

Исследование доставки генетического материала с использованием белка Arc/Arg3.1 в клетки млекопитающих

аль осман Айя

Аспирант

Московский физико-технический институт, Москва, Россия

E-mail: aya.alothman.95@mail.ru

Белок Arc/arg3.1 играет важную роль в различных типах пластичности нейронов, включая долговременную потенциацию и долговременное подавление. Выполнение этой функции белком Arc осуществляется за счёт его способности регулировать эндоцитоз рецепторов и организовывать актиновый цитоскелет в области дендритных шипиков нейронов, образующих синапсы. Кроме того, ретровирусный/ретротранспозонный GAG-подобный домен в Arc/Arg3.1 образует вирусоподобные капсиды, которые компактизуют и транспортируют свою мРНК в составе внеклеточных везикул в соседние клетки, обеспечивая обмен информацией между нейронами [1]. Способность этих капсидов преодолевать внутриклеточные барьеры и переносить мРНК в клетки-мишени делает этот белок перспективным кандидатом для создания векторов для генной терапии [2]. Поскольку Arc является эндогенным белком человека, потенциальное использование Arc в качестве носителя не приведёт к появлению иммунного ответа и нежелательным побочным эффектам. Принимая во внимание эти свойства белка Arc, мы планируем оценить возможность его использования для доставки нуклеиновых кислот в различные типы клеток млекопитающих. Кроме того, известно, что раковые клетки глиом способны обмениваться информацией через перенос онкогенных молекул во внеклеточных везикулах [3]. Таким образом, нами была выдвинута гипотеза, что белок Arc может экспрессироваться в данных клетках и принимать участие в процессах передачи мРНК между ними.

В ходе этой работы мы проверили экспрессию Arc в клеточных линиях глиобластомы (U87, U251, LN229) и клетках первичной культуры из опухоли глиобластомы. Оказалось, что во всех этих клетках белок Arc экспрессирован. Методом иммуноблоттинга и qPCR мы впервые показали, что белок/мРНК Arc присутствуют в экзосомах, полученных из клеток U87, выделенных ультрацентрифугированием, и увеличиваются после их трансдукции лентивирусами LV-ARC-GFP. С помощью просвечивающего электронного микроскопа мы заметили, что морфология экзосом из всех клеточных линий глиобластомы после сверхэкспрессии Arc изменилась, имитируя типичную морфологию вирусоподобных частиц. 72-часовая инкубация клеток U87 с экзосомами, полученными из U87-ARC-GFP, приводит к значительному увеличению экспрессии ARC и GFP. Также, после 48 часов кокультивирования трансдуцированных раковых клеток U87 (RFP-lenti) и трансдуцированных клеток U87 (Arc-GFP-lenti) в соотношении 1:1 были обнаружены клетки, которые содержали обе метки. Этот результат указывает на способность Arc-содержащих экзосом переносить свою мРНК между клетками глиомы. Мы также изучили роль эндоцитоза в поглощении экзосом клетками U87 и обнаружили, что экзосомы поглощаются путем макропиноцитоза. Кроме того, мы изучили кинетику взаимодействий РНК-белок с использованием BLI-кинетического метода на основе стрептавидина и оценили константу равновесной диссоциации (KD) между рекомбинантным белком Arc и его собственной мРНК. белок Arc взаимодействует со своей собственной РНК с 3-кратным более высоким сродством, чем с РНК mcherry.

Источники и литература

- 1) Pastuzyn E. D. et al. The neuronal gene Arc encodes a repurposed retrotransposon gag protein that mediates intercellular RNA transfer //Cell. – 2018. – Т. 172. – №. 1-2. – С. 275-288. e18.
- 2) Kedrov A. V., Durymanov M., Anokhin K. V. The Arc gene: Retroviral heritage in cognitive functions //Neuroscience & Biobehavioral Reviews. – 2019. – Т. 99. – С. 275-281.
- 3) Kucharzewska P. et al. Exosomes reflect the hypoxic status of glioma cells and mediate hypoxia-dependent activation of vascular cells during tumor development //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2013. – Т. 110. – №. 18. – С. 7312-7317.