Создание и применение красных флуоресцентных опухолевых клеточных линий

Коновалова Е.В.

Институт биоорганической химии им. академиков Ю.А.Овчинникова и М.М. Шемякина (ИБХ РАН)

Способы лечения рака глубоко разнообразны и зависят от ряда факторов, таких как тип, локализация и степень развития болезни, общее состояние пациента. Большинство методов лечения рака сводится к введению в организм экзогенных природных, синтетических, противоопухолевых соединений. Тестирование противоопухолевых препаратов проводят, как правило, вначале на культурах опухолевых клеток, а затем, в случае положительного результата, in vivo, на заранее приживленной в организм лабораторного животного опухоли. Для количественного наблюдения за ростом опухолей у лабораторных животных широко применяют метод флуоресцентной томографии. Этот метод основан на неинвазивной детекции флуоресценции опухолевых клеток в организме животного. При этом необходимым условием томографии является флуоресцентное мечение клеток, которое достигается либо с помощью опухолеспецифических красителей, либо использованием генетически модифицированных линий опухолевых клеток, экспрессирующих флуоресцентные белки. Последний способ нашел широкое применение при длительном количественном наблюдении за ростом опухоли, так как в этом случае сигнал не ослабевает со временем и пропорционален клеточной массе.

Для эффективного наблюдения за ростом опухоли следует использовать клеточные линии с высокой интенсивностью флуоресценции в дальней красной области спектра. Это объясняется наименьшим поглощением света тканями животного в диапазоне спектров экстинкции и эмиссии флуоресценции белка, таким образом, сигнал флуоресценции опухоли значительно превалирует над сигналом автофлуоресценции окружающих тканей[1].

В настоящее время получены опухолевые клеточные линии, модифицированные красными флуоресцентными белками - RFP, DsRed2, tdTomato: клеточная линия рака груди человека MDA-MB-231, модифицированная белком tdTomato[1]; клеточная линия рака поджелудочной железы человека MIA-PaCa-2, модифицированная белком RFP[2]; клеточная линия альвеолярной рабдомиосаркомы человека Rh30, модифицированная белком DsRed2[3]; клеточная линия меланомы B16F0, модифицированная белком RFP; клеточная линия рака предстательной железы человека PC-3, модифицированная белком RFP; клеточная линия толстой кишки HCT-116, модифицированная белком RFP[4];.

Получают флуоресцирующие опухолевые клеточные линии обычно с помощью двух методов: трансфекции и трансдукции. Оба метода основаны на искусственной интеграции гена флуоресцентного белка в геном опухолевой клетки. При трансфекции плазмиду, кодирующую ген флуоресцентного белка, вводят в опухолевую клетку с помощью химических реагентов (как правило, это положительно заряженные липосомы). При этом интеграция гена в геном клетки осуществляется благодаря селекции, которую проводят спустя 48 часов после трансфекции. Принцип селекции состоит в том, что к среде с трансфецированными опухолевыми клетками добавляют высокие концентрации антибиотика млекопитающих, при которых в течение 14 дней выживают клетки с интегрированной в геном плазмидой. Выжившие клетки формируют колонии, которые в дальнейшем анализируются на проточном цитофлуориметре. На основе анализа данных об интенсивности флуоресценции отбирается колония с самыми высокими параметрами интенсивности флуоресценции, которая становятся в дальнейшем моделью для исследования противоопухолевой активности соединений. При трансдукции происходит интеграция плазмиды, кодирующей флуоресцентный белок, в геном клетки в виде вирусных частиц. При этом процесс селекции не обязателен, поскольку ген флуоресцентного белка сразу интегрируется в геном опухолевой клетки.

[1] – Neoplasia, 8(10): 796-806, 2006
[2] – Clinical and Experimental Metastasis, Volume 21, Number 1 7-12, 2004
[3] – Cell Proliferation, Vol.41 Issue 2 Page 365, 2008
[4] – Proceedings of the National Academy of Science, vol. 100, Issue 24, p.14259-14262, 2003

Исследование выполнено при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, соглашение № 14.132.21.1306 (с учетом дополнительного соглашения № 1)