

Создание рекомбинантных лентивирусных векторов, кодирующих гены цитокинов человека

Научный руководитель – Соловьева Валерия Владимировна

Чулпанова Дарья Сергеевна

Студент (бакалавр)

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Институт фундаментальной медицины и биологии, Кафедра генетики, Казань, Россия

E-mail: daryachulpanova@gmail.com

Цитокины представляют собой молекулярные мессенджеры, которые позволяют клеткам иммунной системы взаимодействовать друг с другом. Цитокины непосредственно стимулируют иммунные эффекторские клетки и стромальные клетки, тем самым регулируя развитие опухоли и ее микроокружения. Многочисленные исследования на культурах клеток и животных опухолевых моделях показали, что цитокины обладают широкой противоопухолевой активностью. Актуальным направлением исследований является таргетная терапия онкологических заболеваний с использованием генных конструкций, экспрессирующих различные цитокины с противоопухолевой активностью.

В настоящей работе были получены рекомбинантные плазмидные конструкции, кодирующие гены фактора некроза опухоли (ФНО, TNFSF10), интерферона α (ИФН- α , IFNA17), интерлейкина-2 (ИЛ-2, IL-2) и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ, CSF-2). Плазмидные конструкции на основе вектора pLX303 (Addgene, США), кодирующие гены вышеописанных цитокинов, были получены путем субклонирования из ранее полученного вектора-донора pDONR221 методом LR-рекомбинации (технология Gateway, Invitrogen, США). Продуктами рекомбинации трансформировали компетентные клетки *E. coli*. Позитивные клоны бактерий были проверены на наличие целевых генов с помощью ПЦР скрининга бактериальных колоний с вектор-специфичными праймерами и электрофореза ДНК в агарозном геле. Выделенная из положительных клонов плазмидная ДНК была проанализирована рестрикционным анализом с эндонуклеазами рестрикции KpnI и XhoII (ThermoFisher Scientific, США).

Рекомбинантные лентивирусы были получены путем ко-трансфекции пакующей линии клеток HEK293FT тремя плазмидами: векторной плазмиды, несущей целевой ген; плазмиды, несущей гены оболочки gag/pol и дополнительные гены вириона (pCMV-dR8.2 dvpr, Addgene, США); и плазмиды, несущей ген гликопротеина G вируса везикулярного стоматита (pCMV-VSV-G, Addgene, США). Полученные лентивирусы концентрировали с помощью ультрацентрифугирования в течение 2 часов при 26 000 об/мин. Вирусный титр определяли методом проточной цитофлуориметрии клеток, зараженных собранным в параллели лентивирусом, несущим ген зеленого флуоресцентного белка (GFP).

Функциональность и противоопухолевая активность полученных вирусов будет исследована в дальнейшем на различных культурах опухолевых клеток *in vitro*.