

## К ВОПРОСУ ИДЕНТИФИКАЦИИ И ИЗУЧЕНИЯ ПЕРЕНОСА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ МЕЖДУ КЛЕТКАМИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Во второй половине 20-го века широко распространились представления о горизонтальном перемещении генетического материала между организмами, в том числе, стоящими на разных ступенях эволюционной лестницы. Было показано, что в естественных условиях происходит перенос генов между прокариотами и эукариотами, симбионтами и в системе хозяин-паразит (1–3). На сегодняшний день в литературе утвердилось мнение, что горизонтальный перенос генов в природе является главным источником инноваций, механизмом быстрого приобретения и возникновения новых генов, способных радикально изменить свойства клеток, расширить их адаптационный потенциал.

В наших предыдущих публикациях описаны результаты экспериментов, продемонстрировавших передачу генетических признаков при культивировании генетически маркированных клеточных популяций. В опытах проводилось совместное экспонирование клеток СНО-К1 линии, несущей маркеры *pro-*, *neo+*, *gfp+*, *Tk<sub>hy</sub>*, *Hig+* (4,5) в течение 1 часа с клетками эмбриональной печени мыши, имеющей маркеры *pro+*, *neo-*, *gfp-*, *Tk<sub>hy</sub>*, *Hig-*. В процессе взаимодействия клеток этих культур происходила передача генетических маркеров от клеток печени клеткам СНО, которые приобретали способность расти на селективных средах (6). Длительное совместное культивирование клеток СНО, маркированных геном *gfp*, и комочков ткани печени эмбрионов мыши (*gfp-*) по-

зволило наглядно продемонстрировать передачу генетической информации между контактирующими клетками, что доказывалось появлением зеленой флуоресценции в клетках эмбриональной печени мыши. Это явление авторы объясняют проникновением гена *gfp* из клеток СНО в клетки ткани печени и его дальнейшей экспрессией, которая приводит к биосинтезу зеленого флуоресцирующего белка (GFP). Хотя были проведены контрольные исследования для доказательства того, что свечение обусловлено зеленым белком, синтезированным в клетках печени мыши, нельзя полностью исключить возможность того, что свечение могло быть вызвано, например, проросшими в кусочки печени клетками СНО. В связи с этим, нами была предложена следующая оригинальная система для выявления передачи генетической информации между клетками млекопитающих и ее наглядной демонстрации. Используемые в этой системе модельные объекты для передачи генетической информации удобны тем, что одни из них (эмбриональные фибробласты мышей в качестве клеток-реципиентов) способны к дальнейшему, после взаимодействия, росту в последующих пассажах, а вторые – (клетки периферической крови мышей, доноры генетического маркера), не дают роста при пересевах и не будут загрязнять материал клеток-реципиентов и искажать результаты достоверности переноса генетических маркеров из клеток-доноров в клетки-мишени.

### Материалы и методы

В качестве объектов исследования использованы эмбриональные фибробласты мышей линий BALB и ICR (2–3-й пассажи), а также клетки периферической крови мышей линии FVB-Cg-Tg (GFPU)5Nagy/J, синтезирующих “зеленый” белок (GFP). Клетки периферической крови выделяли центрифугированием в капиллярах цельной крови, содержащей антикоагулянт. Полученный слой лейкоцитов, содержащий нейтрофилы, лимфоциты, моноциты, а также примесь эритроцитов, отбирали, промывали в среде RPMI и ресуспендировали в среде ДМЭМ. Подсчитывали количество клеток крови и добавляли их к клеткам культуры тканей в примерном соотношении 10:1 соответственно.

Культивирование фибробластов с клет-

ками крови осуществляли в среде ДМЭМ с 10% ЭТС в течение 24 часов при 37° С и 5% CO<sub>2</sub>, после чего клетки крови снимали с поверхности фибробластов (отмыванием), а сами фибробласты продолжали выращивать на свежей среде ДМЭМ с 10% ЭТС в течение 3–5 суток при 37° С и 5% CO<sub>2</sub>. Затем фибробласты пересевали на аналогичную свежую среду и продолжали культивировать еще 5–7 дней в тех же условиях. После этого фибробласты фиксировали в парах формалина и проводили микроскопическое тестирование культур на наличие свечения “зеленого” белка GFP. Просмотр культур осуществляли как в люминесцентном микроскопе МЛ-2 (ЛОМО, Россия) с использованием фильтров для GFP (интерференционный фильтр с длиной

волны возбуждения 470 нм и отсекания 525 нм), так и на конфокальном микроскопе (конфокальную сканирующую микроскопию осуществляли на системе CarlZeiss Laser Scanning System LSM 510(CarlZeiss, Германия) (AXIOSKOP-2ZEISS).

Для лучшей визуализации клеток при просмотре препаратов цитоплазматические белки подкрашивались тиразиновым красным (Thiazine red R, Sigma), который относится к группе основных анилиновых красителей. Краситель наносился на препарат непосредственно перед его просмотром на конфокальном микроскопе. Желтая окраска цитоплазмы наблюдалась при возбуждении длиной волны 514 нм и использовании отсекающего узкополосного фильтра BP 530–600 нм. Рабочая концентрация красителя соответствовала 0,001%. Зеленый белок (GFP)

### Результаты и обсуждение

В контрольных вариантах опытов, где фибробласты не контактировали с клетками крови, несущими ген *gfp*, зеленое свечение отсутствовало полностью, либо оно было едва заметным и не превышало уровень автолюминесценции. Для выявления морфологии клеток фибробластов осуществляли подкраску фибробластов тиразином, при этом цитоплазма окраши-

наблюдали при возбуждении длиной волны 488 нм и использовании узкополосного фильтра BP505–530 нм.

Для предупреждения выгорания люминесценции препарата в течение сеанса конфокальной микроскопии использовали раствор фенилендиамина (Phenylendiamine) в качестве антипригарного препарата (anti-bleach agents) (7). Благодаря этому агенту люминесценция препарата практически не выгорала и он мог подвергаться анализу в течение длительного времени, что было важно в случаях получения многих срезов для дальнейшей реконструкции объемной картины клеток. Фенилендиамин использовался в концентрации 1мг в 80мкл PBC, pH 7,8, с добавлением 20 мкл глицерина и наносился на препарат непосредственно перед просмотром.

вается в хорошо визуализируемый желтый цвет, а для выявления «зеленого» белка (GFP) использовали соответствующие длины волн и получали возможность регистрировать его наличие или отсутствие (Рис.1, 1а – вариант с фибробластами линии BALB и 2, 2а – линии ICR; конфокальная микроскопия).

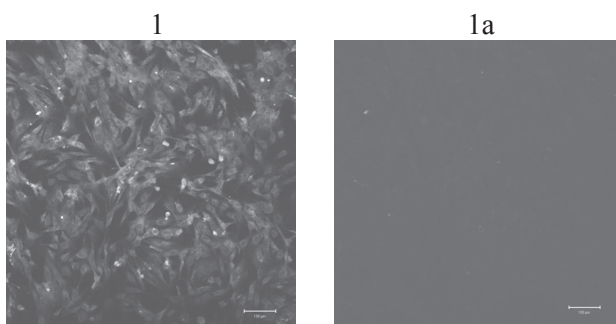


Рис. 1. Контроль. Фибробласты мыши линии BALB, подкраска тиразином; 1а – отсутствие свечения GFP

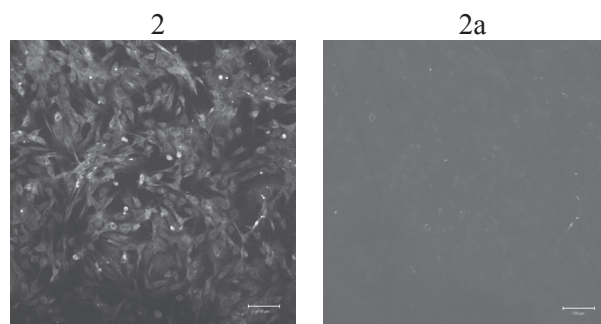


Рис. 2. Контроль. Фибробласты мыши линии, ICR, подкраска тиразином; 2а – отсутствие свечения GFP

После кокультивирования фибробластов мышей линий BALB и ICR с клетками крови, способными синтезировать GFP, у большинства фибробластов проявлялось зеленое свечение цитоплазмы, которое варьировало по интенсивности свечения отдельных клеток (Рис.3, 3а – вариант с фибробластами линии BALB и 4, 4а – линии ICR; конфокальная микроскопия). Необходимо отметить высокий процент клеток фибробластов, которые приобрели способность к синтезу GFP после контакта с клетками крови -

донорами гена этого белка.

Для проверки того, что свечение фибробластов не обусловлено контаминатами клеток крови “зеленой” мыши, параллельно с высевом фибробластов, осуществляли высев клеток крови в тех же условиях. Роста клеток крови не наблюдали, количество клеток крови не увеличивалось.

Таким образом, полученные результаты наших экспериментов достоверно демонстрируют возможность переноса генетического ма-

териала между клетками периферической крови и клетками фибробластов мышей с высокой эффективностью, идентификации этого процесса и позволяют предложить описанную систему мо-

дельных объектов для изучения переноса генетической информации между клетками млекопитающих.

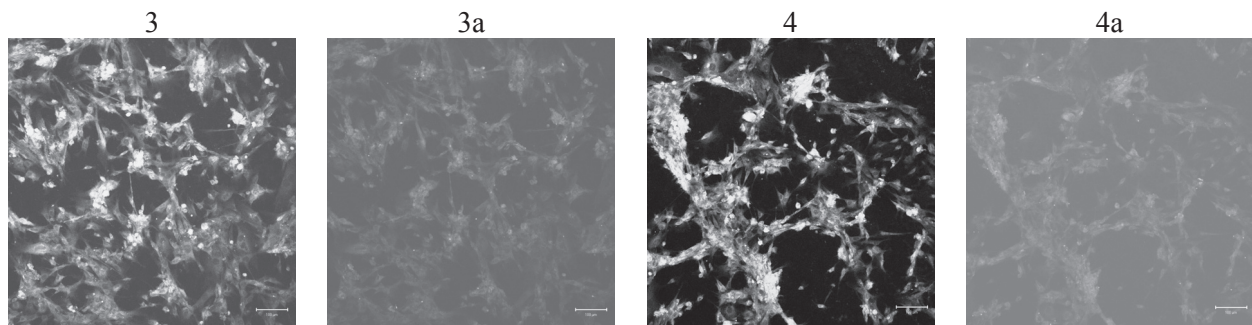


Рис. 3. Опыт. Фибробласты мыши линии BALB, подкраска тиразином; 3а – свечение GFP

Рис. 4. Опыт. Фибробласты мыши линии ICR, подкраска тиразином; 4а – свечение GFP

### Выводы

1. Предложена оригинальная система модельных объектов для изучения переноса генетической информации между клетками млекопитающих.
2. Продемонстрирована возможность пе-

реноса генетического материала между клетками периферической крови мышей, несущих ген *gfp*, и клетками фибробластов мышей линий BALB и ICR, а также показана возможность идентификации этого процесса.

### Литература

1. Шестаков С.В. Роль горизонтального переноса генов в эволюции // Семинар «Происхождение и эволюция живых систем» – Горный Алтай, 2003.
2. Шестаков С.В. О ранних этапах биологической эволюции с позиций геномики // Палеонтологический журнал. – 2003. – №6 – С. 50–57.
3. Шестаков С.В. Как происходит и чем лимитируется горизонтальный перенос генов у бактерий // Экологическая генетика. – 2007. – Т. 5 – С. 12–24.
4. Кордюм В.А., Топорова Е.К., Окунев О.В., Похолоенко Я.А., Сухорада Е.М., Рубан Т.А., Андриенко В.И., Иродов Д.М. Новая множественно маркированная линия клеток – производная от CHO-K1 // Биополимеры і клітина. – 2003. – Т. 19, №3. – С. 252–258.
5. Похолоенко Я.А., Сухорада О.М., Рубан Т.О., Топорова О.К., Окунев О.В., Андриенко В.И., Кордюм В.А. Створення трансгенних субліній ссавців з множинними маркерами селекції // Фактори експериментальної еволюції організмів. – Київ: Аграрна наука, 2003. – С. 399–404.
6. Кордюм В.А., Шпилева С.П., Рубан Т.А., Сухорада Е.М. Концепція обміну генетическим матеріалом між клітками млекопитающих // Биополимеры і клітина. – 2005. – Т. 21, №4 – С. 335–345.
7. Johnson, G.D., Davidson, R.S., McNamee, K.C., et al Fading of immunofluorescence during microscopy: a study of the phenomena and its remedy // J.Immun. Meth. – 1982. –Vol. 55. – P. 231–242.

**LIKHACHOVA L.I., SHPYLOVA S.P., RUBAN T.A., GULKO T.P., KORDIUM V.A.**

*Institute of Molecular Biology and Genetics National Academy of Sciences of Ukraine  
Ukraine, 03143, Kiev, Zabolotnogo str., 150, e-mail:kordium@imbg.org.ua*

### ON THE ISSUE OF IDENTIFICATION AND INVESTIGATION FOR TRANSFER OF GENETIC INFORMATION BETWEEN MAMMALIAN CELLS

**Aims.** Developing a model system for the study of transfer of genetic information between the cells of mammals is required to obtain reliable and reproducible results. **Methods.** An embryonic fibroblasts of mouse and white blood cells (WBC) of FVB–Cg–Tg (GFPU)5Nagy/J mouse strain that have expression of enhanced green fluorescent protein (EGFP) were used as objects of our investigation. After cocultivation for 24 hours of fibroblasts with blood cells WBC were removed from the surface of

fibroblasts and fibroblasts were passaged and incubate for 5–7 days more. After these fibroblasts were fixed and analyzed by standard fluorescence microscopy for GFP signals. **Results.** Microscopy results showed that fibroblasts are present with varying degrees of light intensity in the experimental probes. There were a low signal in order to autofluorescence in the control. **Conclusion.** These results demonstrate the feasibility of reliable transfer of genetic material between cells of WBC and fibroblasts of mice strains with high efficiency and allow us to offer this system as a model to studying the transfer of genetic information between the cells in mammals.

*Key words:* mice fibroblasts, the WBC of mice, the transfer of genetic information, GFP.

**ЛІСОВСЬКА Т.П., КУЗЬМІШИНА І.І., КОЦУН Л.О., ВОЙТЮК В.П.**

*Східноєвропейський національний університет імені Лесі Українки  
Україна, 43025, м. Луцьк, пр. Воли, 13, e-mail: tlisovska@ukr.net*

### **МЕЙОТИЧНА МУТАЦІЯ ТОМАТУ, ЩО КОНТРОЛЮЄ ВИХІД ІЗ МЕЙОЗУ**

У життєвому циклі організмів, які розмножуються статевим шляхом, відбувається редукція числа хромосом під час складного поділу – мейозу. Мейоз характеризується значною універсальністю у всіх досліджених на сьогодні організмах як за цитологічними стадіями, так і за третинною будовою і функцією білкових продуктів, які беруть участь в цьому процесі [1]. Вважають, що мейоз виник в процесі еволюції на основі механізмів генетичної рекомбінації і мітозу. Розрізняють не менше чотирьох основних відмінностей мейозу від мітозу. Перша відмінність полягає у синапсі і рекомбінації гомологічних хромосом під час профазі I мейозу. Внаслідок кросинговеру одночасно з когезією сестринських хроматид утворюються хіازми, які дозволяють орієнтуватися бівалентам у екваторіальній площині клітини до протилежних полюсів веретена поділу в мейозі I (першому поділі). По друге, сестринські хроматиди прикріплюються до одного полюса веретена поділу, тобто виявляють уніполярність центромер. Таким чином сестринські хроматиди розходяться до полюсів лише під час анафази другого мейотичного поділу. Монополярне прикріплення кінетохорів сестринських хроматид в мейозі фундаментально відрізняється від мітозу, де спостерігається біполярне прикріплення кінетохорів до протилежних полюсів веретена поділу. Третя значна відмінність виявляється у збереженні когезії між сестринськими хроматидами в ділянці, що оточує центромери, до анафази другого поділу мейозу. Нарешті, для мейозу характерна відсутність S – фази між двома поділами мейозу. В нормі мітотичні поділи не починаються без подвоєння кількості ДНК і реплікації хромосом, а в мейозі це правило порушується – відбувається супресія S – фази після першого мейотичного

поділу, що не заважає клітинам переходити до другого поділу [1, 12]. Ця остання принципова відмінність мейозу від мітозу забезпечує редукцію числа хромосом в дочірніх клітинах.

До генетичного контролю мейозу залучена велика кількість генів, про що свідчить існування багатьох неалельних мутацій, які впливають на нормальний перебіг мейозу, так званих мейотичних мутацій. У кукурудзи і арабідопсису – видів із найбільш значними колекціями мейотичних мутантів серед рослин – встановлено щонайменше 35 неалельних генів, які контролюють окремі ланки мейозу – від вступу в мейоз до закінчення цього процесу [9, 10].

Мейотичні мутації умовно класифікують за подіями, на які вони впливають під час мейозу. Розрізняють мутації, які викликають відсутність мейозу, відсутність першого поділу мейозу, синаптичні мутації, мутації, які впливають на мейотичну рекомбінацію, на другий поділ мейозу і т.д. [див. огляди: 6, 9, 10].

У роботі ми звертаємо увагу на групу мутацій так званого додаткового або третього поділу мейозу. Для мутантів цього типу характерним є наявність одного або кількох додаткових поділів мейозу після завершення нормального перебігу мейозу. Перед таким поділом не відбувається синтез ДНК і реплікація хромосом. Таким чином додатковий поділ є повторенням другого поділу мейозу, а нормальні алелі цих генів відповідають за вихід клітин із мейозу. Мутацій даного типу на сьогодні відомо небагато, їхня класифікація суперечлива (деякі автори відносять їх до мутацій порушення мітозів у мікрогаметогенезі), тому дослідження нових мутацій у різних видів надасть відповідь щодо причин спостерігаємих порушень.

До групи мутацій, які контролюють заве-