

## Секция «Биоинженерия и биоинформатика»

### Создание генетических конструкций на основе аденовируса экспрессирующей нейрональную молекулу клеточной адгезии NCAM-L1 *Федотова Валерия Юрьевна*

*Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, Казань, Россия  
E-mail: kaleria08@gmail.com*

Средняя продолжительность жизни за последние 60 лет по данным ВОЗ значительно увеличилась. Однако столь положительная на первый взгляд динамика, привела к старению населения, что в свою очередь негативно отразилось на статистике нейродегенеративных заболеваний. На сегодняшний день, существующие методы лечения дают лишь симптоматическое облегчение, не устраняя самой проблемы. Однако современные возможности генной и генно-клеточной терапии открывают перед нами большие перспективы.

Одной из основных проблем генной терапии на сегодняшний день остается эффективная адресная доставка рекомбинантного гена в клетки-мишени и обеспечение его длительной и эффективной экспрессии. Векторы на основе вирусов, в частности аденовирусов, обеспечивают эффективную трансдукцию и относительно длительную экспрессию, однако адресная доставка генов пока остается серьезной проблемой.

Нейрональные молекулы клеточной адгезии L1 (NCAM-L1) экспрессируются на поверхности нервных клеток, обеспечивая как гомофильное, так и гетерофильное взаимодействие. Играют решающую роль в развитии и организации нейронов, росте и объединении аксонов в пучок, миелинизации, синаптогенезе, миграции, выживании нейронов, синаптической пластичности и регенерации аксонов после травмы.

Целью нашей работы стало создание рекомбинантного аденовирусного экспрессионного вектора на основе pAD/CMV/V5-DEST (далее pAd), экспрессирующего нейрональную молекулу клеточной адгезии L1 (NCAM-L1). Для этого была применена технология Gateway-клонирования (Invitrogen).

Рекомбинантный аденовирус получали в несколько этапов. Для начала, полученный методом ПЦР, фланкированный att сайтами ПЦР-продукт кДНК целевого гена *ncam-l1* использовали для рекомбинации по технологии Gateway (Invitrogen) для создания исходного клона (pDONR221-*ncam-l1*). Затем путем рекомбинации исходного клона с вектором-назначения (pAd/CMV/V5-Dest), получили экспрессионный клон (pAd-*ncam-l1*). Полученными конструкциями трансфицировали клетки линии НЕК293А (human embryonic kidney 293A). Эффективность трансфекции подтвердили с помощью иммуноцитохимического анализа с применением специфичных антител к NCAM-L1 человека (Santa Cruz Biotechnology) и вторичных антител конъюгированных с флуоресцентной меткой Alexa – 488 (Invitrogen). Затем путем трансфекции клеток линии НЕК293А были получены репликативно-дефектные вирусные частицы Ad5-*ncam-l1*. В дальнейшем, полученные конструкции будут использованы для модификации мононуклеарных клеток пуповинной крови человека, что предположительно повысит адресную миграцию генетически модифицированных клеток в нервную ткань и позволит повысить эффективность генно-клеточной терапии нейродегенеративных заболеваний.