

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-269

**ТЕСТИРОВАНИЕ ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ
ГЕНОТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЙ В МОДЕЛИ *Danio rerio******TESTING POTENTIAL COMPONENTS OF GENE THERAPY CONSTRUCTS IN *DANIO RERIO* MODEL**

П. И. Селина

Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва

P.I. Selina

National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow

✉ greenapple_35@mail.ru

Аннотация

Поиск эффективных элементов генотерапевтических векторов является важным направлением медико-биологических исследований. В данной работе проведена оценка эффективности функционирования гена протеазы 3С вируса гепатита А человека, промотора гена фактора роста соединительной ткани и промотора гена белка активации фибробластов человека в составе векторов при использовании эмбриональной модели *Danio rerio*.

Abstract

The search for effective elements of gene therapy vectors is an important area of biomedical research. In this work, the efficiency of the functioning of the human hepatitis A virus protease 3C gene, the human connective tissue growth factor gene promoter and the human fibroblast activation protein gene promoter as part of vectors was evaluated using the *Danio rerio* embryonic model.

Одним из ключевых этапов разработки генотерапевтических средств является подбор оптимальных компонентов векторов для обеспечения эффективного действия генетических конструкций. В случае противораковой терапии актуальные направления поиска связаны с генами цитотоксических белков, имеющих каспазо-независимый механизм действия, и промоторных элементов строма-ассоциированных генов, функционирующих в условиях активно изменяющейся структуры тканей.

Цель данной работы заключалась в оценке перспективности использования трех потенциальных векторных компонентов: гена протеазы 3С вируса гепатита А человека (3Cpro), промотора гена фактора роста соединительной ткани (CTGF) и промотора гена белка активации фибробластов (FAP).

Для изучения эффективности функционирования тестируемых генетических элементов на организменном уровне была применена разработанная нами экспериментальная система на основе эмбриональной животной модели *Danio rerio* (зебрафиш). Методика позволяет проанализировать уровень и динамику накопления целевых белков, идентифицировать типы и количество клеток, в которых происходит экспрессия, охарактеризовать связанные с введением генетических конструкций и экспрессией экзогенных белков в клетках животных токсические эффекты и формирование различных патологий у модельного организма [1, 2]. Для характеристики функционирования промоторных элементов были созданы плазмидные генетические конструкции, в которых находились репортерные гены люциферазы светлячка *Photinus pyralis* и зеленого флуоресцентного белка EGFP под управлением промотора гена CTGF человека (-365/+43 от сайта начала транскрипции нативного гена) или промотора гена FAP человека (-2026/+118 от сайта начала транскрипции нативного гена). В качестве контролей были использованы плазмиды с конститутивным промотором предранних генов цитомегаловируса человека (CMV) и векторы, не имеющие целевого гена или промотора в составе экспрессионной кассеты. Для оценки токсичности протеазы 3С вируса гепатита А человека был сконструирован вектор с геном 3Cpro под управлением промотора CMV. В качестве контролей были использованы векторы с геном инактивированного варианта фермента с заменой Cys172/Ala в каталитическом центре или с репортерным геном люциферазы светлячка. Генетические конструкции, содержащие анализируемые компоненты, вводили в оплодотворенные яйцеклетки *Danio rerio* до первого деления стадии дробления в количестве 3–30 амоль/эмбрион.

В результате работы было показано, что промоторы FAP и CTGF обеспечивали сопоставимое накопление маркерных белков с уровнем, обусловленным функционированием контрольного промотора CMV. При этом вы-

* Исследование выполнено в рамках государственного задания НИЦ «Курчатовский институт».

сокую экспрессионную активность промотора FAP наблюдали только у животных, имеющих скелетно-мышечные патологии, в связи с чем эффективное функционирование данного элемента, по-видимому, связано с нарушением правильной структуры тканей модельного организма. Показано, что экспрессия гена 3Срго в клетках животных приводила к гибели 70 % особей и образованию аномалий в развитии у жизнеспособных организмов в течение 24 ч после инъекции векторной ДНК.

Таким образом, экспрессия гена 3С протеазы вируса гепатита А человека способна приводить к выраженным токсическим эффектам в организменной системе. Однако необходимы дополнительные исследования для изучения специфичности 3Срго в отношении непосредственно раковых клеток в животных моделях. Полученные данные указывают на способность промоторов CTGF и FAP человека обеспечивать достаточно эффективную экспрессию целевых генов на организменном уровне, вследствие чего протестированные промоторы могут быть использованы для разработки генотерапевтических векторов. При этом промотор FAP представляется наиболее перспективным для создания генетических конструкций, нацеленных на атипично структурированные ткани, одним из частных случаев которых является опухоль-ассоциированная строма.

Литература

1. Selina P.I., Karaseva M.A., Komissarov A.A. et al. Embryotoxic activity of 3C protease of human hepatitis A virus in developing *Danio rerio* embryos // *Sci. Rep.* 2021. Vol. 11, No. 1. P. 18196.
2. Selina P.I., Alekseenko I. V., Kurtova A. I. et al. Efficiency of promoters of human genes FAP and CTGF at organism level in a *Danio rerio* model // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. Vol. 24, No. 8. P. 7192.