

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Казанский (Приволжский) федеральный университет»
Институт фундаментальной медицины и биологии
Кафедра микробиологии

Направление подготовки (специальность): 06.04.01 – Биология

Профиль (специализация, магистерская программа): Микробиология и вирусология

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ
КЛОНИРОВАНИЕ ОПУХОЛЬ-СПЕЦИФИЧНЫХ ПРОМОТОРОВ И
АНАЛИЗ ИХ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ

Обучающийся 2 курса
группы 01-040-2



В. А. Иконникова

Научный руководитель
канд. биол. наук, доцент



Е.В. Дудкина

Заведующий кафедрой микробиологии
д-р биол. наук, профессор



О.Н. Ильинская

СОДЕРЖАНИЕ

	стр.
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1 Основные подходы в генной терапии рака	7
1.1.1 Антисмысловые РНК в генотерапии рака	7
1.1.2 Системы редактирования генома (ZFN, CRISPR/Cas9, TALEN)	8
1.1.3 Суицидальная генная терапия	10
1.1.4 Онколитическая вирусная терапия	11
1.1.5 Иммунотерапия	12
1.2 Системы доставки генетического материала в клетки	14
1.2.1 Вирусные системы	14
1.2.2 Невирусные системы	16
1.3 Опухоль-специфичные промоторы	19
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	25
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	25
2.1 Бактериальные штаммы, векторы и клеточные линии	25
2.2 Условия культивирования	27
2.3 Выделение нуклеиновых кислот	27
2.4 Условия ПЦР	27
2.5 Электрофорез	30
2.6 Рестрикция и лигирование	31
2.7 Трансформация	32
2.8 Анализ полученных конструкций	33
2.9 Трансфекция	33
2.10 МТТ-анализ	33
2.11. Оценка эффективности трансфекции	34
2.12. Статистическая обработка результатов	34

3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	36
3.1 Подбор промоторов, обладающих специфической активностью в клетках рака легкого.	36
3.2 Дизайн праймеров и подбор условий амплификации опухолеспецифичных промоторов	38
3.3 Создание репортерных конструкций	41
3.3.1 Создание генетических конструкций для экспрессии репортерного гена под управлением конститутивного промотора цитомегаловируса.	41
3.3.2 Создание генетических конструкций для экспрессии репортерного гена под управлением опухолеспецифичного промотора СЕА	47
3.4 Трансфекция клеточных линий полученными репортерными конструкциями и оценка специфичности промотора СЕА	48
3.5 Цитотоксический потенциал биназы по отношению к клеточной линии колоректальной аденокарциномы Сасо-2	51
ВЫВОДЫ	53
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	54

ВВЕДЕНИЕ

Рак легких является наиболее частой причиной смерти среди онкологических заболеваний [Jones, 2018]. Данный тип онкологии характеризуется агрессивностью, быстрым переходом к метастазированию, а высокая гетерогенность опухоли усложняет её скрининг [de Sousa *et al.*, 2018]. Несмотря на достижения в химиотерапии, хирургии и лучевой терапии, традиционные методы лечения рака теряют свою эффективность из-за высокой токсичности и низкой эффективности противоопухолевых препаратов, особенно на поздних стадиях заболевания. Поэтому поиск селективной терапии онкологических заболеваний остро стоит перед современной наукой. Развивающаяся генная терапия может стать подспорьем в решении этой проблемы. Многочисленные исследования уже показывают эффективность генотерапии рака на основе антисмысловых олигонуклеотидов, систем редактирования генома ZFN, TALENs и CRISPR/Cas, иммунотерапии, онколитической вирусной терапии, а также суицидальной терапии [Piña *et al.*, 2020; Nair *et al.*, 2020].

Генотерапевтические конструкции, созданные на основе конститутивных промоторов цитомегаловируса (CMV) или обезьяньего вируса 40 (SV-40), не обладают избирательностью действия и экспрессируют противоопухолевый агент во всех клетках организма. Достичь строгого уровня селективности возможно с помощью транскрипционного контроля экспрессии терапевтического гена, а именно используя опухолеспецифичные промоторы, гиперактивные в определенных типах раковых клеток, и практически не активные в нормальных клетках. Данный подход обеспечивает таргетное действие и позволяет избежать негативного влияния противоопухолевого агента на здоровые клетки. Критически важным фактором направленной экспрессии в терапии рака является подбор оптимального опухолеспецифичного промотора для конкретной опухолевой ткани, поскольку гетерогенность раковых клеток не

позволяет чётко спрогнозировать транскрипционную активность промоторной области и как следствие эффективность терапии. Для повышения эффективности метода требуется анализ функциональной активности подобранных промоторов в широком спектре линий опухолевых клеток.

В связи с вышесказанным, целью данной работы стало создание генетических репортерных конструкций на основе опухолеспецифичных промоторов для оценки их функциональной активности. В работе решались следующие задачи:

- 1) Подобрать промоторы со специфической активностью преимущественно в клетках рака легкого для создания репортерных конструкций на их основе.
- 2) Разработать праймеры и подобрать условия для успешной амплификации опухолеспецифичных промоторов с геномной ДНК опухолевых клеток.
- 3) Создать репортерные конструкции для экспрессии гена зеленого флуоресцентного белка под управлением промотора цитомегаловируса (CMV) и опухолеспецифичного промотора СЕА в клетках эукариот.
- 4) Трансфицировать опухолевые и нормальные клетки созданными генетическими конструкциями, оценить активность и специфичность работы опухолеспецифичного промотора.

ВЫВОДЫ

- 1) Для создания репортерных конструкций отобраны 3 кандидатных промотора - CEA, TTF1, hSPLI, обладающих высокой активностью преимущественно в клетках рака легкого.
- 2) Разработаны праймеры и подобраны оптимальные условия для амплификации промоторов CEA, TTF1 и hSPLI с геномной ДНК опухолевых клеток.
- 3) Созданы репортерные конструкции для экспрессии гена зеленого флуоресцентного белка под управлением промотора CMV и опухолеспецифичного промотора CEA в клетках эукариот.
- 4) Подтверждена активность и специфичность работы промотора CEA в опухолевых клетках немелкоклеточного рака легких NCI-H322 и колоректальной аденокарциномы Сасо-2, при этом в клетках рака шейки матки HeLa и нормальных фибробластах эмбрионального легкого человека WI-38 экспрессии промоторной области не наблюдалось.