

Министерство образования и науки РФ  
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования  
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ И  
БИОЛОГИИ

КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ

Направление: 06.03.01 (ОКСО 020400.62) - биология

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

Бакалаврская работа

**Получение стабильных культур мезенхимных  
стволовых клеток со сверхэкспрессией генов  
цитокинов TNFSF10, GM-CSF, IFNA17, IL-2 и  
фосфатазы PTEN**

Работа завершена:

«20» мая 2017 г.



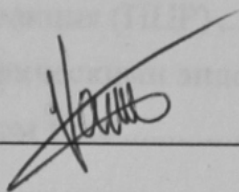
Чулпанова Д.С.

Работа допущена к защите:

Научный руководитель:

к.б.н., н.с. ИФМиБ КФУ

«5» июня 2017 г.

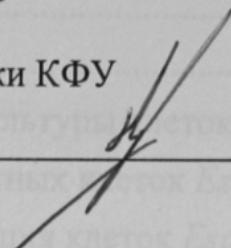


Соловьева В.В.

Заведующий кафедрой:

д.б.н., профессор кафедры генетики КФУ

«5» июня 2017 г.



Чернов В.М.

Казань-2017

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ</b> .....	4
<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	5
<b>1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	7
1.1 Мезенхимные стволовые клетки в терапии онкологических заболеваний.....	7
1.1.1 Взаимодействие между опухолью и МСК.....	7
1.1.2 Использование генетически модифицированных МСК в терапии онкологических заболеваний.....	10
1.2 Цитокины в терапии онкологических заболеваний.....	13
1.2.1 Гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор.....	14
1.2.2 Интерфероны I-го типа. Интерферон альфа.....	16
1.2.3 Интерлейкин-2.....	18
1.2.4 Лиганд TRAIL суперсемейства фактора некроза опухоли.....	20
1.2.5 Фосфотаза PTEN.....	21
1.3 Lentivirus.....	23
1.3.1 Структура генома.....	23
1.3.2 Структура вириона.....	24
1.3.3 Lentivirusные векторы.....	24
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b> .....	26
<b>ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ</b> .....	27
<b>2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b> .....	27
2.1 Плазмидные векторы.....	27
2.1.1 Субклонирование генов IFNA17, TNFSF10, PTEN и GM-CSF в лентивирусный плазмидный вектор по технологии Gateway.....	27
2.1.2 Полимеразная цепная реакция (ПЦР).....	28
2.1.3 Рестрикция ДНК специфическими эндонуклеазами.....	29
2.1.4 Электрофорез в агарозном геле.....	30
2.2 Бактериальные культуры.....	32
2.2.1 Бактериальный штамм.....	32
2.2.2 Приготовление ночной культуры клеток <i>Escherichia coli</i> .....	32
2.2.3 Приготовление компетентных клеток <i>Escherichia coli</i> .....	33
2.2.4 Генетическая трансформация клеток <i>Escherichia coli</i> .....	33

2.2.5	Выделение плазмидной ДНК из культуры клеток <i>E. coli</i> TOP 1034	
2.3	Культивирование эукариотических клеток	36
2.3.1	Клеточная линия НЕК293FT	36
2.3.2	Выделение и культивирование мезенхимных стволовых клеток из жировой ткани человека	36
2.3.3	Определение иммунофенотипа мезенхимных стволовых клеток из жировой ткани человека	37
2.3.4	Процедура пассирования культур клеток	39
2.3.5	Получение рекомбинантных лентивирусов	40
2.3.6	Определение чувствительности к антибиотику	41
2.3.7	Генетическая модификация мезенхимных стволовых клеток	42
2.3.8	Селекция генетически модифицированных МСК	42
2.4	Статистический анализ	43
<b>3</b>	<b>РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ</b>	<b>44</b>
3.1	Субклонирование генов IFNA17, TNFSF10, PTEN и GM-CSF в лентивирусный плазмидный вектор по технологии Gateway®	44
3.2	Выделение плазмидной ДНК из бактериальных клеток и последующий рестрикционный анализ	45
3.3	Выделение мезенхимных стволовых клеток из жировой ткани человека	47
3.4	Определение иммунофенотипа выделенных мезенхимных стволовых клеток	47
3.5	Получение рекомбинантных лентивирусов	48
3.6	Определение чувствительности к антибиотику бластицидин S	49
3.7	Генетическая модификация мезенхимных стволовых клеток	51
	<b>ВЫВОДЫ</b>	<b>52</b>
	<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ</b>	<b>53</b>

## ВВЕДЕНИЕ

По данным официальной статистики в 2015 году в Российской Федерации выявлено 589 тыс. новых случаев злокачественных новообразований. Прирост данного показателя по сравнению с 2014 годом составил 4.0 %, по сравнению с 2005 годом — 22.1 %. Показатель распространенности злокачественных новообразований в массиве населения России в 2015 году составил 2329.8 на 100 тыс. населения, что выше уровня 2005 года на 39.8 %.

Химио- и лучевая терапия, которые в настоящее время активно используются для лечения злокачественных новообразований, оставляют тяжелые последствия на организм человека в целом, не только уничтожая опухолевые клетки, но и повреждая здоровые клетки и ткани организма. Таким образом, на фоне повышения смертности пациентов с онкологическими заболеваниями и снижения эффективности противоопухолевой терапии, поиск альтернативных методов терапии онкологических заболеваний является актуальной проблемой.

В качестве нового метода терапии онкологических заболеваний человека рассматривается подход лечения опухолей и метастатической болезни человека с использованием собственных мезенхимных стволовых клеток (МСК), модифицированных рекомбинантными конструкциями, кодирующими гены-супрессоры опухолей или гены цитокинов/хемокинов, оказывающие иммуномодулирующий и противоопухолевый эффекты [Nowakowski *et al.*, 2016].

Цитокины представляют собой молекулярные мессенджеры, которые позволяют клеткам иммунной системы взаимодействовать друг с другом. Цитокины непосредственно стимулируют иммунные эффекторные клетки и стромальные клетки, тем самым регулируя развитие опухоли и ее микроокружения. Многочисленные исследования на культурах клеток и

моделях животных с опухолями показали, что многие цитокины обладают широкой противоопухолевой активностью [Ardolino *et al.*, 2015].

МСК обладают иммунологической инертностью и естественным тропизмом к местам локализации опухолей, что позволяет их использовать в качестве вектора для целевой доставки противоопухолевых агентов [Uchibori *et al.*, 2014].

**Цель работы** — получение культуры мезенхимных стволовых клеток человека со сверхэкспрессией генов цитокинов и супрессоров опухоли путем их генетической модификации рекомбинантными лентивирусами, кодирующими гены TNFSF10, GM-CSF, IFNA17, IL-2 и фосфатазы PTEN.

**Задачи исследования:**

- 1) Провести субклонирование генов IFNA17, TNFSF10, PTEN и GM-CSF в лентивирусный плазмидный вектор pLX303.
- 2) Получить рекомбинантные лентивирусные векторы, кодирующие гены цитокинов (LV-IFNA17, LV-TNFSF10, LV-IL2, LV-GMCSF), онкосупрессора человека (LV-PTEN) или зеленого флуоресцентного белка (LV-GFP).
- 3) Выделить из жировой ткани мезенхимные стволовые клетки и определить их иммунофенотип.
- 4) Провести генетическую модификацию мезенхимных стволовых клеток из жировой ткани человека полученными лентивирусами, кодирующими гены цитокинов, онкосупрессора человека или зеленого флуоресцентного белка.
- 5) Провести селекцию генетически модифицированных клеток путем культивирования в присутствии антибиотика бластицидин S.