

Анализ эффективности трансдукции клеточных культур человека с помощью аденоассоциированных вирусов различных серотипов.

Научный руководитель – Шаймарданова Алиса Алмазовна

Губайдуллина Айгуль Айдаровна

Выпускник (бакалавр)

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

E-mail: gubajdullina.a.a@gmail.com

Генная терапия – революционный подход к лечению заболеваний путем введения генетического материала в клетки пациента для коррекции дефектов или обеспечения терапевтического эффекта. Аденоассоциированные вирусы (ААВ) являются привлекательными векторами для генной терапии из-за высокой эффективности трансдукции, отсутствия патогенности и способности интегрироваться в геном хозяина без нарушения функции генов [2]. Известно порядка двенадцати различных серотипов ААВ человека, каждый из которых имеет уникальную капсидную структуру и определенные преимущества. Эффективность трансдукции может значительно варьироваться в зависимости от используемого серотипа ААВ [3]. Для оптимизации выбора вектора для конкретных клеток-мишеней необходимо изучение и сравнение эффективности трансдукции различных серотипов ААВ [4]. На основании всех этих данных была поставлены задачи: получение вирусных векторов на основе плазмид, модификация ими клеточных линий HEK293 и SH-SY5Y и дальнейший анализ уровня экспрессии гена *GFP* в клетках. **Целью** работы стало сравнение эффективности трансдукции клеточных культур с использованием серотипов 2, 9, 10 и Olig001 ААВ и определение оптимального вектора.

Материалы и методы. Для наработки плазмидной ДНК в препаративных количествах необходимо было сначала получить рекомбинантные штаммы *Escherichia coli*, содержащие необходимые плазмиды, и из полученной бактериальной биомассы выделить плазмидную ДНК. В сборке рекомбинантных ААВ использовались плазмиды pAAV-RC2, pAAV-RC9, pAAV-RC10, pAAV-RCOlig001 (Agilent Technologies, США) и pHelper (Agilent Technologies, США), pAAV-GFP.

Клетки AAV293 культивировали при 37°C во влажной атмосфере с 5% содержанием CO₂ с плотностью клеточного монослоя не менее 50% в полной среде DMEM/F12. Непосредственно перед трансфекцией плотность монослоя составляла 70 – 80%. Трансфекцию проводили с использованием полиэтиленимина (Кат. № 408727, Sigma-Aldrich, США).

Генную модификацию клеточных линий HEK293 и SH-SY5Y проводили путем введения стоковых растворов вирусных частиц AAV2-GFP, AAVOlig001-GFP, AAV9-GFP, AAV10-GFP (рисунок). Для трансфекции использовали культуру клеток с плотностью монослоя 70 – 90%, культивируемых в 24-луночных культуральных планшетах. За день до трансфекции засевали клетки в 24-луночный планшет по 60 000 клеток в 500 мкл полной среды DMEM, культивировали при 37°C во влажной атмосфере с 5% содержанием CO₂. При приготовлении смеси для трансдукции учитывали показатель множественности инфекции 100. В качестве MOI 100 для культуры клеток выбрали 500 000 вирусных частиц на одну клетку. По прошествии 2 суток после трансфекции проанализировали уровень экспрессии репортерного трансгена методом флуоресцентной микроскопии [1].

Результаты и обсуждение. В результате были получены рекомбинантные вирусные векторы; титр вируса был определен путем ПЦР-РВ и составил для серотипов: AAV2-GFP — 6.02*10¹² генкопий/мл, AAVOlig001-GFP — 4.54*10¹³ генкопий/мл, AAV9-GFP

— $6.34 \cdot 10^{13}$ генкопий/мл, AAV10-GFP — $4.09 \cdot 10^{13}$ генкопий/мл. Успешная трансдукция сконструированными ААВ культуры клеток HEK293 и SH-SY5Y продемонстрировала экспрессию гена *GFP*, что является показателем функциональности данной генетической каскады. Также синтез генетически модифицированными клетками активного белка позволил судить о различной эффективности серотипов вируса в способности трансдуцировать культуры клеток. Полученные результаты соответствуют показателям предпочтительного тропизма данных серотипов. В случае клеток HEK293 наивысшим показателем траснфекции обладал серотип ААВ 2, что объясняется его уникальным широким спектром тропности, а также распространенностью его дополнительных корецепторов на поверхности различных клеток. В случае клеток нейробластомы наивысшим показателем обладает модифицированный серотип ААВ Olig001, так как он отличается преимущественным тропизмом для поверхности клеток нервной системы. Для 9 и 10 серотипа, занимающих промежуточное положение в трансдукции как HEK293, так и SH-SY5Y, показатели подтверждаются их склонностью к более успешному инфицированию иных клеток, например, тканей печени или мышечных тканей, что напрямую связано со способностью преодолевать физический барьер эндотелия сосудистой системы.

Заключение. Полученные результаты отражают предпочтительный тропизм различных серотипов ААВ. При этом наиболее эффективным, судя по показателям, является серотип ААВ2, в особенности из-за его широкого спектра тропности. Это также объясняет его широкое использование при разработке лекарственных препаратов. Для более узко специализирующихся исследований эффективнее использование серотипов с модифицированными капсидами, так как это повышает уровень сродства и преимущественный тропизм, например, к клеткам нервной системы.

Источники и литература

- 1) Шаймарданова А.А. Практикум по разработке и анализу генетических векторов на основе аденоассоциированного вируса для лечения лизосомных болезней накопления: учебно-методическое пособие / А.А. Шаймарданова, А.И. Муллагулова, А.А. Ризванов, В.В. Соловьева // Казань: Изд-во Казан. Ун-та, 2022. С. 57.
- 2) Bijlani S. The Role of Recombinant AAV in Precise Genome Editing / S. Bijlani, K.M. Pang, V. Sivanandam [et al.] // Front Genome Ed. 2022. V.3. P.799722. DOI: 10.3389/fgeed.2021.799722
- 3) Srivastava A. In vivo tissue-tropism of adeno-associated viral vectors // Curr Opin Virol. 2016. V.21. P.75-80. DOI: 10.1016/j.coviro.2016.08.003
- 4) Riyad J.M. Intracellular trafficking of adeno-associated virus vectors: challenges and future directions / J.M. Riyad, T. Weber // Gene Ther. 2021. V.28(12). P.683-696. DOI: 10.1038/s41434-021-00243-z

Иллюстрации

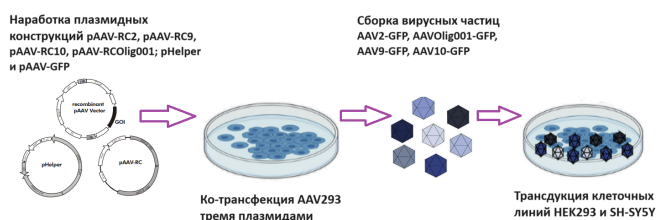


Рис. : Рисунок. Схема эксперимента по генетической модификации клеточных линий