

Получение клеточных линий с флуоресцентным биосенсором Casper3

Научный руководитель – Брилкина Анна Александровна

Сенатская Анна Олеговна

Студент (бакалавр)

Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний
Новгород, Россия

E-mail: seanna@bk.ru

В изучении процесса апоптоза в живых клетках большой интерес представляет работа его «исполнителей» - каспаз. Их действие может быть прослежено с помощью флуоресцентных биосенсоров. Целью работы было создание клеточных линий с генетически кодируемыми биосенсорами активности каспазы-3 Casper3.

В работе была использована клеточная линия A431 - эпидермоидная карцинома человека, представляющая собой иммортализованную линию клеток кожного эпителия человека, пораженных плоскоклеточной карциномой. Для внедрения генов флуоресцентных белков была проведена трансфекция путем липофекции с помощью векторов pCasper3-BG и pCasper3-GR (Евроген, Россия), несущих гены Casper3 BG и Casper3 GR - генетически-кодируемых флуоресцентных биосенсоров. Каждый сенсор состоит из двух флуоресцентных белков TagGFP и TagRFP для Casper3 GR и TagBFP и TagGFP2 для Casper3 BG, которые представляют собой эффективную пару для флуоресцентного резонансного переноса энергии (FRET). Обе пары белков связаны полипептидным линкером DEVD, который опознается и специфически расщепляется каспазой-3, активирующийся при апоптозе. Расщепление линкера приводит к нарушению FRET между парами, что выражается в уменьшении красной флуоресценции и возрастании зеленой флуоресценции клеток для Casper3 GR и уменьшении зеленой флуоресценции и возрастании синей флуоресценции для Casper3 BG.

После трансфекции была проведена селекция клеток на среде с генетицином (аминогликозидным антибиотиком, блокирующим синтез полипептидов на этапе элонгации у про- и у эукариотических клеток). Клетки, имеющие в своем геноме после трансфекции ген neo, устойчивы к данному антибиотику. Затем проводилась серия сортировок на проточном цитофлуориметре FACSAria™ (BD, США). В результате отобраны клетки с высоким уровнем флуоресценции и получены стабильные клеточные линии A431-Casper BG и A431-Casper GR, обладающие флуоресцентными биосенсорами. Используя их, были получены моноклональные линии. Отбор моноклонов с наилучшими спектральными характеристиками производился методами конфокальной микроскопии с использованием Axio Observer Z1 LSM 710 NLO/Duo (Carl Zeiss, Германия) и спектрофлуориметрии с помощью Synergy MX (BioTek, США). Работа флуоресцентных биосенсоров была подтверждена с помощью обработки клеток актиномицином D (AcD) - токсичным антибиотиком, обладающим противоопухолевым действием и вызывающим процесс апоптоза в клетках. Результаты эксперимента, демонстрирующие работу биосенсоров, получены методом конфокальной микроскопии. При действии AcD происходило нарушение FRET между парами белков TagGFP и TagRFP для Casper3 GR и TagBFP и TagGFP2 для Casper3 BG, что свидетельствовало о развитии апоптоза.

В дальнейшем полученные линии клеток с сенсорами Casper BG и Casper GR планируется использовать для изучения действия генно-инженерных токсинов и фотосенсибилизаторов.