та обговорення. Випробувавши декілька способів фіксації тканини печінки мишей і зіткнувшись з можливістю помилкової інтерпретації картин, що спостерігалися, вирішено було запобігти впливові різних побічних факторів,

які спричинюються фіксацією матеріалу, і досліджувати нефіксовані гепатоцити. Цей спосіб дослідження має як свої переваги, так і негативні риси. З одного боку, з'являється можливість аналізувати максимально збережені клітини, які є життєздатними, а з іншого, — термін дослідження препаратів значно звужується і обмежується в середньому тридцятьма хвилинами.

При виконанні цієї роботи були випробувані різні середовища для препаратів гепатоцитів, у яких вони б зберігали свою життєздатність і не змінювали своєї морфології на час, потрібний для дослідження препарату під мікроскопом. Нейтральне середовище для клітин повинне було відповідати конкретним вимогам: не мати власної флюоресценції в ультрафіолетових променях та не впливати на дійсну флюоресценцію досліджуваних об'єктів, не проявляти шкідливого впливу на життєздатність гепатоцитів за час спостереження. Передбачалося, що цим вимогам мають відповідати, наприклад, культуральне середовище Хенкса та фізіологічний розчин.

На гепатоцитах печінки миші, якій введено плазмиду *pUC19* у складі ліпосом без гена, що експресує білок GFP, були випробувані різні концентрації середовища Хенкса з одночасним цитологічним контролем люмінесценції гепатоцитів. Розведення середовища в 10 разів стимулювало появу неспецифічного свічення клітин (рис. 2, *a*), а при використанні концентрованішого середовища

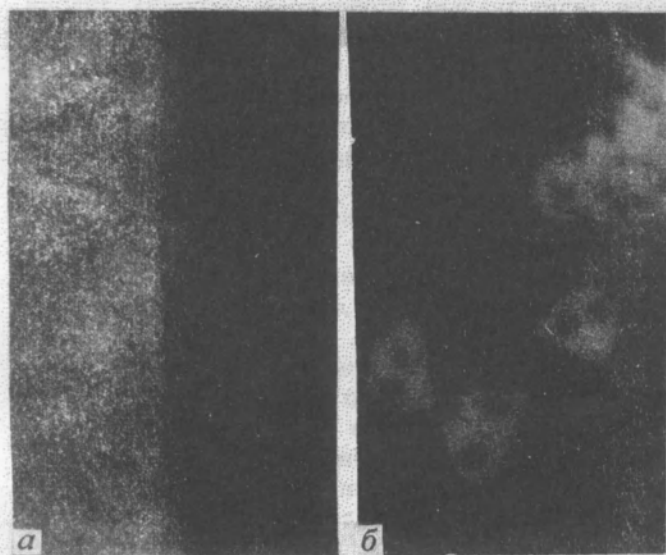


Рис. 2. Неспецифічне свічення цитоплазми гепатоцитів в середовищі Хенкса: *a* — розведеному у співвідношенні 1:10; *b* — у нерозведеному середовищі



Рис. 3. Автолюмінесценція живих гепатоцитів

значно підсилювалася інтенсивність флюоресценції, її спектр зсувався в жовту область. У нерозведеному середовищі інтенсивність флюоресценції була найбільшою (рис. 2, *a*). Таким чином, при порівнянні цих розведень очевидно, що інтенсивність флюоресценції інтактних гепатоцитів кожен раз зростала паралельно зростанню концентрації барвника цього середовища — фенолового червоного, що, власне, і спричинювало появу артефактного свічення клітин. Наступне ополіскування гепатоцитів фізіологічним розчином у певній мірі знімало це наведене артефактне явище. У фізіологічному розчині клітини добре зберігалися протягом всього часу мікроскопічного дослідження і не мали наведеного артефактного свічення.

Автолюмінесценція живих гепатоцитів дуже незначна і знаходиться в зеленій області спектра, де тестується продукт експресії гена *gfp*. Під дією ультрафіолетового опромінювання інтенсивність свічення цитоплазми частково зменшується, але не зникає повністю, ядра не флюоресціюють зовсім (рис. 3). Автолюмінесценція живих інтактних гепатоцитів контрольної миші і люмінесценція гепатоцитів тварин, яким вводили ненавантажені ліпосоми або плазмиду *pUC19* на ліпосомах, мали однакову інтенсивність свічення. Деякий внесок в автолюмінесценцію може привносити вітамін «А», вміст якого в печінці найбільший. Він виявляє яскраву флюоресценцію в гепатоцитах печінки і спостерігається у вигляді мікроскопічних включень яскравого жовтого кольору, але це свічення не-

сгійке і під дією ультрафіолету зникає протягом декількох секунд. Така надзвичайно короткострокова люмінесценція є характерною для гепатоцитів печінки і не робить ніякого внеску в кінцеву оцінку люмінесценції цитоплазми клітини, в якій є білок GFP.

Таким чином, відпрацьовані методичні прийоми з виготовлення та дослідження цитологічних препаратів гепатоцитів печінки мишей дозволили перейти до коректного дослідження маркерного білка GFP, напрацьованого в клітинах печінки мишей, яким вводили плазмідну конструкцію з відповідним геном.

Експериментальне введення мишам транзитornoї плазмідної *pEGFP-C1* у складі ліпосом і наступне тестування напрацьованого білка в гепатоцитах здійснювали через 6, 17, 24 год та 2, 3, 4, 5, 7 діб, що дозволило встановити ефективність роботи даної конструкції і способу її доставки в орган, термін експресії даного гена, а також виявити локалізацію напрацьованого білка в межах клітини.

Як видно з карти плазмідної (рис. 1), в гепатоцитах мишей вона повинна працювати в транзитornoму режимі. Останнє випливає з того, що *ori* в неї (крім *pUC*) клоновано з SV40. Цей *ori* забезпечує стабільну реплікацію тільки при наявності Т-антигена, що відбувається в спеціальних лініях клітин. Але те, що на 3—4-ту добу спостерігалось наростання люмінесценції, свідчить про присутність, принаймні до цього часу, введеної рекомбінантної молекули.

Найбільш ранніми строками, на яких нами досліджувалась експресія гена *gfp* і встановлена наявність напрацьованого білка GFP, були 6-та та 17-та години після ін'єкції екзогенного матеріалу. Специфічне свічення білка відмічено при ультрафіолетовому опроміненні на межі блакитної та зеленої областей спектра при довжині хвилі 509 нм. Через 6 год у частини гепатоцитів (приблизно 10 %) була добре помітною зелена люмінесценція білка GFP. Свічення білка було локалізовано в межах цитоплазми і не виявлялося в ядрах та ядерцях (рис. 4, а).

Одночасно з цим значна кількість гепатоцитів за інтенсивністю люмінесценції знаходилась на рівні контрольних. При подовженні строків дослідження до 17 год кількість гепатоцитів, що містили білок GFP (близько 20—30 %), та інтенсивність флюоресценції їхньої цитоплазми помітно зростали, що свідчило про поступове накопичення продукту експресії гена *gfp* (рис. 4, б). При візуальному спостереженні різниця в яскравості свічення клітин гепатоцитів, що містили білок GFP, через 17 і 24 год була незначною. Однак вже через 2, 3, 4 доби після

початку дослідження інтенсивність флюоресценції цитоплазми зростала досить помітно (рис. 4, в). При цьому флюоресценція спостерігалась в більшості гепатоцитів, і нетрансформованою залишалась зовсім незначна їхня кількість. Через 7 діб після ін'єкції плазмідної *pEGFP-C1* у складі ліпосом зелений флюоресціюючий білок GFP ще продовжував тестуватися в цитоплазмі гепатоцитів, однак інтенсивність флюоресценції цитоплазми була нижчою, ніж у клітинах, досліджуваних на більш ранніх строках. Беручи до уваги, що плазмідна конструкція, яку використовували в дослідках, була транзитornoю, очевидно, що люмінесценція, яка спостерігалась через 7 діб, відповідала білку, який був експресований раніше і продовжував зберігатися в клітині. Вірогідно, що при подовженні строків дослідів можна буде визначити, як довго зберігається напрацьований зелений флюоресціюючий білок GFP у клітинах печінки, якщо врахувати, що в експериментах використано транзитornoї плазмідної конструкцію.

Обов'язкове дослідження люмінесценції гепатоцитів, вилучених з усіх часток печінки тварини, дозволило встановити, що, як правило, продукт експресії плазмідної *pEGFP-C1* — зелений флюоресціюючий білок GFP тестується в усіх п'яти частках органу, хоча були окремі випадки, коли свічення в гепатоцитах мало місце лише в 1—2 частках, або ж гепатоцити з різних часток одного органу різнилися за інтенсивністю люмінесценції. Про можливість такого ж нерівномірного розподілу в тканині печінки введеного матеріалу сповіщалося раніше в роботі [15]. Крім того, під час експериментів з мишами потрібно було брати до уваги індивідуальні особливості окремих тварин. Це проявлялося в неоднаковій реакції на введений матеріал. Так, поряд з мишами, в гепатоцитах печінки яких спостерігалась значна кількість білка GFP, були окремі індивідууми, реакція на введений матеріал у яких могла бути слабо вираженою, або взагалі відсутньою.

Таким чином, результатами досліджень, проведених на модельному об'єкті — лабораторних мишах, показано ефективну експресію плазмідної *pEGFP-C1*, яку в складі ліпосом вводили безпосередньо в печінку тварин. Продукт експресії плазмідної — білок GFP накопичувався у достатній для візуального цитологічного спостереження кількості в цитоплазмі гепатоцитів і мав характерне зелене забарвлення при опроміненні ультрафіолетовими променями. Спостереження здійснювали на живих гепатоцитах, що дозволило отримати реальну картину розподілу білка в об'ємі окремої клітини і чітко встановити його практично рівномірне роз-

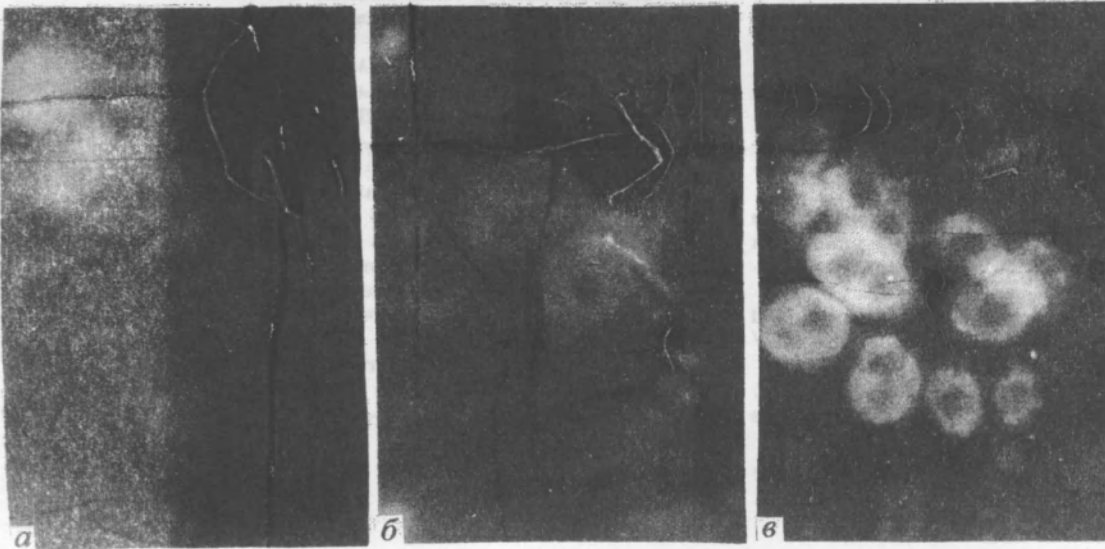


Рис. 4. Люмінесценція білка GFP у гепатоцитах миші: а — через 6 год.; б — через 17 год.; в — через 4 доби після введення в печінку плазмиди pEGFP-C1 у складі ліпосом

повсюдження у цитоплазмі і повну відсутність свічення в ядрах та ядерцях. Розроблений спосіб отримання окремих неушкоджених гепатоцитів та метод виготовлення препаратів, що забезпечував їхнє збереження протягом часу мікроскопічного дослідження, дозволили усунути проблему можливої появи артефактного свічення і отримання некоректних результатів. Залучення до подальшої роботи методів кількісної цитофотометрії дасть можливість отримати додаткову інформацію як відносно кількості експресованого екзогенного білка GFP у гепатоцитах, так і динаміки його накопичення в часі. Незважаючи на те, що наші дослідження були обмежені строком у сім діб, можна впевнено говорити про досить активну експресію плазмиди в гепатоцитах мишей, оскільки вже через 6 год після введення матеріалу в орган продукт експресії гена *gfp* спостерігався в цитоплазмі значної кількості клітин. Очевидно, екзогенний білок GFP у гепатоцитах печінки мишей протягом найдовших строків дослідів (7 діб) не виявляв токсичної дії на клітини, тому що як тварини, так і сам орган (печінка, її клітини), в який вводили матеріал, мали нормальний вигляд.

С. П. Шпилевая, В. И. Андриенко, Е. К. Топорова, Г. С. Елисева, Ф. Аджамиян, Л. Г. Жарова, Л. И. Лихачева, В. А. Кордюм

Експресія плазмиди pEGFP в гепатоцитах мишей *in vivo*

Резюме

Исследована експресія гена *gfp* *in vivo* в гепатоцитах мишей. В качестве векторной молекулы была использована транзи-

торная плазида pEGFP-C1, вводимая в составе липосом непосредственно в печень животных. Подобраны условия корректного тестирования наработанного белка GFP, исключая возможность появления артефактного свечения в живых гепатоцитах. Зеленый флюоресцирующий белок GFP был идентифицирован в цитоплазме гепатоцитов мышей через 6, 17, 24 ч и до 7 сут включительно после введения материала в орган.

S. P. Shpilevaya, V. I. Andrienko, E. K. Toporova, G. S. Eliseeva, F. Ajamian, L. G. Zharova, L. I. Likhacheva, V. A. Kordium

The expression of pEGFP plasmid genes in mouse hepatocytes *in vivo*

Summary

The expression of GFP plasmid gene was investigated in mouse hepatocytes. The transit pEGFP-C1 plasmid was used as a vector molecule which was enclosed into liposomes and was introduced into mouse liver by direct injection. The conditions were found for the correct testing of GFP protein synthesized in the cells considering the possibility of appearance of the artefact chining in alive hepatocytes. The green fluorescent GFP protein was identified in mouse hepatocyte cytoplasm in 6, 17, 24 hours up to 7 days long after the introduction of the material into the organ.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Morin J. G., Hastings J. W. Energy transfer in a bioluminescent system // J. Cell. Physiol.—1971.—77.—P. 313—318.
2. Prasher D. C., Eckenrode V. K., Ward W. W., Prendargast F. G., Cornier M. J. Primary structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein // Gene.—1992.—111.—P. 229—233.
3. Vander Wymelenberg A. J., Cullen D., Spear R. N., Schocnik B., Andrews J. II. Expression of green fluorescent protein in *Aureobasidium pullulans* and quantification of the fungus on leaf surface // Biotechnology Euro Edition.—1977.—23.—P. 686—690.
4. Bokman S. H., Ward W. W. Renaturation of *Aequorea* green

fluorescent protein // Biochem. and Biophys. Res. Commun.—1981.—101, N 4.—P. 1372—1380.

5. Wang J., Holden D., Leong S. Gene transfer system for *Ustilago maydis* based upon resistance to hydromycin B // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1988.—85.—P. 864—869.

6. Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W., Prasher D. Green fluorescent protein as a marker for gene expression // Science.—1994.—263.—P. 802—805.

7. Heim E., Cubitt A. B., Tsien R. Y. Improved green fluorescence // Nature.—1995.—373.—P. 663—664.

8. Zhang G. H., Gurtu V., Xian S. R. An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells // Biochem. and Biophys. Res. Commun.—1996.—227, N 3.—P. 707—711.

9. Heim E., Prasher D., Tsien R. Y. Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1994.—91.—P. 12501—12504.

10. Sheen J. S., Hwang, Niwa Y., Kobayashi H., Gulbraith D. M. Green fluorescent protein as a new vital marker in plant cells // Plant J.—1995.—8.—P. 777—784.

11. Костелжий И. Е., Штейлер С. П., Лихачева Л. И.,

Жарова Л. Г., Иродов Д. М., Кириллова В. С., Кордюм В. А. Экспрессия β -галактозидазы *Escherichia coli* в гепатоцитах мыши // Биополимеры и клетка.—1989.—5, № 2.—С. 51—54.

12. Билич К. М., Иродов Д. М., Кордюм В. А. Некоторые ультраструктурные аспекты прямого введения липосом, содержащих плазмидную ДНК, в печень мыши // Биополимеры и клетка.—1990.—6, № 1.—С. 81.

13. Seglen P. O. Effects of amino acids, amino acids and leupeptin on protein synthesis and degradation in isolated rat hepatocytes // Biochem. J.—1978.—174, N 3.—P. 469—474.

14. Уголев А. Т., Лукьянова Л. Д., Дудченко А. М. Получение изолированных гепатоцитов и общие характеристики их функционально-метаболического статуса // Гепатоцит. Функционально-метаболические свойства.—М.: Наука. 1985.—С. 9—37.

15. Benvenisty N., Reshef L. Direct introduction of genes into rats and expression of the genes // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1986.—83, N 24.—P. 3551—3555.

УДК 571.1
Надійшла до редакції 09.06.98