

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОЕ ТИПИРОВАНИЕ МАЛИГНАНТНЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЙ ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ BslI- И GluI-ПЦР-АНАЛИЗА

А.Г. АКИШЕВ, Д.А. ГОНЧАР, М.А. АБДУРАШИТОВ, С.Х. ДЕГТЯРЕВ*

НПО «СибЭнзим», Новосибирск

Метод BslI- и GluI-ПЦР-анализа был использован для определения статуса метилирования регуляторных областей генов-онкосупрессоров SEPT9b, IGFBP3, CEBPB, MGMT и RASSF1A в ДНК малигнанных клеточных линий HeLa, Raji, U-937 и Jurkat, а также в контрольной ДНК клеточной линии фибробластов L-68. BslI- и GluI-ПЦР-анализ показал, что регуляторные области генов-онкосупрессоров RASSF1A, SEPT9b, IGFBP3, CEBPB и MGMT могут как содержать метилированные последовательности 5'-RMGY-3', так и не иметь этих сайтов в зависимости от малигнантной клеточной линии, из которой выделялась ДНК. В ДНК исследованных клеточных линий наблюдались различные комбинации генов-онкосупрессоров с метилированными сайтами. При этом в здоровых клетках линии фибробластов L-68 не было обнаружено сайтов 5'-RMGY-3' ни в одной из упомянутых регуляторных областей. На основе полученных результатов предлагается применять BslI- и GluI-ПЦР-анализ для эпигенетического типирования малигнанных клеточных линий.

Ключевые слова: метилирование ДНК, метилзависимые ДНК-эндонуклеазы, BslI, GluI, эпигенетика, рак, клеточные линии.

Введение

Метилирование ДНК в геномах млекопитающих происходит главным образом по CpG-динуклеотидам и приводит к образованию 5-метилцитозиновых остатков (М) в обеих цепях ДНК. Во многих случаях регуляторные участки генов млекопитающих, включающие в себя промоторы и первые экзоны, содержат последовательности ДНК с повышенным содержанием G+C, называемые CpG-островками (Antequera F., 2003) [4]. Метилирование этих островков в регуляторных областях приводит к блокированию транскрипции и является, таким образом, механизмом эпигенетической регуляции активности генов.

В норме для ДНК каждой ткани характерен совершенно определенный набор функционирующих генов, тогда как остальные гены неактивны вследствие метилирования их регуляторных участков. Изменение статуса метилирования генов в той или иной ткани может привести к ее ненормальному функционированию

и возникновению заболеваний, в частности, развитию канцерогенеза (Bird A., 2002) [6]. Известно, что на ранних стадиях канцерогенеза происходит метилирование регуляторных областей ряда генов, являющихся активными в здоровой ткани (de Cáseres I.I. et al., 2007) [8]. Такое ненормальное (абберантное) метилирование было показано для целого ряда генов-онкосупрессоров в опухолевых тканях, причем оно сохраняется и в малигнанных клеточных линиях, полученных из этих тканей [2, 8]. Абберантное метилирование описано для нескольких десятков генов-онкосупрессоров, причем набор модифицируемых генов отличается в различных опухолях и малигнанных клеточных линиях (Mishra D.K. et al., 2010) [22].

Метилирование ДНК *de novo* у млекопитающих осуществляют ДНК-метилтрансферазы Dnmt3a и Dnmt3b, которые узнают последовательность 5'-RCGY-3' и модифицируют внутренний CG-динуклеотид (Handa V. et al., 2005) [13]. Прямое определение метилированных цитозинов в регуляторных участках генов-онкосупрессоров в препаратах ДНК из опухолевых тканей выявило наличие консенсусной последовательности 5'-RMGC-3'/3'-YGMG-5' (Kim S. et al., 2008) [21], которая соответствует продукту реакции метилирования ферментами Dnmt3a и Dnmt3b.

Недавно мы разработали метод GluI- и BslI-ПЦР-анализа, который позволяет определять наличие сайтов 5'-RMGY-3' и 5'-RMGCNGMGY-3', соответственно,

© 2011 г. Акишев А.Г., Гончар Д.А.,
Абдурашитов М.А., Дегтярев С.Х.

* **Автор для переписки:**

Дегтярев Сергей Харитонович

д.б.н., НПО «СибЭнзим»

630117 Новосибирск, ул. Академика Тимакова, 2/12

Тел.: 383-333-6854

E-mail: degt@sibenzyme.com

в изучаемом участке ДНК (Гончар Д.А. и др., 2010) [1]. Метод заключается в обработке ДНК метилзависимыми эндонуклеазами *GlaI* или *BlsI* и последующей ПЦР с праймеров, окаймляющих исследуемый фрагмент ДНК. Метод был применен для определения метилированных сайтов в регуляторных областях генов-онкосупрессоров *DAPK1*, *RASSF1A* и *RARB* [1].

В настоящей работе нами был использован *GlaI*- и *BlsI*-ПЦР-анализ для определения наличия сайтов 5'-RMGY-3' и 5'-RMGCNGMGY-3', соответственно, в области промотора и первого экзона генов-онкосупрессоров *SEPT9b*, *IGFBP3*, *CEBPD* и *MGMT* в препаратах ДНК из хорошо изученных малигнанных клеточных линий HeLa, Raji, U-937, Jurkat и из контрольной клеточной линии фибробластов L-68. Нами также проведено более детальное изучение метилирования регуляторного участка гена *RASSF1A* в указанных клеточных линиях.

BlsI- и *GlaI*-ПЦР-анализ показал, что изучаемые регуляторные области генов-онкосупрессоров *RASSF1A*, *SEPT9b*, *IGFBP3*, *CEBPD* и *MGMT* могут как содержать последовательности 5'-RMGY-3', так и не иметь этих метилированных сайтов в зависимости от малигнانتной клеточной линии, из которой выделялась ДНК. В исследованных клеточных линиях наблюдались различные комбинации генов-онкосупрессоров с метилированными сайтами. При этом в здоровых клетках контрольной линии фибробластов L-68 не было обнаружено сайтов 5'-RMGY-3' ни в одной из упомянутых регуляторных областей. Полученные результаты свидетельствуют о том, что определение статуса метилирования регуляторных областей генов-онкосупрессоров методом *BlsI*- и *GlaI*-ПЦР-анализа дает возможность как определять, так и дифференцировать малигнанные клеточные линии. То есть, метод *BlsI*- и *GlaI*-ПЦР-анализа может быть применен для эпигенетического типирования малигнанных клеточных линий человека.

Материалы и методы

Исследуемые области генома человека. В работе изучались пять участков ДНК: области промоторов и первых экзонов генов *RASSF1A* (Ras association domain family 1A), *SEPT9b* (septin 9b), *MGMT* (O6-methylguanine DNA methyltransferase), *IGFBP3* (insulin-like growth factor binding protein 3), а также промоторная область гена *CEBPD* (CCAAT/enhancer binding protein, delta).

Гидролиз геномной ДНК. В качестве субстратов для ПЦР использовались препараты ДНК, выделенной из пяти клеточных линий: L-68 (контроль, легочные фибробласты), HeLa (аденокарцинома шейки матки), Raji

(лимфома Беркитта), U-937 (гистиоцитарная лимфома) и Jurkat (Т-лимфобластная лейкемия). Геномная ДНК из линий клеток человека, эндонуклеазы рестрикции *HaeIII*, *TaqI*, *Tu9I*, метилзависимые сайт-специфические эндонуклеазы *BlsI* и *GlaI*, а также HotStart Taq-ДНК-полимераза — производства компании «СибЭнзим» (Новосибирск, Россия). ДНК из *Drosophila melanogaster* любезно предоставила Л.П. Захаренко.

5 мкг геномной ДНК расщепляли 50 ед. акт. *TaqI* или *Tu9I* в 50 мкл реакционной смеси в буфере, указанном производителем, при 65 °С в течение 2 ч (предварительная обработка). Фенольную экстракцию и последующую очистку ДНК проводили по стандартной методике (Sambrook J. et al., 2001) [26].

0,1 мкг предварительно обработанной ДНК инкубировали в 20 мкл реакционной смеси, содержащей либо 100 ед. акт. *HaeIII*, либо 16 ед. акт. *BlsI*, либо 16 ед. акт. *GlaI*, в реакционном буфере, рекомендованном производителем, при температуре 37 °С (для *HaeIII*) или 30 °С (для *BlsI* и *GlaI*) в течение 2 ч. После инкубации ферменты инактивировались путем прогрева (80 °С для *HaeIII*, 65 °С — в случае *BlsI* и *GlaI*) в течение 20 мин. 1 мкл реакционной смеси, содержащей 5 нг ДНК, использовали в ПЦР.

Полимеразная цепная реакция. Амплификацию проводили в 25 мкл реакционной смеси в приборе «Терцик» («ДНК-Технология», Россия) с использованием набора для GC-ПЦР, HotStart Taq ДНК-полимеразы и праймеров, указанных в таблице 1 (все препараты производства компании «СибЭнзим»). Детальные условия проведения ПЦР указаны в таблице 2.

ПЦР-продукты разделялись путем электрофореза в 1,2% агарозе «Low EEO, Type 1-A» («Sigma», США) в трис-ацетатном буфере (40 mM Трис-ацетат, pH 8,0; 1 mM ЭДТА). После проведения электрофореза ДНК визуализировали бромистым этидием и фотографировали в УФ-свете. Для оценки длин фрагментов использовали ДНК-маркер «100 bp» производства компании «СибЭнзим».

Результаты

Анализ метилирования ДНК. В настоящей работе с помощью метода *GlaI*- и *BlsI*-ПЦР-анализа было исследовано метилирование CpG-островков, расположенных в регуляторных участках нескольких генов-онкосупрессоров (*CEBPD*, *RASSF1A*, *SEPT9b*, *MGMT* и *IGFBP3A*). Расположение этих участков в человеческом геноме представлено в таблице 3 согласно сборке GRCh37.p5 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/assembly/grc/human/index.shtml>).

Таблица 1

Структура праймеров, использованных в ПЦР

Ген	Обозначение праймера	Структура
CEBPD	Cd1	5'-CCTGGAGTGCTGGCAGAGGGAGTGTС-3'
	Cr1	5'-GGGCCGGGCTCTGCGTCCAA-3'
MGMT	Md1	5'-GGCGTGCCGGCGTCCAGCG-3'
	Mr1	5'-GGAGCGAGGCGACCCAGACACTCACC-3'
IGFBP3	Id1	5'-GCAGGTGCCCCGGGCGAGTCTCGA-3'
	Ir1	5'-CTCCCCGACGCGCACCCAGCA-3'
RASSF1A	Rd1	5'-CCGGATGTGGGGACCTCTTCCTCTAGC-3'
	Rd2	5'-GCCATGTCTGGGGGAGCCTGAGCTCA-3'
	Rr1	5'-CTGTGGCCCAGATACGAGTGGAGTGCAC-3'
	Rr2	5'-GGCCACTACTCACGCGCGCACTGCA-3'
	Rr3	5'-GCTCAATGAGCTCAGGCTCCCCCGAC-3'
SEPT9b	Sd1	5'-CTGCCCCAATAACAGCCTCCTGCAGAAGG-3'
	Sd2	5'-CGCCTTCCTCCCCCATTCATTCAGCTG-3'
	Sd3	5'-CGACCCGCTGCCCACCAGCCATC-3'
	Sr1	5'-CCCTAGGCCCCCTGGCTCAGCTG-3'
	Sr2	5'-CGTTGACCGCGGGGTCCGACATG-3'
	Sr3	5'-CGAGGAGGTCGCTGTCTGCTTGGCA-3'

Таблица 2

Условия проведения ПЦР

Ген	Длина фрагмента ПЦР	Первичная денатурация		Амплификация							Заключительная стадия	
				Число циклов	1. Денатурация		2. Отжиг		3. Полимеризация			
		t°	Время		t°	Время	t°	Время	t°	Время	t°	Время
CEBPD	341 bp	95 °C	2 мин.	38	96 °C	15 сек.	67 °C	20 сек.	72 °C	25 сек.	72 °C	1 мин.
MGMT	356 bp	95 °C	5 мин.	38	96 °C	15 сек.	71 °C	20 сек.	72 °C	25 сек.	72 °C	1 мин.
IGFBP3	817 bp	95 °C	5 мин.	38	95 °C	20 сек.	70 °C	20 сек.	72 °C	50 сек.	72 °C	1 мин.
RASSF1A	804 bp	95 °C	2 мин.	38	95 °C	20 сек.	68 °C	20 сек.	72 °C	50 сек.	72 °C	1 мин.
	385 bp	95 °C	2 мин.	38	95 °C	20 сек.	69 °C	20 сек.	72 °C	25 сек.	72 °C	1 мин.
	266 bp	95 °C	2 мин.	38	95 °C	15 сек.	71 °C	20 сек.	72 °C	20 сек.	72 °C	1 мин.
SEPT9b	432 bp	95 °C	3 мин.	38	96 °C	15 сек.	69 °C	20 сек.	72 °C	30 сек.	72 °C	1 мин.
	197 bp	95 °C	3 мин.	38	96 °C	15 сек.	70 °C	20 сек.	72 °C	20 сек.	72 °C	1 мин.
	399 bp	95 °C	2 мин.	38	96 °C	15 сек.	71 °C	20 сек.	72 °C	30 сек.	72 °C	1 мин.

**Расположение изучаемых областей генов-онкосупрессоров в геноме человека
(в соответствии со сборкой GRCh37.p5)**

Регуляторная область гена	Хромосома	Локализация	Расположение исследованных фрагментов	Число сайтов для	
				GlaI	BlsI *
CEBPD	8	8p11.2-p11.1	515 093 – 515 433	11	1
MGMT	10	10q26	2 499 161 – 2 499 516	16	0
IGFBP3	7	7p13-p12	45 951 065 – 45 950 249	41	1
RASSF1A	3	3p21.3	50 318 593 – 50 317 790	26	1
SEPT9b	17	17q25	40 643 169 – 40 644 107	33	3

Примечание: * Принимались во внимание только сайты RCGCNGCGY

Структура регуляторных областей всех изучаемых генов-онкосупрессоров приведена на рисунке 1. Как показано на этом рисунке и в таблице 3, число сайтов 5'-RCGY-3' и 5'-RCGCNGCGY-3' в выбранных фрагментах ДНК существенно различается. Нами проводилось определение метилированных сайтов 5'-RMGY-3' и 5'-RMGCNGMGY-3' в регуляторных областях генов-онкосупрессоров в препаратах ДНК из пяти клеточных линий; четыре из них — это известные культуры малигнанных клеток (HeLa, Jurkat, Raji и U-937), а пятая — линия фибробластов L-68, использовавшаяся в качестве контроля. До проведения анализа все препараты геномной ДНК обрабатывались эндонуклеазой рестрикции, которая не содержит сайтов узнавания в выбранных фрагментах (Ttr9I в случаях SEPT9b и IGFBP3, TaqI для остальных случаев), в соответствии с процедурой предобработки ДНК, применяемой для бисульфитного анализа генома (Clark S.J. et al., 1994) [9].

Все препараты ДНК из клеточных линий по отдельности обрабатывались:

- 1) ферментом рестрикции, сайты которого имеются в изучаемой области ДНК (HaeIII) — положительный контроль;
- 2) GlaI (узнает 5'-RMGY-3', Tarasova G.V. et al., 2008 [29]);
- 3) BlsI (узнает 5'-RMGCNGMGY-3', <http://russia.sibenzyme.com/info800.php>);
- 4) в качестве отрицательного контроля использовались препараты, не обработанные ферментами.

После инкубации ДНК в четырех реакционных смесях служила матрицей для проведения ПЦР. Анализ ПЦР-продуктов осуществляли с применением электрофореза, а не с помощью ПЦР в реальном времени, ввиду относительно больших длин части получаемых фрагментов

ДНК (два фрагмента с длинами более 800 п.н.). ДНК из *Drosophila melanogaster* в той же концентрации использовалась в качестве отрицательного контроля ПЦР. На рисунке 2 показаны результаты GlaI- и BlsI-ПЦР-анализа пяти регуляторных участков.

CEBPD. На рисунке 2а представлены данные GlaI- и BlsI-ПЦР-анализа промоторной области гена CEBPD. Как видно из этого рисунка, продукт ПЦР длиной 341 п.н. присутствует в положительном контроле (дорожки 5, 9, 13, 19 и 23) и отсутствует при гидролизе ДНК из клеток Raji и U-937 ферментами GlaI и BlsI (дорожки 11, 12, 17 и 18). В изучаемом фрагменте ДНК находится всего одна последовательность 5'-RCGCNGCGY-3', которая в случае метилирования может расщепляться ферментом BlsI (5'-GCGCAGCGC-3', рис. 1а). Согласно результатам BlsI-ПЦР-анализа, данная последовательность остается неметилированной в ДНК L-68, HeLa и Jurkat и превращается в полностью метилированную последовательность 5'-GMGCAGMGC-3'/3'-CGMGTCGMG-5' в клетках Raji и U-937.

Таким образом, согласно данным GlaI- и BlsI-ПЦР-анализа, как минимум два метилированных сайта 5'-RMGY-3' присутствуют в CpG-островке в промоторной области гена CEBPD в ДНК из Raji и U-937, тогда как в препаратах ДНК из контрольной линии L-68 и малигнанных линий HeLa и Jurkat изучаемый фрагмент ДНК длиной 341 п.н. не содержит метилированных сайтов 5'-RMGY-3'. Полученные данные свидетельствуют об активности гена CEBPD в клетках контрольной линии L-68 и малигнанных линий HeLa и Jurkat, в то время как в клетках Raji и U-937 этот ген, по-видимому, не активен из-за наличия метилированных сайтов 5'-RMGY-3' в промоторной области.

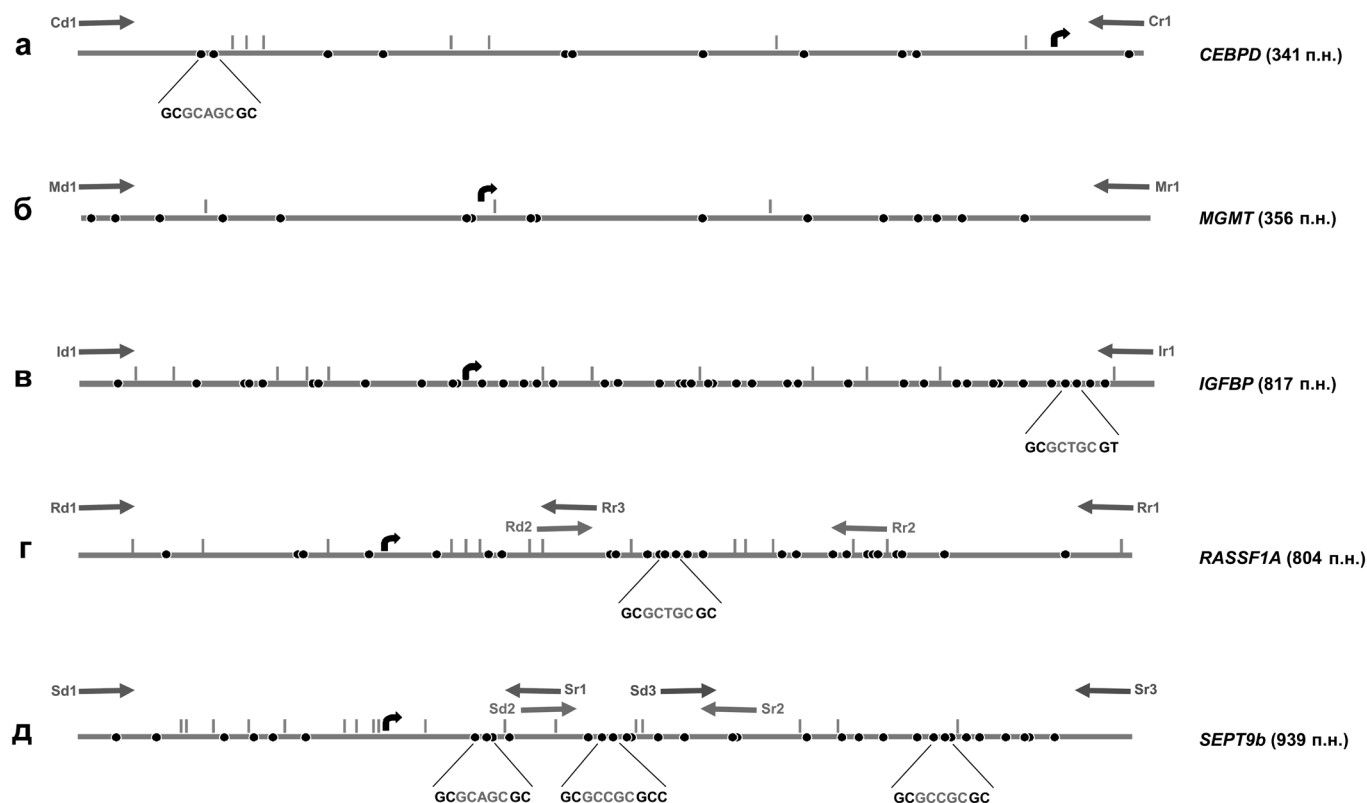


Рис. 1. Схемы регуляторных областей генов *CEBPD*, *RASSF1A*, *SEPT9b*, *MGMT* и *IGFBP3*. Сайты узнавания эндонуклеазы рестрикции *HaeIII* обозначены вертикальными черточками. Сайты 5'-RCGY-3' обозначены кружочками. Сайты 5'-RCGCNGCGY-3' вынесены ниже. Старт транскрипции обозначен изогнутой стрелкой. Размер фрагмента ДНК указан справа от каждой схемы. Расположение праймеров отмечено стрелками

Как сообщалось ранее, отсутствие белка *CEBPD* в клетках вызывает геномную нестабильность, включая перестройки хромосом, с последующей потерей контроля над клеточным ростом (Huang A.M. et al., 2004) [16]. Интересно, что такие хромосомные перестройки описаны как для клеток *Raji* (Karpova M.B. et al., 2005) [19], так и для клеток *U-937* (Strefford J.C. et al., 2001) [28]. Следовательно, наши результаты подтверждают предполагаемую связь между выключением гена *CEBPD* и некоторыми разновидностями лейкемии.

MGMT. Рисунок 2б демонстрирует результаты *GlaI*- и *BlsI*-ПЦР-анализа области промотор/первый экзон гена-онкосупрессора *MGMT*. Продукт ПЦР длиной 356 п.н. образуется во всех случаях *GlaI*-ПЦР-анализа, за исключением препарата ДНК из клеток *U-937* (рис. 2б, дорожка 17). Поэтому можно заключить, что CpG-островки в области промотор/первый экзон гена *MGMT* имеет как минимум один сайт 5'-RMGY-3' в клетках *U-937*, тогда как в остальных малигнанных клеточных линиях и контрольных клетках *L-68* этот фрагмент ДНК не содержит сайтов 5'-RMGY-3'. *BlsI*-ПЦР-анализ дает отрицательный результат для препаратов

ДНК из всех клеточных линий, что, вероятно, связано с отсутствием сайтов 5'-RCGCNGCGY-3' в изучаемом участке ДНК (рис. 16).

Экспрессия гена *MGMT* ранее изучалась в *U-937*, *Jurkat*, *Raji* и некоторых других клеточных линиях. Активность гена не была выявлена в клетках *U-937*, однако довольно высокая активность этого гена была обнаружена в клетках *Jurkat* и *Raji* (Horton T.M. et al., 2009) [15]. Полученные нами результаты соответствуют этим данным литературы.

IGFBP3. На рисунке 2в представлены результаты *GlaI*- и *BlsI*-ПЦР-анализа регуляторной области гена *IGFBP3*. Фрагмент ДНК рассчитанной длины (817 п.н.) образуется при амплификации ДНК из контрольной линии клеток *L-68* и малигнанных клеток *HeLa* при гидролизе ДНК как *GlaI*, так и *BlsI* (дорожки 3–4 и 7–8), в то время как этот фрагмент не наблюдается при ПЦР-анализе препаратов ДНК из других малигнанных клеточных линий.

В анализируемом фрагменте ДНК длиной 817 п.н. присутствует всего одна последовательность 5'-RCGCNGCGY-3', которая в случае метили-

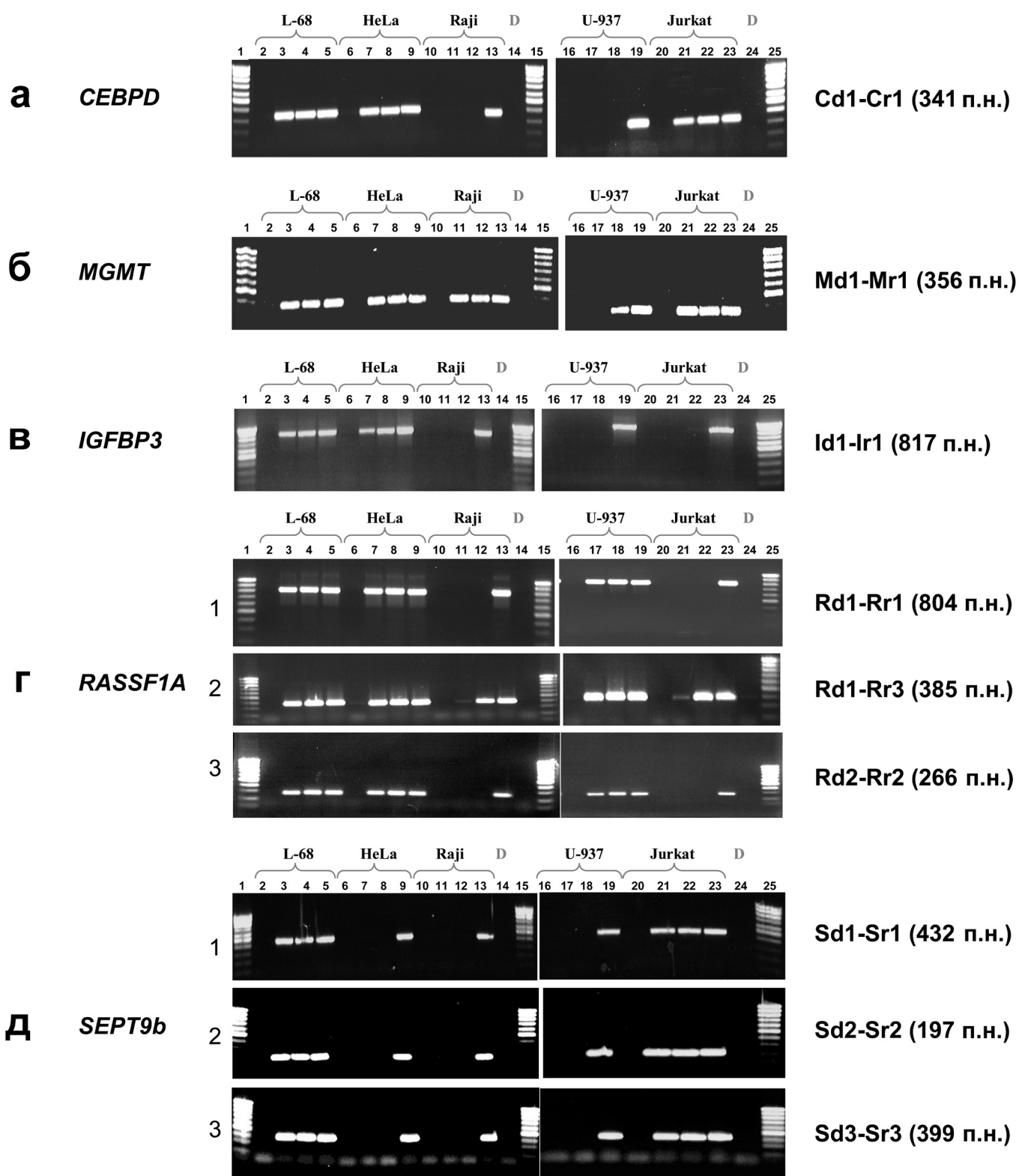


Рис. 2. BlnI- и GluI-ПЦР-анализ выбранных областей. Предобработанная ДНК из L-68 (2–5), HeLa (6–9), Raji (10–13), U-937 (16–19), Jurkat (20–23); ДНК из *Drosophila melanogaster* (14 и 24); HaeIII (2, 6, 10, 16, 20); GluI (3, 7, 11, 17, 21); BlnI (4, 8, 12, 18, 22); без добавления фермента (5, 9, 13, 19, 23); ДНК маркер «100 бп» (1, 15, 25). Обозначения праймеров для ПЦР (см. рис. 1) и длины областей показаны справа

рования может расщепляться ферментом BslI (5'-GCGCTGCGT-3', рис. 1в). В соответствии с полученными результатами последовательность 5'-GCGCTGCGT-3' остается неметилированной только в ДНК L-68 и HeLa и превращается в метилированную последовательность 5'-GMGCTGMGT-3'/3'-CGMGACGMA-5' в клетках Jurkat, Raji и U-937. Таким образом, согласно данным Glal- и BslI-ПЦР-анализа, как минимум два метилированных сайта 5'-RMGY-3' присутствуют в регуляторной области гена IGFBP3 в ДНК из клеточных линий Jurkat, Raji и U-937, тогда как в препаратах ДНК из контрольной линии L-68 и малигнанных линий HeLa исследуемая область промотора и первого экзона не содержит метилированных сайтов 5'-RMGY-3'.

Ранее было найдено, что уровень белка IGFBP3 в раковых клетках может уменьшаться во время развития некоторых онкологических заболеваний, включая рак простаты (Miyake H. et al., 2000) [23], эндометриоидную карциному яичника (Torng P.L. et al., 2009) [30] и рак прямой кишки (Kawasaki T. et al., 2007) [20]. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что метилирование регуляторной области гена IGFBP3 и, вероятно, последующее падение уровня соответствующего белка происходят и в случае лейкоэмических заболеваний, хотя инактивация данного гена не наблюдается в клетках рака шейки матки линии HeLa.

RASSF1A. Нами раньше был проведен Glal- и BslI-ПЦР-анализ ДНК фрагмента длиной 804 п.н., содержащего CpG-островок регуляторной области гена RASSF1A, и было показано, что он содержит сайты 5'-RMGY-3' только в клетках Raji и Jurkat [1]. На рисунке 2г представлены результаты более детального анализа распределения метилированных сайтов 5'-RMGY-3' в этом фрагменте ДНК. Помимо целого фрагмента 804 п.н., нами были отдельно проанализированы промоторная область гена RASSF1A (фрагмент ДНК длиной 385 п.н.) и часть первого экзона (фрагмент ДНК длиной 266 п.н.) с расположенной внутри него последовательностью 5'-GCGCTGCGC-3' (рис. 1г). На рисунке 2г приведены результаты Glal- и BslI-ПЦР-анализа трех указанных фрагментов ДНК. ПЦР продукт расчетной длины наблюдается при анализе всех трех фрагментов в случае препаратов ДНК из контрольной линии клеток, а также ДНК из клеток HeLa и U-937 cells (дорожки 3–4, 7–8, 17–18 на рисунке 2г). Не наблюдается целевого ПЦР продукта при амплификации фрагментов 804 п.н. и 266 п.н. при анализе ДНК из клеток Raji и Jurkat (ряды 1 и 3, дорожки 11–12, 21–22), что

объясняется метилированием вышеуказанной последовательности 5'-GCGCTGCGC-3' с образованием сайта 5'-GMGCTGMGT-3'/3'-CGMGACGMA-5', расщепляемого ферментом BslI [1].

Не такая однозначная картина наблюдается в случае Glal-ПЦР-анализа фрагмента длиной 385 п.н. На данном фрагменте BslI-ПЦР-анализ дает отрицательный результат при исследовании всех препаратов ДНК (ряд 2, дорожки 4, 8, 12, 18, 22), что, вероятно, связано с отсутствием внутри него сайтов 5'-RCGCNGCGY-3'. В то же время Glal-ПЦР-анализ показал наличие метилированных сайтов 5'-RMGY-3' в изучаемом фрагменте только в клетках Raji и Jurkat (ряд 2, дорожки 11 и 21), что соответствует данным, полученным при анализе фрагментов 804 п.н. и 266 п.н. Однако следует отметить, что если фрагменты 804 п.н. и 266 п.н. отсутствуют при Glal-ПЦР-анализе ДНК из клеток Raji и Jurkat (ряды 1 и 3, дорожки 11 и 21), то в случае фрагмента 385 п.н. ПЦР продукт все-таки образуется, хотя и в меньшей степени, чем в контроле (дорожки 13 и 23).

Изучение метилирования области промотор / первый экзон гена RASSF1A проводилось также в работах других авторов [10, 14, 25]. Кроме того, осуществлялось и детальное исследование этого участка в клетках рака молочной железы (Yan P.S. et al., 2003) [31]. В ряде клеточных линий авторы выявили значительную степень метилирования первого экзона на участке, содержащем сайт 5'-GCGCTGCGC-3', и менее выраженное метилирование области промотора, что соответствует нашим данным.

SEPT9b. Регуляторный участок гена SEPT9b включает в себя три сайта 5'-GCGCNGCGC-3', расположенные после старта транскрипции (рис. 1д) и расщепляемые BslI в случае их метилирования. Мы проводили Glal- и BslI-ПЦР-анализ отдельно для трех участков ДНК, каждый из которых содержал один сайт 5'-GCGCNGCGC-3', определяя таким образом статус метилирования трех соседних перекрывающихся между собой фрагментов на всей области промотор/первый экзон (432, 197 и 399 п.н.). Данные, приведенные на рисунке 2д, показывают, что все три фрагмента метилированы одинаково для каждой из клеточных линий. Амплифицированные фрагменты ДНК с рассчитанными длинами наблюдаются только в случаях контрольных клеток фибробластов и клеток линии Jurkat (рис. 2д, ряды 1–3, дорожки 3–4 и 21–22). Полученные результаты свидетельствуют, что сайт 5'-GMGCNGMGC-3' присутствует в каждом анализируемом участке в ДНК из клеток HeLa, Raji и U-937, тогда как эти последователь-

ности не метилированы во всей регуляторной области в клетках L-68 и Jurkat.

Аберрантное метилирование регуляторной области гена SEPT9b в опухолевых клетках было описано у больных раком прямой кишки (Gruetzmann R. et al., 2008) [12]. Результаты нашего исследования показывают, что аномальное метилирование по сайтам 5'-GMGCNGMGC-3' также обнаруживается и в других малигнанных клетках.

Обсуждение

Определение статуса метилирования регуляторных областей генов-онкосупрессоров методом Glal- и BlsI-ПЦР-анализа. Метилирование ДНК в регуляторных областях генов-онкосупрессоров является основной причиной их инактивации (Jones P.A. and Baylin S.B., 2002) [18] и наблюдается на ранних стадиях развития канцерогенеза (de Cáseres I.I. et al., 2007) [8]. В связи с этим определение статуса метилирования этих участков ДНК является важной задачей при ранней диагностике онкопатологии. В последнее время для выявления метилированных оснований применяется метод бисульфитной конверсии ДНК, который позволяет проводить прямое определение 5-метилцитозинов в интересующем участке ДНК (Grigg G.W., 1996) [11]; однако этот метод имеет ряд недостатков и в повседневной клинической практике фактически не используется. В настоящей работе разработанный нами метод Glal- и BlsI-ПЦР-анализа [1] был применен для определения сайтов 5'-RMGY-3' и 5'-RMGCNGMGY-3' в регуляторных областях генов-онкосупрессоров SEBPD, RASSF1A, SEPT9b, MGMT и IGFBP3. Результаты, полученные методом Glal- и BlsI-ПЦР-анализа, показали хорошее соответствие с данными литературы по анализу регуляторных участков генов-онкосупрессоров методом бисульфитной конверсии ДНК. При этом метод Glal- и BlsI-ПЦР-анализа является простым в исполнении и в большинстве случаев дает однозначный результат (есть метилированные сайты 5'-RMGY-3' или нет), а в случае BlsI-ПЦР-анализа полученный результат был однозначным во всех экспериментах. BlsI-ПЦР-анализ продемонстрировал либо наличие сайтов 5'-RMGCNGMGY-3' в изучаемом фрагменте во всех анализируемых молекулах ДНК той или иной клеточной линии, либо их полное отсутствие. Это позволяет рассматривать Glal- и BlsI-ПЦР-анализ как простой и однозначный метод определения статуса метилирования регуляторных областей генов-онкосупрессоров.

Распределение сайтов 5'-RMGY-3' в регуляторных участках. Ранее мы использовали Glal-ПЦР-анализ для определения метилирования ДНК в регуляторном участке гена RARB в малигнанных линиях клеток HeLa, Jurkat, Raji, U-937 и контрольной линии клеток L-68 [1]. При этом было выявлено наличие сайта 5'-RMGY-3' во всех опухолевых клетках и отсутствие такового в клетках фибробластов. BlsI-ПЦР-анализ регуляторной области гена DAPK1 показал, что метилированная последовательность 5'-GMGCCGMGC-3'/3'-CGMGGCGMG-5' присутствует только в ДНК клеток Raji [1].

Результаты, полученные в настоящем исследовании, вместе с данными, опубликованными ранее [1], представлены в таблице 4.

Эта таблица включает в себя результаты определения статуса метилирования регуляторных участков генов-онкосупрессоров RARB, DAPK1, SEBPD, RASSF1A, SEPT9b, MGMT и IGFBP3 методом Glal- и BlsI-ПЦР-анализа. Как видно из таблицы 4, Glal- и BlsI-ПЦР-анализ выявил различные комбинации регуляторных участков генов-онкосупрессоров с метилированными сайтами 5'-RMGY-3' во всех пяти клеточных линиях человека.

BlsI-ПЦР-анализ дает отрицательный результат при изучении генов RARB и MGMT, вероятно, ввиду отсутствия сайтов 5'-RCGCNGCCGY-3' в регуляторных областях этих генов, тогда как Glal-ПЦР-анализ позволяет установить различие в статусе метилирования данных участков ДНК в изучаемых клеточных линиях. Если в случае гена RARB сайты 5'-RMGY-3' присутствуют в регуляторной области в ДНК всех изученных малигнанных линий, но не клеток контрольной линии фибробластов, то CpG-островки гена MGMT содержит данный сайт только в клетках U-937 (см. табл. 4).

С помощью Glal-ПЦР-анализа и BlsI-ПЦР-анализа были получены одинаковые результаты при изучении метилирования регуляторных областей генов-онкосупрессоров SEBPD, IGFBP3, SEPT9b и RASSF1A, за исключением промоторной области последнего. Однако при этом препараты ДНК из всех изученных клеточных линий различаются по комбинациям метилированных генов: промотор гена SEBPD метилирован лишь в клетках Raji и U-937; промотор и первый экзон гена RASSF1A метилированы только в клетках Raji и Jurkat; промотор и первый экзон гена SEPT9b метилирован в клетках U-937, Raji и HeLa; промотор и первый экзон гена IGFBP3 метилирован в клетках U-937, Raji и Jurkat.

Объединенные данные результатов BslI- и GlalI- ПЦР-анализа

Метод		GlalI-ПЦР-анализ		BslI- / GlalI-ПЦР-анализ				BslI-ПЦР-анализ
Клеточная линия	Ген	RARB	MGMT	CEBPD	IGFBP3	RASSF1A	SEPT9b	DAPK1
L-68 фибробласты легкого		-	-	-	-	-	-	-
HeLa аденокарцинома шейки матки		+	-	-	-	-	+	-
Raji лимфома Беркитта		+	-	+	+	+	+	+
U-937 гистиоцитарная лимфома		+	+	+	+	-	+	-
Jurkat Т-лимфобластная лейкемия		+	-	-	+	+	-	-

GlalI-ПЦР-анализ промоторной области гена RASSF1A в ДНК из клеток Raji и Jurkat показал, что в отличие от фрагментов 804 и 266 нуклеотидов, содержащих сайт 5'-RMGY-3' во всех молекулах анализируемых ДНК, последовательность 5'-RMGY-3' присутствует во фрагменте 385 п.н. лишь в части молекул ДНК данных клеток. Можно предположить, что в клетках Raji и Jurkat промоторная область гена RASSF1A содержит сайт 5'-RMGY-3' только в одной аллели генома, тогда как в первом экзоне данного гена последовательность 5'-GMGCTGMGC-3' с двумя сайтами 5'-RMGY-3' присутствуют в обеих аллелях хромосомного набора клеток. Дальнейшая работа по GlalI-ПЦР-анализу данной области ДНК в режиме реального времени даст возможность проверить сделанное предположение.

Анализ структуры ДНК в области сайтов узнавания BslI. При BslI-ПЦР-анализе регуляторных участков генов-онкосупрессоров было найдено, что каждый из семи сайтов 5'-RCGCNGCCGY-3' (с учетом ранее исследованного регуляторного участка гена DAPK), присутствующих в изучаемых фрагментах ДНК (см. рис. 1 и работу [1]), метилирован, по крайней мере, в одной малигнантной клеточной линии. В случаях CpG-островков генов IGFBP3 и SEPT9b эти сайты метилированы в трех разных клеточных линиях (за исключением линий HeLa и Jurkat, соответственно). В регуляторных областях генов CEBPD и RASSF1A эти

последовательности метилированы в двух различающихся клеточных линиях (Raji, U-937 и Raji, Jurkat, соответственно). Сайт 5'-GCCCGCGC-3' в CpG-островке гена DAPK1 метилирован только в клетках Raji. Таким образом, сайты 5'-RCGCNGCCGY-3' в регуляторных областях генов-онкосупрессоров метилированы в различных комбинациях в зависимости от клеточной линии, из которой выделялась ДНК, однако каждый из сайтов метилирован в ДНК хотя бы в одной клеточной линии. На рисунке 3 представлена нуклеотидная последовательность семи фрагментов ДНК, которые содержат сайты 5'-RCGCNGCCGY-3'. Сравнительный анализ структуры ДНК не выявил какого-либо сходства окрестностей сайтов у всех фрагментов. Тем не менее следует отметить, что каждый из фрагментов содержит прямые повторы, окружающие сайты 5'-RCGCNGCCGY-3'. Эти повторы имеют длину 5–6 п.н. и располагаются на разных расстояниях от сайта 5'-RCGCNGCCGY-3'. При этом они состоят преимущественно из G и C нуклеотидов.

Типирование малигнантных клеточных линий. Присутствие метилированных сайтов 5'-RMCGNGMGY-3' в исследованных регуляторных участках генов DAPK1, CEBPD, IGFBP3, RASSF1A и SEPT9b, отличающееся для изученных малигнантных клеточных линий, позволяет предложить простой способ типирования опухолевых клеточных линий на основе результатов GlalI- и/или BslI-ПЦР-анализа указанных участков ДНК.

	1	50
DAPK1	GGAGCTGGGAGGAGCAGCGAGCGCCGCGCAGAACCCGCGAGCGCCGGCCCTGGC	
SEPT9b-2	TCTGCACTGCAGGAGCGCGGGCGCGGCGCCAGCCAGCGCGCAGGGCCCCGG	
IGFBP3	GTGAGCCGCCCGCGCCAGGTGCGCTGCGTGACAGCACCCGCGCGCACTGGCGCC	
SEPT9b-1	GAGGCGGGGGCGGGGCGGGGCGCAGCGCGCGGGGAGGGGCGGGCGCCCCGCC	
RASSF1A	CCCGGCTGGAGCGTGCCAACGCGCTGCGCATCGCGCGGGGACCGCGGTGCAA	
SEPT9b-3	CAGGCGCCCTCCCGCTGAGAGCGCGCGCGCCCCGGCCCCGTGCCCGCGCC	
CEBPB	AGGGAGTGTTCATTCCCAGCAGCGCAGCGCAGGCCGGCCCCGGGCGGGGAGGG	

Рис. 3. Структура ДНК в регуляторной области генов-онкосупрессоров в районе последовательности 5'-RCGCNCGCY-3'. Серым фоном выделены сайты метилирования, формирующие сайт 5'-RCGCNCGCY-3'.

Прямые повторы ДНК выделены подчеркиванием

Важно отметить, что результатом такого *GlaI*- и/или *BlsI*-ПЦР-анализа является либо наличие, либо отсутствие ПЦР продукта, что дает возможность достаточно просто получать и интерпретировать результаты анализа.

Аутентификация клеточных линий — это очень важная проблема современной биологии. Хорошо известно, что многие из клеточных линий, поддерживаемых в лабораториях, неправильно идентифицированы или загрязнены [7, 24, 27]. Для аутентификации клеточных линий используется большое число методов, таких как изоферментный анализ, кариотипирование, однонуклеотидный полиморфизм (SNP), полиморфизм длин амплифицированных фрагментов (AFLP). Недавно в качестве стандарта характеристики и определения клеточных линий, а также для подтверждения чистоты культур клеток был предложен метод профилирования коротких tandemных повторов (STR) [3, 5]. Для использования цитологических и биохимических методов идентификации (морфологические наблюдения, кариотипирование и изоферментный анализ) требуются серьезные различия в свойствах и внешнем виде клеток. Эти методы обычно недостаточно надежны и не пригодны в качестве обычных лабораторных процедур. Современные молекулярные подходы, основанные на вариабельности ДНК, более точны, и прогресс в стандартизации некоторых из них может иметь большое значение для клеточной биологии и онкологии.

Однако ни один из перечисленных методов не учитывает эпигенетический аспект при идентификации клеточных линий, который особенно важен для клеточных линий, выделенных из раковых опухолей. Известно, что статус метилирования определенных участков ДНК является существенным признаком малигнантности, при этом различия в метилировании CpG-островков наблюдаются у многих из малигнантных

клеточных линий (Issa J.-P., 2004) [17]. Таким образом, определение статуса метилирования регуляторных областей генов-онкосупрессоров представляется ключевым критерием при определении и дифференциации малигнантных клеточных линий. В настоящей работе показано, что комбинация статусов метилирования семи регуляторных участков генов-онкосупрессоров различается в каждой из анализируемых малигнантных клеточных линий (см. табл. 4). То есть, *BlsI*-ПЦР-анализ регуляторных областей ДНК может быть использован для быстрой эпигенетической характеристики малигнантных клеточных линий.

Заключение

GlaI- и *BlsI*-ПЦР-анализ был применен для определения статуса метилирования регуляторных участках генов-онкосупрессоров человека SEPT9b, IGFBP3, CEBPD, MGMT и RASSF1A. Статус метилирования регуляторных участков генов-онкосупрессоров определялся по наличию в них метилированных сайтов 5'-RMGY-3'. Каждая из исследованных малигнантных клеточных линий (HeLa, Raji, U-937 и Jurkat) отличается от других по комбинации регуляторных участков, содержащих метилированные сайты 5'-RMGY-3'. ДНК из клеток контрольной линии фибробластов L-68 не содержит сайтов 5'-RMGY-3' ни в одной из упомянутых регуляторных областей.

GlaI- и *BlsI*-ПЦР-анализ:

а) промоторной области гена CEBPD установил наличие метилированных сайтов 5'-RMGY-3' в ДНК в клетках Raji и U-937;

б) области промотор / первый экзон гена RASSF1A показал метилирование ДНК в клетках Raji и Jurkat;

в) области промотор / первый экзон гена SEPT9b выявил метилирование ДНК в клетках U-937, Raji и HeLa;

г) области промотор / первый экзон гена IGFBP3 продемонстрировал метилирование ДНК в клетках U-937, Raji и Jurkat.

GlaI-ПЦР-анализ области промотор / первый экзон гена MGMT выявил метилирование ДНК только в клетках U-937.

Эти результаты позволяют определять статус метилирования регуляторных участков генов-онкосупрессоров методом GlaI- и BslI-ПЦР-анализа и рассматривать его результаты как специфическую характеристику малигнанных клеточных линий. Такая характеристика может оказаться полезной для определения малигнанных клеточных линий и дополнить другие методы типирования этих клеток.

Литература

1. Гончар Д.А., Акишев А.Г., Дегтярев С.Х. BslI- и GlaI-ПЦР анализ — новый метод исследования метилированных участков ДНК // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова — 2010. — Т. 6. — № 1 — С. 5–12.
2. Киселева Н.П., Лихтенштейн А.В. Эпигенетические изменения в опухолевых клетках. Роль метилирования ДНК в канцерогенезе. Канцерогенез / Под ред. Д.Г. Заридзе. — М.: Медицина, 2004. — С. 191–203.
3. Alston-Roberts C., Barallon R., Bauer S.R., Butler J., Capes-Davis A. et al. Cell line misidentification: the beginning of the end // Nat. Rev. Cancer — 2010. — Vol. 10. — P. 441–448.
4. Antequera F. Structure, function and evolution of CpG island promoters // Cell. Mol. Life Sci. — 2003. — Vol. 60. — P. 1647–1658.
5. Barallon R., Bauer S.R., Butler J., Capes-Davis A., Dirks W.G. et al. Recommendation of short tandem repeat profiling for authenticating human cell lines, stem cells, and tissues // In Vitro Cell Dev. Biol. Anim. — 2010. — Vol. 46. — P. 727–732.
6. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory // Genes. Dev. — 2002. — Vol. 1. — P. 6–21.
7. Capes-Davis A., Theodosopoulos G., Atkin I., Drexler H.G., Kohara A. et al. Check your cultures! A list of cross-contaminated or misidentified cell lines // Int. J. Cancer. — 2010. — Vol. 127. — P. 1–8.
8. de Cáseres I.I., Cairns P. Methylated DNA sequences for early cancer detection, molecular classification and chemotherapy response prediction // Clin. Transl. Oncol. — 2007. — Vol. 9. — P. 429–437.
9. Clark S.J., Harrison J., Paul C.L., Frommer M. High sensitivity mapping of methylated cytosines // Nucleic Acids Res. — 1994. — Vol. 22. — P. 2990–2997.
10. Feng Q., Hawes S.E., Stern J.E., Wiens L., Lu H. et al. DNA methylation in tumor and matched normal tissues from non-small cell lung cancer patients // Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. — 2008. — Vol. 17. — P. 645–654.
11. Grigg C.W. Sequencing 5-methylcytosine residues by the bisulphite method // DNA Seq. — 1996. — Vol. 6. — P. 189–198.
12. Gruetzmann R., Molnar B., Pilarsky C., Habermann J.K., Schlag P.M. et al. Sensitive detection of colorectal cancer in peripheral blood by septin 9 DNA methylation assay // PLoS One. — 2008. — Vol. 3(11). — e3759.
13. Handa V., Jeltsch A. Profound sequence preference of Dnmt3a and Dnmt3b mammalian DNA methyltransferases shape the human epigenome // J. Mol. Biol. — 2005. — Vol. 348. — P. 1103–1112.
14. Hesson L.B., Cooper W.N., Latif F. The role of RASSF1A methylation in cancer // Dis. Markers. — 2007. — Vol. 23. — P. 73–87.
15. Horton T.M., Jenkins G., Pati D., Zhang L., Dolan M.E. et al. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor ABT-888 potentiates the cytotoxic activity of temozolomide in leukemia cells: influence of mismatch repair status and O6-methylguanine-DNA methyltransferase activity // Mol. Cancer Ther. — 2009. — Vol. 8. — P. 2232–2242.
16. Huang A.M., Montagna C., Sharan S., Ni Y., Ried T., Sterneck E. Loss of CCAAT/enhancer binding protein delta promotes chromosomal instability // Oncogene. — 2004. — Vol. 23. — P. 1549–1557.
17. Issa J.-P. CpG island methylator phenotype in cancer // Nat. Rev. Cancer. — 2004. — Vol. 4. — P. 988–993.
18. Jones P.A., Baylin S.B. The fundamental role of epigenetic events in cancer // Nat. Rev. Genet. — 2002. — Vol. 3. — P. 415–428.
19. Karpova M.B., Schoumans J., Ernberg I., Henter J.-I., Nordenskjöld M., Fadeel B. Raji revisited: cytogenetics of the original Burkitt's lymphoma cell line // Leukemia. — 2005. — Vol. 19. — P. 159–161.
20. Kawasaki T., Noshio K., Ohnishi M., Suemoto Y., Kirkner G.J., Fuchs C.S., Ogino S. IGFBP3 promoter methylation in colorectal cancer: relationship with microsatellite instability, CG island methylator phenotype, and p53 // Neoplasia. — 2007. — Vol. 9. — P. 1091–1098.
21. Kim S., Li M., Paik H., Nephew K., Shi H., Kramer R., Xu D., Huang T.-H. Predicting DNA methylation susceptibility using CpG flanking sequences // Pac. Symp. Biocomput. — 2008. — Vol. 13. — P. 315–326.
22. Mishra D.K., Chen Z., Wu Y., Sarkissyan M., Koeffler H.P., Vadgama J.V. Global methylation pattern of genes in androgen-sensitive and androgen-independent prostate cancer cells // Mol. Cancer Ther. — 2010. — Vol. 9. — P. 33–45.

23. Miyake H., Pollak M., Gleave M.E. Castration-induced up-regulation of insulin-like growth factor binding protein-5 potentiates insulin-like growth factor-I activity and accelerates progression to androgen independence in prostate cancer models // *Cancer Res.* — 2000. — Vol. 60. — P. 3058–3064.
24. Nardone R.M. Eradication of cross-contaminated cell lines: a call for action // *Cell Biol. Toxicol.* — 2007. — Vol. 23. — P. 367–372.
25. Peters I., Rehmet K., Wilke N., Kuczyk M.A., Hennenlotter J., Eilers T., Machtens S., Jonas U., Serth J. RASSF1A promoter methylation and expression analysis in normal and neoplastic kidney indicates a role in early tumorigenesis // *Mol. Cancer.* — 2007. — Vol. 6(1). — P. 49.
26. Sambrook J., Russell D. *Molecular cloning: A laboratory manual* / 3rd ed. — NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press., 2001.
27. Stacey G.N. Cell contamination leads to inaccurate data: we must take action now // *Nature.* — 2000. — Vol. 403. — P. 356.
28. Strefford J.C., Foot N.J., Chaplin T., Neat M.J., Oliver R.T.D., Young B.D., Jones L.K. The characterisation of the lymphoma cell line U937, using comparative genomic hybridisation and multi-plex FISH // *Cytogenet. Cell Genet.* — 2001. — Vol. 94. — P. 9–14.
29. Tarasova G.V., Nayakshina T.N., Degtyarev S.K. Substrate specificity of new methyl-directed DNA endonuclease Glal // *BMC Mol. Biol.* — 2008. — Vol. 9. — P. 7.
30. Torng P.L., Lin C.W., Chan M.W., Yang H.W., Huang S.C., Lin C.T. Promoter methylation of IGFBP-3 and p53 expression in ovarian endometrioid carcinoma // *Mol. Cancer.* — 2009. — Vol. 8. — P. 120.
31. Yan P.S., Shi H., Rahmatpanah F., Hsiau T.H., Hsiau A.H., Leu Y.W., Liu J.C., Huang T.H. Differential distribution of DNA methylation within the RASSF1A CpG island in breast cancer // *Cancer Res.* — 2003. — Vol. 63. — P. 6178–6186.

EPIGENETIC TYPING OF HUMAN CANCER CELL LINES BY BslI- AND GlalI-PCR ASSAYS

A.G. AKISHEV, D.A. GONCHAR, M.A. ABDURASHITOV, S.Kh. DEGTYAREV

SibEnzyme, Novosibirsk, Russia

BslI- and GlalI-PCR assays have been applied to determine a methylation status of regulatory regions of SEPT9b, IGFBP3, CEBPD, MGMT and RASSF1A tumor suppressor genes in malignant cell lines HeLa, Raji, U-937, Jurkat and in the control fibroblast cell line L-68. GlalI- and BslI-PCR assays have shown either presence or absence of 5'-RMGY-3' sites in the regulatory regions of the studied tumor suppressor genes depending on malignant cell line, which was a source of DNA preparation. Regulatory regions are methylated in different combinations in the studied malignant cell lines. At the same time no 5'-RMGY-3' sites have been found in these regulatory regions in DNA from normal fibroblast cell line L-68. These results show that method of BslI- and GlalI-PCR assays allow to determine and to discriminate malignant cell lines. Thus, BslI- and GlalI-PCR assays may be used for epigenetic typing of malignant cell lines.

Keywords: DNA methylation, methyl-dependent DNA endonucleases, BslI, GlalI, epigenetics, malignant cell lines.