

Исследование активности трансгена при культивации клеток карциномы поджелудочной железы человека Mia PaCa-2

Научный руководитель – Плешкан Виктор Викторович

Красько Анастасия Марковна

Студент (бакалавр)

Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, Факультет химико-фармацевтических технологий и биомедицинских препаратов (ХФТ), Москва, Россия

E-mail: kraskomail@gmail.com

Генотерапевтический подход должен учитывать возможную инактивацию трансгена путем сайленсинга [1]. Мы провели исследование изменений активности ранее отобранных промоторов CMV, PCNA и IGFBP2 [2], контролирующей экспрессию суицидного гена тимидинкиназы вируса простого герпеса типа 1 (HSVtk) в клетках карциномы поджелудочной железы человека Mia PaCa-2 при длительной экспрессии трансгена.

Стабильно трансфицированные клеточные линии использовали для проведения цитотоксического MTS-теста в начале (нулевая точка) и конце эксперимента (30 день после нулевой точки) для этого отбирали часть клеток и добавляли к ним ганцикловир в концентрациях 0; 2; 12,5; 50 и 200 мкМ. Тимидинкиназа вируса простого герпеса конвертирует добавляемый ганцикловир в ганцикловир-фосфат, который конвертируется клеточными ферментами до трифосфата и способен встраиваться в растущую цепь ДНК при делении клетки, его встраивание делает невозможным дальнейшую репликацию ДНК и вызывает гибель клетки. Степень конверсии ганцикловира в монофосфат в основном определяется количеством фермента, присутствующего в клетке. В полученных модифицированных клетках данный фермент нарабатывался с конструкций, отличающихся только промотором, обеспечивающим транскрипцию гена HSVtk. Таким образом, мы могли косвенно оценить эффективность работы каждого исследуемого промотора.

В результате проведенного цитотоксического теста показано (рис.1), что эффективность конструкции с CMV промотором достаточно низка и уменьшается со временем, что говорит о сайленсинге промотора CMV. Наиболее эффективными оказались конструкция с промотором PCNA, которая, однако, со временем тоже предположительно инактивируется.

Проведен анализ уровня транскрипции трансгенов, инициированных с ЭК методом ПЦР в режиме реального времени. Уровень транскрипции сопоставлен с активностью соответствующего продукта трансгена. Нормировка данных проведена относительно значений транскрипции 18S РНК. Результаты ПЦР в реальном времени также показали уменьшение транскриптов инициированных с промотора CMV в конце эксперимента по сравнению с началом. Однако данный промотор обеспечил наибольшее число копий трансгена. Транскрипты с промотора IGFBP2 также снижались со временем, в то время как в ЭК под контролем промотора PCNA наблюдалось увеличение копий трансгена спустя 30 дней культивирования клеточных линий.

Мы полагаем, что промотор PCNA будет эффективен для обеспечения экспрессии трансгенов при модификации раковых клеток человека.

Следующий этап данной работы предполагает определение статуса метилирования промотора ЭК методом бисульфитного секвенирования.

Источники и литература

- 1) Xia et al., Stem Cells Dev. 2007 Feb;16(1):167-76
- 2) Плешкан В.В., Алексеенко И.В., Зиновьева М.В., Виноградова Т.В., Свердлов Е.Д. Промоторы со специфической активностью в раковых клетках при генной терапии меланомы. Acta Naturae, 2011, Т. 3, No 2, С. 14-23.

Иллюстрации

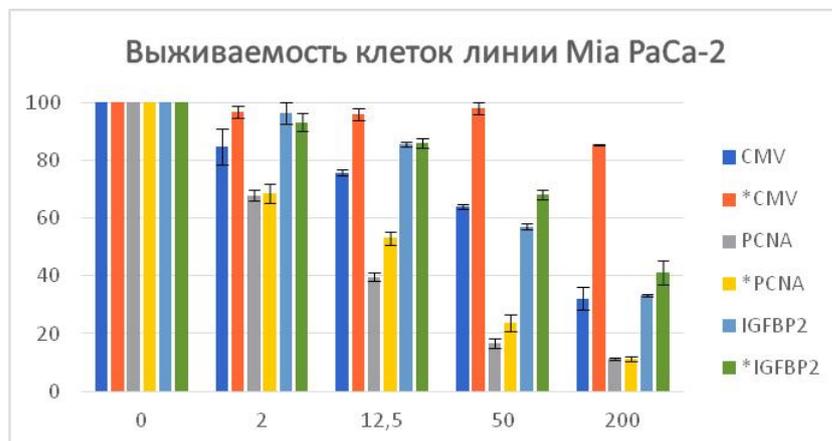


Рис. 1. На графиках указано: по оси ординат – выживаемость клеток в %; по оси абсцисс– концентрация ганцикловира; названия промоторов контролирующих экспрессию гена HSVtk обозначены справа, с указанием соответствующего цвета используемого на графике. Промоторы, обозначенные значком * - данные после месяца культивации.