

ЛИНЕЙНЫЕ ПЦР АМПЛИКОНЫ ТРАНСГЕНОВ ДЛЯ ТРАНСФЕКЦИИ КЛЕТОК

Д. А. Илькевич

*Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4,
220030, г. Минск, Беларусь, ilevich.darya.a@gmail.com*

Научный руководитель — М. В. Белевцев, кандидат биологических наук, доцент

В рамках работы был проведен эксперимент, целью которого была проверка гипотезы о возможности и эффективности трансфекции клеток ПЦР-ампликонами при включении в праймеры поли-G-последовательностей, а также их комбинации с фосфоротиоатной модификацией, в сочетании с наличием или отсутствием последовательностей ДНК, нацеленных на ядерное ядро.

Ключевые слова: линейные ПЦР ампликоны; трансгены; GC-богатые повторы; фосфоротиоатная модификация; ядерная нацеливающая последовательность ДНК.

ДНК-вакцины являются многообещающей стратегией в лечении опухолевых заболеваний. Данный тип вакцин представляет собой генетические конструкции, несущие один или несколько сайтов, кодирующих опухоль-ассоциированные антигены, вследствие чего способны стимулировать иммунную систему, обеспечивая ингибирование метастазирования и разрушение существующих онкоцитов [1]. Существует несколько дизайнов целевой ДНК для трансфекции. Классический – использование плазмидной ДНК, несущей в своем составе необходимый антиген(ы) под контролем соответствующих промоторов, обеспечивающих длительную экспрессию трансгена. Плазмидная ДНК помогает обеспечить надежную экспрессию целевого белка. Однако, данный тип имеет ряд недостатков, включающий также наличие сайтов устойчивости к антибиотикам в плазмиде, трудности интеграции производства в автоматизированные рабочие процессы, а также является относительно времяемким, требующим затраты необходимые для клонирования, размножения и очистки плазмид, что уже значительно снижает потенциал их использования и, ключевое, неэффективное проникновение крупных плазмид в ядро. Решением данных проблем является разработка неплазмидных ампликонов, полученных в процессе ферментативной амплификации векторов экспрессии с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Но в то же время линейные матрицы преодолевают ограничения подготовки плазмидной ДНК, но являются уязвимыми к действию нуклеаз [1]. На данный момент разработано три основных пути,

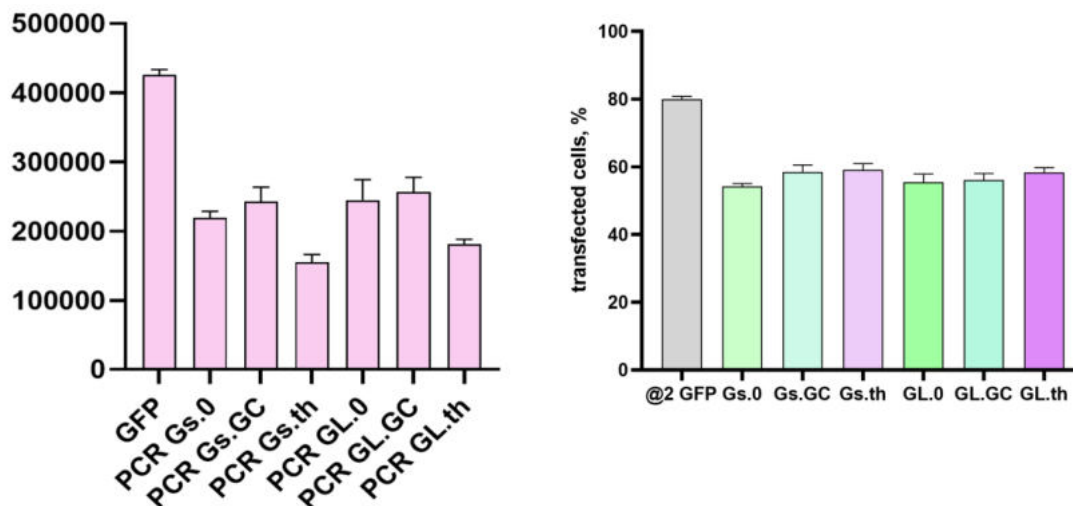
решающих данную проблему. Первый – геномные модификации, приводящие к снижению скорости роста и крайне низкой жизнеспособности. Второй – поиск ингибиторов нативных нуклеаз (GamS – разновидность Gam-белка бактериофага λ , Chi, Ku, CID 697851 и CID 1517823 являются установленными ингибиторами RecBCD). И третий, в настоящее время единственный применимый к эукариотическим клеткам, путь – изменение дизайна линейной матрицы [2]. Наиболее целесообразным решением для повышения стабильности линейной ДНК – создание защитных последовательностей на ее концах. Метод включает в себя амплификацию защитной последовательности до конца линейной ДНК путем создания праймеров данных последовательностей при получении ДНК через ПЦР. Защитные последовательности разрабатываются на основе различного содержания пар GC. При этом, длина праймера не должна превышать 20 п.н. ввиду того, что длинные праймеры приведут к повышению температуры, что затруднит ПЦР и приведет к несовпадению и появлению множественных продуктов. Также вариативной является аранжировки нуклеотидных последовательностей: «GCGC» или «GGCC», т.е. с чередованием оснований и без соответственно. Установлено, что наименее эффективное связывание линейных матриц ДНК с нативными нуклеазами достигается при чередовании нуклеотидов «GGCC», т.е. очередном, при содержании GC пар в диапазоне 60-65% и при задней либо передней локализации [3]. Также существуют нативные механизмы перемещения линейной матрицы ДНК к ядру и ее транслокации через нуклеолему. Но активного транспорта через ядерный поровый комплекс недостаточно для обеспечения эффективной экспрессии целевого опухоль- ассоциированного антигена. Более того, медленный ядерный импорт дает больше времени нативным нуклеазам для взаимодействия с концевыми сайтами, что также значительно снижает выход целевого белка. Поэтому на данный момент этап транспорта в ядро является стадией лимитирующей экспрессию линейной матрицы ДНК. Наиболее перспективным решением данной проблемы является включение определенных последовательностей, облегчающих транслокацию через нуклеолему. Установлены области, способствующие проникновению в ядро целевой ДНК в неделящихся клетках. Данная последовательность включает точку начала репликации, частично два промотора, а именно раннего и позднего, и энхансер SV40. Показано, что меньший участок генома SV40, включающий энхансерный элемент размером 72 п.н., приводит к усилению транскрипции репортерного гена. При этом

тестировались непосредственно ранний промотор и энхансер цитомегаловируса человека (hCMVier) и промотор LTR вируса саркомы Рауса (RSV-LTR) – оба промотора сильнее, чем у SV40, но в итоге уровень ядерной локализации снижался [4].

Нами был проведен эксперимент, целью которого являлась проверка гипотезы о возможности и эффективности трансфекции клеток ПЦР ампликонами, при включении в состав праймеров векторов GC-богатых повторов, а также их сочетание с фосфоротиоатной модификацией, в комбинации с наличием или отсутствием ядерных нацеливающих последовательностей (DTS). Для этого в качестве матриц были использованы плаزمиды, кодирующая зеленый флуоресцентный белок TurboGFP (pGFP), кодирующая GFP и имеющая в своем составе две ядерной нацеливающей последовательности (pGFP-DTS), плазмиды, кодирующая флуоресцентный белок iRFP713 (piRFP) и кодирующая iRFP и имеющая в своем составе четыре последовательности DTS (piRFP-DTS). Трансфекция оценивалась по проценту GFP положительных клеток и средней интенсивности флуоресценции (MFI) GFP. Установлено, что наиболее эффективная экспрессия целевой последовательности одного из флуоресцентных белков наблюдается при трансфекции клеток исходной матричной плазмидой. При этом, ампликоны с праймерами, снабженными 5'-GC-«хвостами», несущими фосфоротиоатную модификацию, но не несущие DTS, показывали меньшую активность экспрессии с допустимым значением уровня значимости погрешности (0,0022). Ампликоны не несущие каких-либо модификаций в праймерах и не имеющие в своем составе областей DTS, демонстрировали более низкую активность экспрессии, чем соответственные им снабженные 5'-GC-«хвостами» и несущими фосфоротиоатную модификацию либо только обладающие 5'-GC-«хвостами» ампликонами, также с допустимым уровнем значимости в обоих случаях (0,0022 и 0,0022). ПЦР продукты, несущие последовательности DTS, 5'-GC-«хвостами» и фосфоротиоатную модификацию показали активность экспрессии выше, чем ампликон только с областями DTS, однако со значением уровня значимости выше допустимого (0,0260), что не дает рассматривать этих данных в качестве достоверных. ПЦР продукты только с DTS экспрессировались менее активно, чем аналогичные им, но несущие 5'-GC-«хвостами», но также с показателем уровня значимости выше допустимого (0,5887).

Таким образом, наибольшую активность экспрессии проявили короткие (1699 п.н.) ампликоны несущие в своем составе 5'-GC-

«хвостами» (в чередующейся очередности). При этом, фосфоротиоатная модификация, как и добавление последовательностей DTS, значимого вклада в эффективность трансфекции не внесли.



Результаты активности экспрессии по данным проточной цитометрии по значениям MFI (слева) и проценту трансфицированных клеток (справа): GFP – плаزمид (контроль); Gs – последовательности длиной до 2000 п.н. несущие белок GFP (GFP short); GL – последовательности длиной свыше 2000 п.н. несущие белок GFP (GFP long); 0 – базовые праймеры; GC – праймеры богатые GC-повторами; th – праймеры богатые GC-повторами и фосфоротиоатной модификацией.

Библиографические ссылки

1. Linear DNA amplicons as a novel cancer vaccine strategy/ Conforti A. [et al.] // J. Experimental & Clinical Cancer Res. 2022. Vol. 41. P. 324-368.
2. Mapping of scaffold/matrix attachment regions in human genome: a data mining exercise / Narwade N. [et al.] // Nucleic Acids Research. 2019. Vol. 47, iss. 14. P. 7247-7254.
3. Chen X., Lu Y. In silico Design of Linear DNA for Robust Cell-Free Gene Expression // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. 2021. Vol. 9. P.126-134.
4. Dean D. A. Import of Plasmid DNA into the Nucleus Is Sequence Specific // Experimental Cell Research. 1997. Vol. 230, iss. 2. P. 293-302.