

## Указание по применению

# Детекция молекул РНК биомаркеров канцерогенеза в живых клетках для сортировки смешанной клеточной популяции

## Введение

Биомаркеры канцерогенеза используются для идентификации трансформированных клеток в пределах гетерогенных тканей и клеточных лизатов, но в настоящее время обеспечивают лишь ретроспективное подтверждение патологического состояния. Идентификация РНК биомаркеров в живых клетках обеспечивает уникальную возможность понимания влияния гетерогенности опухоли на поведение трансформированных клеток, а также обогащения клеточной популяции на основе РНК маркеров с использованием флуоресцентно-активированной сортировки клеток.

Сортировка живых клеток традиционно выполняется с помощью детекции присутствия белков на поверхности клеток с использованием флуоресцентно-меченных антител. Однако степень возврата клеток очень низка после необратимого мечения антителами. Кроме того, живые клетки не могут быть отсортированы на основе эндогенных внутриклеточных маркеров, вследствие необходимости в фиксации. Иногда клетки могут быть отсортированы на основе трансфицированных репортных конструкций; однако данное воздействие также нарушает клеточную целостность и может внести изменения в клеточные сигнальные пути, искажая результаты дальнейшего анализа.

С другой стороны, идентификация типов клеток и их сортировка, основанная на экспрессии специфичных РНК маркеров, без каких-либо реагентов для трансфекции или инвазивных способов пробоподготовки образца, может радикальным образом улучшить эффективность сортировки живых клеток, физиологическую релевантность и степень выживаемости клеток после осуществления сортировки. С использованием инновационных SmartFlare™ РНК зондов для детекции, которые способны определять уровень РНК внутри живых клеток, мы продемонстрировали возможность сортировки и дальнейшей репродукции популяций живых клеток лишь на основе детекции уровня экспрессии генов или в комбинации с поверхностными клеточными маркерами с помощью антител. Данная технология исключает необходимость в пермеабиллизации или использовании реагентов для трансфекции для детального исследования цитоплазматического

или использовании реагентов для трансфекции для детального исследования цитоплазматического содержимого клеток, сохраняя целостность клеток и их жизнеспособность после сортировки. Что еще более важно, поскольку частицы инертны и сохраняют клетки неповрежденными, клетки остаются пригодными для выполнения последующих видов анализа, позволяя оценивать дополнительные биомаркеры или собирать данные о функциональном состоянии клеток.

В нашем исследовании мы сортировали клетки рака молочной железы на основе РНК биомаркеров. Во-первых, мы изолировали высоко- и низко экспрессирующие мРНК ErbB2 клетки из смешанной клеточной популяции и охарактеризовали сортированные клетки в дальнейшем методом иммуноцитохимии и количественной ОТ-ПЦР. Затем мы отсортировали две клеточные линии на основе экспрессии miR-221 и miR-222, и далее охарактеризовали отсортированные продукты в соответствии с экспрессией маркера эпителиально-мезенхимального перехода, способностью к инвазии коллагена и формированием инвадоподий.

## Методы

**Детекция РНК и сортировка клеток с использованием SmartFlare™ зондов.** Клетки были смешаны в соотношении 1:1 до проведения детекции РНК. Затем в культуральную среду был добавлен SmartFlare™ реагент для детекции в конечной концентрации 100 пМ и инкубировался в течение ночи при 37°C. На следующее утро, смешанная клеточная популяция была отсортирована с использованием флуоресцентно-активированной сортировки клеток. Клетки отмывали с использованием сбалансированного солевого раствора Хенкса, адгезионные клетки отсоединяли с использованием реагента Accutase®, собирали, центрифугировали и ресуспендировали в культуральной среде. Сортировку выполняли с помощью клеточного сортера MoFlo™ XDP (Beckman Coulter). Отсортированные популяции затем возвращали в клеточную культуру.

**Визуализация РНК в живых клетках.** После инкубации с зондами SmartFlare™, сигналы визуализировали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа Nikon C2.

**Анализ инвазии.** Анализ инвазии коллагена был выполнен с использованием QCM® High Sensitivity Non-cross-linked Collagen Invasion Assay, Colorimetric (Merck Millipore, Cat. No. ECM1401). Каждый продукт сортировки был лишен сыворотки, наносился на коллаген-покрытые вставки и инкубировался в течение ночи. Инвазию клеток анализировали на основе окрашивания клеток, а также экстракции красителя для измерения оптической плотности при 560 нм.

#### Анализ формирования инвадоподий.

Формирование инвадоподий исследовали с помощью QCM® Gelatin Invadopodia Assay (Merck Millipore, Cat. No. ECM671). Каждый продукт сортировки вносился в Су-3-желатин покрытые лунки и инкубировался в течение 48 часов. Клетки были докрашены фаллоидином и ядерным красителем. Процент площади деградации общей площадью клеток анализировался с помощью программного обеспечения NIH ImageJ.

## Результаты

**Сортировка живых опухолевых клеток на основе экспрессии РНК и проведение иммуноцитохимического и количественного ОТ-ПЦР анализа после сортировки.** Смешанная популяция MCF10A и BT474 клеток была отсортирована на основе интенсивности сигнала ERBB2 РНК SmartFlare® (рис. 1А). Каждый продукт сортировки затем был проанализирован путем окрашивания антителами к ERBB2 белку, который экспрессируется исключительно на клетках линии BT474. Как и ожидалось, экспрессия белка детектировалась только в продуктах сортировки с высоким уровнем сигнала по ERBB2 SmartFlare®, но не в популяции с низким уровнем сигнала (рис. 1В). Количественный ОТ-ПЦР анализ подтвердил чистоту полученных данных по отсортированным клеточным популяциям (рис. 1С).

**Сортировка живых клеток на основе микроРНК маркеров канцерогенеза.** Далее мы использовали две микроРНК биомаркера для сортировки Т47D и MDA-MB-231 клеточных линий рака молочной железы. Т47D – эпителиальная (экспрессирующая Е-кадгерин) и MDA-MB-231 – мезенхимальная (экспрессирующая виментин)1. Две клеточные линии различимы на основе уровня экспрессии двух микроРНК; MDA-MB-231 демонстрирует более высокий уровень экспрессии как miR-221, так и miR-222<sup>2</sup>.

#### Сортировка клеток на основе экспрессии miR-221 и проведение анализа инвазии после сортировки.

Смешанная популяция Т47D и MDA-MB-231 клеток была отсортирована на основе экспрессии miR-221 с использованием SmartFlare® зондов, распознающих miR-221 (рис. 2А). Продукты сортировки затем были проанализированы с использованием анализа инвазии коллагена с применением трансвелов (стерильные прозрачные вкладыши в культуральные планшеты). Популяция клеток с высоким уровнем экспрессии miR-221 демонстрировала значительную инвазию, при этом популяция с низким уровнем экспрессии – минимальный уровень инвазии (рис. 2В и 2С). Окрашивание на маркер эпителиально-мезенхимального перехода показало, что клетки с низкой экспрессией miR-221 экспрессируют Е-кадгерин, но не виментин, и демонстрируют эпителиальную морфологию (фаллоидин, зеленый цвет), в то время как клетки с высокой экспрессией miR-221 экспрессируют виментин, но не Е-кадгерин, и демонстрируют мезенхимальную морфологию (рис. 2D).

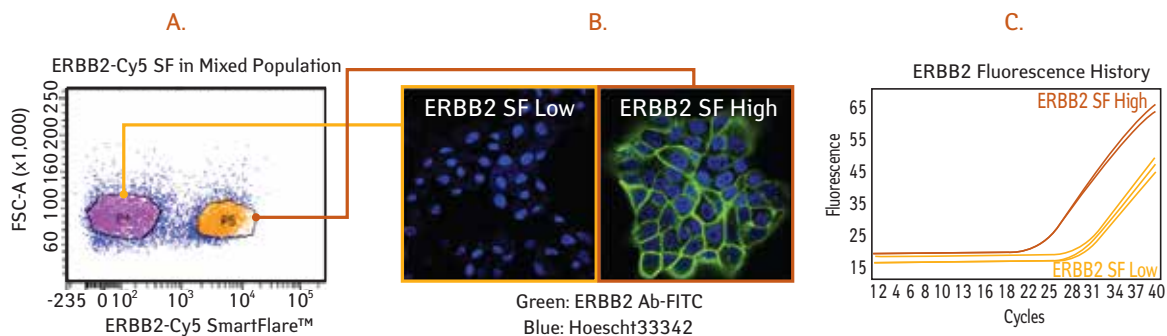
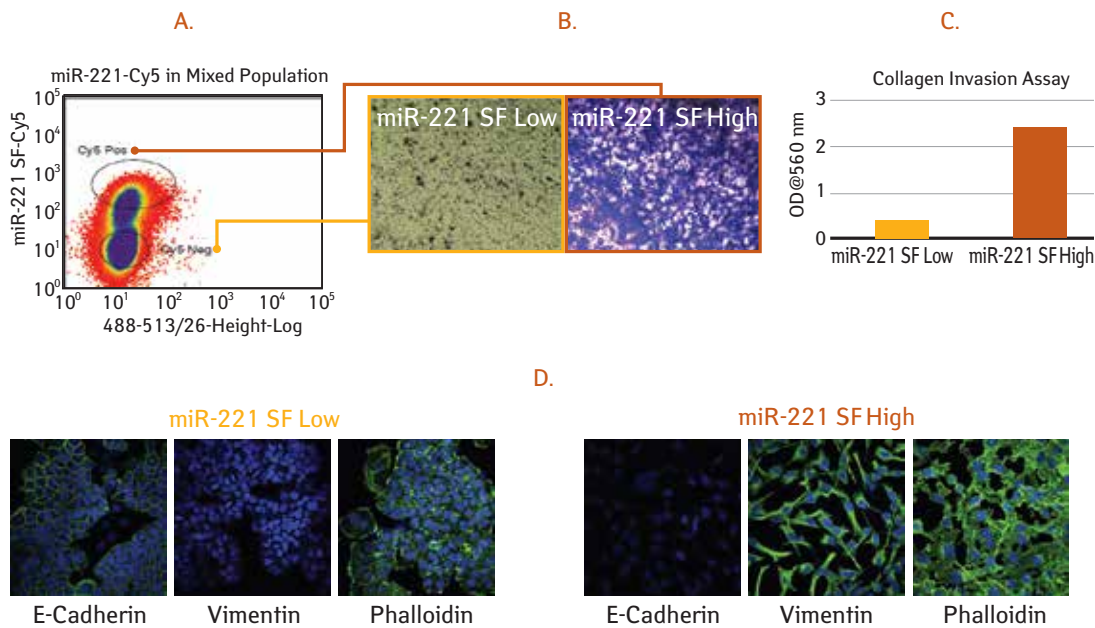


Рис. 1.

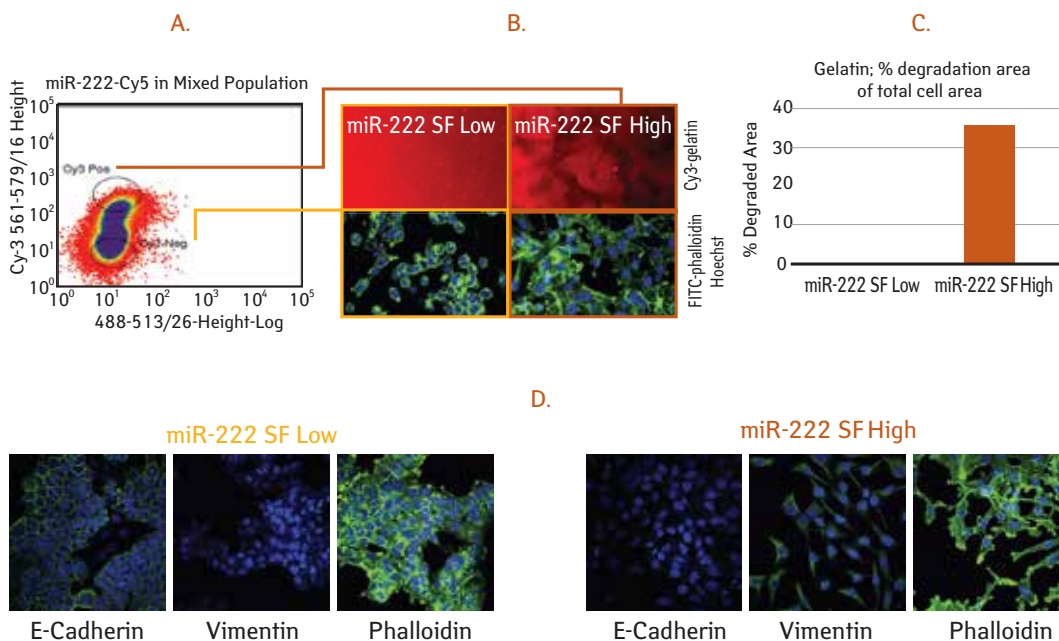
Смешанная популяция клеток была отсортирована на субпопуляции на основе интенсивности сигнала зондов ERBB2 SmartFlare™ (А). При окрашивании продуктов сортировки анти-ERBB2 антителами (В, зеленый цвет), клетки с высоким уровнем сигнала ERBB2 SmartFlare™ (соответствующие клеточной линии BT474) были положительно окрашенными. Количественный ОТ-ПЦР анализ подтвердил различия в уровне мРНК ERBB2.

**Сортировка клеток на основе экспрессии miR-222 и проведение анализа на формирование инвадоподий после сортировки.** Одной из отличительных черт метастатического процесса канцерогенеза является деградация матрикса с формированием клеточных выступов с локализованной в них протеазной активностью, называемых инвадоподии или подосомы. Эффективным методом для визуализации формирования субклеточных инвадоподий является покрытие клетками тонкого слоя флуоресцентно-меченного матрикса. Для анализа корреляции между экспрессией miR-222 и формированием инвадоподий, мы отсортировали клетки на основе интенсивности miR-222 SmartFlare™ зондов и затем обсеменяли продук

тами сортировки Су3-желатиновый субстрат. Популяция с высоким уровнем miR-222 демонстрирует сильный паттерн деградации после 48 часов, что может являться следствием формирования инвадоподий, показанных в виде темных участков, лишенных Су3 флуоресценции. Популяции с низким уровнем miR-222 не демонстрируют желатиновой деградации (рис. 3B и 3C). Окрашивание на EMT маркеры показывает, что клетки с низким уровнем miR-222 экспрессируют E-кадгерин, но не виментин, и демонстрируют эпителиальную морфологию (фаллоидин, зеленый цвет), в то время как клетки с высоким уровнем miR-222 экспрессируют виментин, но не E-кадгерин, и демонстрируют мезенхимальную морфологию (рис. 3D).



**Рис. 2.** Су5-положительные клетки (с высоким уровнем miR-221) и Су5-отрицательные клетки (с низким уровнем miR-221) были отсортированы (A) и проанализированы с использованием анализа инвазии коллагена с помощью трансвеллов. Клетки, которые проникали через нижнюю сторону мембраны трансвела, были окрашены и либо визуализированы (B), либо краситель был экстрагирован и проведена оценка оптической плотности (C). Иммуноцитохимия с использованием антител была использована для EMT характеристики продуктов сортировки (D).



**Рис. 3.** Су3-положительные клетки (с высоким уровнем miR-222) и Су3-отрицательные клетки (с низким уровнем miR-222) были отсортированы (A) и проанализированы с использованием анализа формирования инвадоподий. Инвадоподии, которые деградировали желатиновый матрикс, могли быть увидены как темные области на красном желатиновом субстрате и количественно оценены с использованием программного обеспечения ImageJ (B и C). Иммуноцитохимия была использована для EMT характеристики продуктов сортировки (D).

## Заклучение

Мы продемонстрировали возможность сортировки живых клеток на основе внутриклеточных биомаркеров канцерогенеза с использованием технологии детекции РНК SmartFlare™. Сортированные продукты затем были возвращены в культуру, где они сохраняли свою жизнеспособность и неизменность для последующей детекции, позволяя проводить дальнейшие виды анализа, такие как окрашивание антителами, функциональные тесты и ОТ-ПЦР.

Сортировка клеток с использованием либо микроРНК, либо мРНК с возможностью дальнейшего использования этих клеток для проведения дополнительных экспериментов, делает технологию SmartFlare™ чрезвычайно высокоэффективным исследовательским инструментом. Зонды SmartFlare™ позволяют проводить одновременную детекцию множества РНК, также как и оценку нуклеиновых кислот, белков и функциональную характеристику тех же самых клеток, обеспечивая установление взаимосвязи транскриптома, протеома и их функций, которые не были установлены до настоящего времени. Возможность сортировки клеток и получения высокообогащенных клеточных популяций на основе экспрессии генов также значительно увеличивает чувствительность клеточного анализа – становится возможным анализ молекулярной роли редких и нестабильных видов клеточных событий.

### Цитированная литература

1. Stinson et al. TRPS1 targeting by miR-221/222 promotes the epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer. *Sci Signal*. 2011 Jun 14; 4 (177): ra41.
2. Zhang N et. al. MicroRNA-30a suppresses breast tumor growth and metastasis by targeting metadherin. *Oncogene* 2013, Jul 15; 1-10.

## Для размещения заказа или получения технической информации

Москва ■ тел./факс: (495) 745-0508 ■ [sales@dia-m.ru](mailto:sales@dia-m.ru)



Новосибирск  
пр. Акад.  
Лаврентьева, 6/1  
тел./факс:  
(383) 328-0048  
[nsk@dia-m.ru](mailto:nsk@dia-m.ru)

Казань  
Оренбургский  
тракт, 20  
тел./факс:  
(843) 277-6040  
[kazan@dia-m.ru](mailto:kazan@dia-m.ru)

Санкт-Петербург  
ул. Профессора  
Попова, 23  
тел./факс:  
(812) 372-6040  
[spb@dia-m.ru](mailto:spb@dia-m.ru)

Ростов-на-Дону  
пер. Семашко, 114  
тел./факс:  
(863) 250-0006  
[rnd@dia-m.ru](mailto:rnd@dia-m.ru)

Пермь  
Представитель  
в УФО  
тел./факс:  
(342) 202-2239  
[perm@dia-m.ru](mailto:perm@dia-m.ru)

Воронеж  
тел./факс:  
(473) 232-4412  
[voronezh@dia-m.ru](mailto:voronezh@dia-m.ru)



### Присоединяйтесь!

Вступайте в сообщество Merck Millipore Bioscience в своей любимой социальной сети и получайте самые свежие новости!

 [facebook.com/MerckMilliporeBioscience](https://facebook.com/MerckMilliporeBioscience)

 [twitter.com/Merck4Bio](https://twitter.com/Merck4Bio)