

Agnieszka Toma

Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Gliwicach

Zakład Biologii Nowotworów

Retrowirusowy system transferu genów w uzyskiwaniu komórek o zróżnicowanej ekspresji HSF1

Praca współfinansowana jest ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego w ramach projektu RFSD2

Głównym mechanizmem odpowiedzi komórek na stres termiczny jest aktywacja czynnika transkrypcyjnego HSF1, która prowadzi do indukcji ekspresji białek HSP. Synteza białek HSP ułatwia przeżycie komórek ze zdenaturowanymi białkami i zwiększa ich oporność na działanie czynników indukujących śmierć komórkową. Indukcja takiej oporności w komórkach nowotworowych byłaby oczywiście niekorzystna z punktu widzenia skuteczności terapii przeciwnowotworowej. W komórkach nowotworowych często dochodzi do stałej aktywacji HSF1 i uruchomienia nadmiernej syntezy białek HSP, co wiąże się z gorszym rokowaniem. Nie jest jednak jasne, jakie mechanizmy molekularne uruchamiane są w komórkach nowotworowych z podwyższoną aktywnością HSF1.

Celem ustalenia tych mechanizmów konstruujemy następujący model badawczy. Komórki czerniaka mysiego B16(F10) oraz ludzkiego WM793B i Lu1205 modyfikujemy uzyskując komórki z ekspresją konstytutywnie aktywnego czynnika transkrypcyjnego HSF1 (z delecją w jego domenie regulatorowej) oraz komórki z wyciszoną ekspresją HSF1 (przy pomocy shRNA). Modyfikacje wprowadzamy wykorzystując retrowirusowy system transferu genów. W tym celu sekwencję kodującą dla aktywnego ludzkiego HSF1 wprowadzono do wektora plazmidowego pLNCX₂, a sekwencję kodującą shRNA do wektora pSIREN. Plazmidy te zawierają wirusowy sygnał pakujący, potrzebny do wytworzenia infekcyjnych wirionów. Uzyskanymi plazmidami transfekujemy z użyciem liposomów komórki linii pakującej PT67. Linia pakująca posiada w genomie sekwencje retrowirusowe potrzebne do produkcji białek otoczki wirusowej. Komórki linii pakującej PT67 wytwarzają wirusy zdolne infekować szeroki zakres komórek ssaków, jednak nie mogące się namnażać poza linią pakującą. Uzyskanymi wirusami transdukujemy linie docelowe otrzymując komórki ze zróżnicowaną ekspresją HSF1. Po wbudowaniu wektora do genomu dodatkowo uzyskuje się oporność na G418 lub puromycynę, co umożliwi eliminację komórek niezmodyfikowanych.

Obecnie posiadamy trzy wyprowadzone, stabilne linie komórkowe o scharakteryzowanej ekspresji aktywnej formy HSF1 zarówno na poziomie RNA jak i białka. Ponadto uzyskaliśmy zmodyfikowane komórki czerniaka mysiego z częściowo wyciszoną ekspresją HSF1. W najbliższym czasie planujemy skoncentrować się na uzyskaniu linii komórkowych z całkowicie wyciszoną ekspresją HSF1 oraz ich charakteryzacji. Dla oceny wpływu HSF1 na fenotyp nowotworowy w układzie *in vitro* przeprowadzona zostanie analiza tempa proliferacji komórek oraz analiza wpływu HSF1 na zachowanie potencjału tumorogennego (czyli zdolności do tworzenia guzów *in vivo*).