

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: 06.03.01 – Биология

Профиль подготовки: Микробиология и вирусология

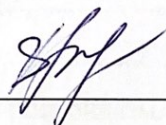
ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНА БИНАЗЫ В ЭУКАРИОТИЧЕСКИЙ
ЭКСПРЕССИОННЫЙ ВЕКТОР

Обучающийся 4 курса
группы 01-902
" " 2023 г.



Курито Т.Д.

Научный руководитель
канд. биол. наук, доцент
" " 2023 г.



Дудкина Е.В.

Заведующий кафедрой
микробиологии
д-р биол. наук, профессор
" " 2023 г.



Ильинская О.Н.

Казань – 2023

СОДЕРЖАНИЕ

	стр.
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	6
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	8
1.1 Генотерапия рака.....	8
1.1.1 Иммунотерапия рака.....	9
1.1.2 Онколитическая вирусная терапия.....	10
1.1.3 РНК в генотерапии рака.....	11
1.1.4 Метод замены мутантного гена-супрессора.....	12
1.1.5 Суицидальная генная терапия.....	14
1.1.5.1 Биназа – как перспективный суицидальный ген.....	15
1.2 Клонирование токсичных генов в <i>E. Coli</i>	16
1.3 Опухоль-специфичные промоторы.....	19
1.4 Доставка терапевтических генов.....	21
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	26
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	26
2.1 Бактериальные штаммы и векторы.....	26
2.2 Клеточные линии.....	27
2.3 Условия культивирования.....	27
2.4 Оптимизация последовательности гена биназы.....	28
2.5 Выделение нуклеиновых кислот.....	28
2.6 Условия проведения ПЦР.....	28
2.7 Электрофорез ДНК.....	30
2.8 Рестрикция и лигирование.....	30
2.9 Трансформация.....	31
2.10 Анализ полученной конструкции.....	31
2.11 Трансфекция клеток A549.....	31
2.12 Оценка эффективности трансфекции.....	32
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	33

3.1 Создание генетической конструкции для экспрессии гена биназы в клетках эукариот под управлением конститутивного промотора цитомегаловируса.....	33
3.2 Создание генетической конструкции для экспрессии гена биназы в клетках эукариот под управлением опухоль-специфичного промотора.....	36
3.2.1 Клонирование опухоль-специфичного промотора hSLPI в экспрессионный вектор pTurboGFP-PRL.....	36
3.2.2 Оценка функциональной активности опухоль-специфичного промотора hSLPIa в составе экспрессионной системы pTurboSLPIa-GFP.....	39
3.3. Создание генетической конструкции для экспрессии суицидального гена биназы под управлением опухоль-специфичного промотора hSLPIa.....	41
3.4 Создание генетической конструкции для экспрессии суицидального гена биназы совместно с геном ее ингибитора - барстаром под управлением конститутивного промотора цитомегаловируса.....	43
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	49

ВВЕДЕНИЕ

Генная терапия – один из перспективных методов лечения заболеваний различной этиологии, основанный на введении терапевтических нуклеиновых кислот в клетки-реципиенты с целью компенсации генных дефектов, что приводит к частичному или полному восстановлению функции поврежденного гена [Шубина с соавт., 2012]. Ряд генотерапевтических подходов был разработан для лечения рака. Так, перспективным направлением генной терапии рака является суицидальная генотерапия, основанная на доставке в клетки-мишени цитотоксического агента, избирательно элиминирующего опухолевые клетки [Touchefeu *et al.*, 2010]. Для реализации данного подхода существуют две возможные стратегии: непрямая генная терапия с использованием фермент-активируемого пролекарства, метаболиты которого индуцируют клеточную гибель; и прямая генная терапия с использованием гена токсина, экспрессия которого приводит к гибели опухолевых клеток [Navarro *et al.*, 2016]. Поиск и разработка суицидных генов и создание на их основе терапевтических генных конструкций является одним из приоритетных направлений генотерапии рака и отличается особой актуальностью.

Одним из кандидатных генов в этой области является ген рибонуклеазы (РНКаза) *Bacillus pumilus* 7P - биназы. Физико-химические свойства белка и его биологическая активность подробно изучены, показано, что фермент селективно ингибирует рост опухолевых клеток, не оказывая при этом значимого токсического влияния на нормальные клетки. При этом биназа отличается низкой иммуногенностью и не вызывает индукции Т-клеточного ответа [Zelenikhin *et al.*, 2016]. Создание суицидальной генетической конструкции на основе гена бактериальной РНКаза позволит избирательно индуцировать гибель опухолевых клеток без возникновения воспалительных реакций в организме и других нежелательных побочных эффектов.

В связи с этим, целью данной работы явилось создание суицидальной генетической конструкции на основе гена цитотоксичной биназы для ее экспрессии в клетках эукариот.

В работе решались следующие задачи:

- 1) Создать генетическую конструкцию на основе вектора pTurboGFP-C, несущую ген биназы, адаптированный для экспрессии в клетках млекопитающих, под контролем промотора цитомегаловируса;
- 2) Клонировать промотор гена ингибитора секретируемой протеазы лейкоцитов человека hSLPI в вектор pTurboGFP-PRL и оценить его функциональную активность;
- 3) Клонировать ген биназы в вектор pTurboSLPIa-GFP под контроль опухоли-специфичного промотора hSLPI;
- 4) Создать репортерную конструкцию на основе вектора pTurboGFP-C, несущую гены биназы и ее ингибитора - барстара под контролем промотора цитомегаловируса.

ВЫВОДЫ

1) Создана генетическая конструкция на основе вектора pTurboGFP-C, несущая ген биназы, адаптированный для экспрессии в клетках млекопитающих, под контролем промотора цитомегаловируса. Показано, что данный промотор не подходит для клонирования токсичного гена биназы, ввиду его базовой активности в клетках прокариот.

2) Промотор гена ингибитора секретируемой протеазы лейкоцитов человека hSLPI клонирован в вектор pTurboGFP-PRL. Показана функциональная активность и специфичность работы промотора hSLPI по отношению к опухолевым клеткам аденокарциномы легкого человека A549. При этом промотор не активен в нормальных клетках - фибробластах легкого эпителия человека WI-38.

3) Ген биназы клонирован под контроль опухоль-специфичного промотора hSLPI в вектор pTurboSLPIa-GFP. Показано, что клонированный ген не соответствовал аутентичной последовательности гена биназы, а обладал набором мутаций и вставок.

4) Создана репортерная конструкция на основе вектора pTurboGFP-C, несущая гены биназы и ее ингибитора – барстара под контролем промотора цитомегаловируса. Ген биназы экспрессировался совместно с геном зеленого флуоресцентного белка TurboGFP.