

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-283

ПОЛУЧЕНИЕ АДЕНОВИРУСНОГО ВЕКТОРА, НЕСУЩЕГО ГЕН ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО КАТЕЛИЦИДИНА

OBTAINING AN ADENOVIRUS VECTOR CARRYING THE HUMAN CATHELICIDIN GENE

В. С. Угрюмов^{1,2}, Р. З. Прусаков^{1,2}, В. М. Вахтинский²

¹Российский химико-технологический университет им. Д. И. Менделеева, Москва

²Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи, Москва

V. S. Ugriumov^{1,2}, R. Z. Prusakov^{1,2}, V. M. Vakhtinskii²

¹Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow

²N. F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow

✉ ugriumovvicheslav@mail.ru

Аннотация

Антимикробные пептиды (АМП) — перспективная альтернатива антибиотикам в условиях глобального кризиса устойчивости патогенов. В настоящей работе мы получили аденоовирусный вектор, несущий ген АМП кателицидина (hCAMP), активной формой которого является LL-37.

Abstract

Antimicrobial peptides (AMP) are a promising alternative to antibiotics in the context of the global pathogen resistance crisis. In this work, we have obtained an adenoviral vector carrying the AMP cathelicidin (hCAMP) gene, the active form of which is LL-37.

Введение

В 2019 г. антибиотикорезистентные патогенные микроорганизмы стали причиной 1,27 млн смертей и способствовали 4,95 млн смертей [1]. Антимикробные пептиды (АМП) являются перспективной альтернативой антибиотикам на фоне глобального кризиса антибиотикорезистентности патогенов. АМП LL-37 — представитель семейства кателицидинов человека обладает широким спектром antimикробной активности против грамположительных и грамотрицательных бактерий, поскольку, являясь амфи菲尔ной молекулой, внедряется и нарушает целостность бактериальных мембран. Прямое введение LL-37 в организм ограничено коротким периодом полу-распада *in vivo* и потенциальной цитотоксичностью при использовании высоких доз [2].

В качестве решения предлагается применение аденоовирусных векторов для доставки гена LL-37, поскольку Ad-вектор обладает высокими эффективностью трансдукции и экспрессией трансгена, широким тропизмом, оптимальным периодом экспрессии, способностью инфицировать делящиеся и неделящиеся клетки.

Целью работы являлась разработка аденоовирусного вектора, несущего ген кателицидина (hCAMP), активной формой которого является LL-37.

Ход работы

Исходя из данных о последовательности гена hCAMP, синтезированы 12 олигонуклеотидов, каждый из которых имеет концевые комплементарные участки с соседними. С помощью полимеразной цепной реакции с перекрывающимся концевыми участками (*overlap extension polymerase chain reaction*, далее ОЕ-PCR) синтезированы три промежуточных продукта, которые затем сшиты ОЕ-PCR (рис. 1). В результате получена последовательность 581 п. о., содержащая ген кателицидина и имеющая комплементарные с шаттл-вектором pCD515-mcherry концы.

С помощью метода сборки Гибсона осуществлено клонирование последовательности с геном кателицидина в pCD515-mcherry (рис. 2).

Полученный pCD515-LL-37 трансформировали в *E. coli* тепловым шоком. Из клонов выделена плазмидная ДНК и проанализирована методом рестрикционного анализа. Положительные клоны отправлены на секвенирование по Сэнгеру, по данным которого отобран необходимый клон.

Для получения аденоовирусного вектора плазмиду pCD515-LL-37 и плазмидный аденоовирусный вектор pBHG с делециями E1 и E3 котрансфицировали в HEK293. Благодаря наличию FRT-сайтов в обеих плазмидах

и из-за экспрессии FLP-рекомбиназы из pBHG участок pCD515-LL37, содержащий левый ITR, сигнал инкапсидации и экспрессионную кассету гена кателицидина, рекомбинировал в плазмиду pBHG (рис. 3).

Каждые 48 ч клетки пересевали, и через 7 дней с момента трансфекции был замечен цитопатический эффект. Из трансфицированных клеток выделена ДНК с помощью Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Cat. A1120, Promega) и проведен ее ПЦР-анализ (рис. 4).

Наличие ампликонов на гексон и ген кателицидина указывает на то, что полученный вирус — аденоовирус, содержащий геном кателицидина. Отсутствие ампликонов в области E1 свидетельствует о репликативной дефектности полученного вируса.

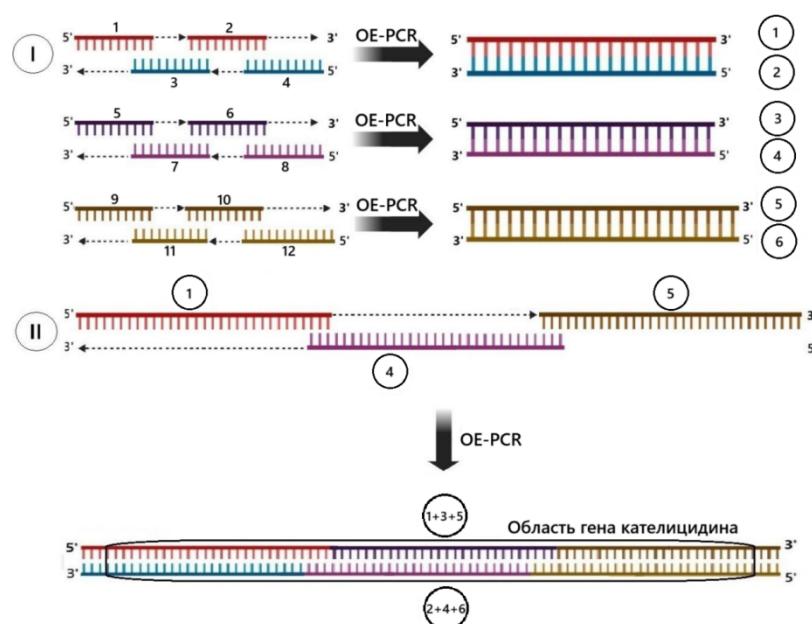


Рис. 1. Схема сборки последовательности, содержащей ген кателицидина: 1–12 — олигонуклеотиды; I — сборка трех частей гена; II — ОЕ-PCR промежуточных продуктов с образованием последовательности 581 п. о., содержащей ген интереса

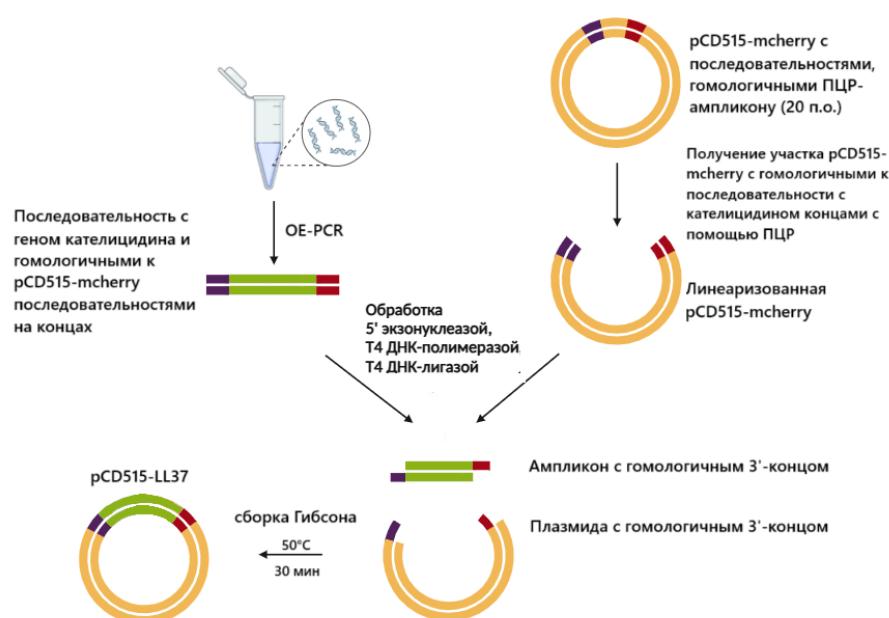


Рис. 2. Схема включения последовательности с геном интереса в шаттл-вектор pCD515-mcherry

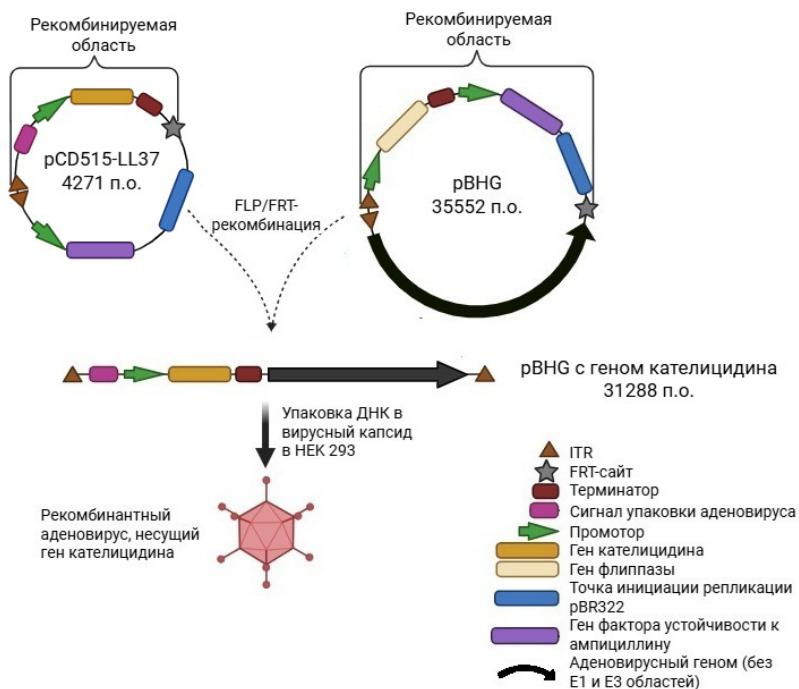


Рис. 3. Схема FLP-FRT-рекомбинации в HEK-293 между pCD515-LL37 и pBHG

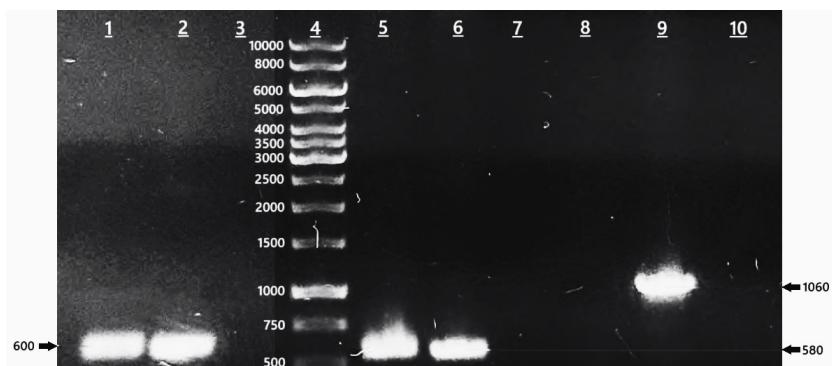


Рис. 4. Визуализация результатов ПЦР анализа в 0,8%-м агарозном геле.

Луники 1–3: ПЦР анализ на присутствие гена кателицидина (600 п. о.).

1 — трансфицированные клетки, 2 — положительный контроль, 3 — отрицательный контроль (ПЦР-смесь без добавления ДНК); 4 — GeneRuler 1kb DNA Ladder. Луники 5–7: ПЦР-анализ на присутствие аденоовирусного гексона (580 п. о.), 5 — инфицированные клетки, 6 — положительный контроль (pFG140), 7 — отрицательный контроль. Луники 8–10: ПЦР-анализ на присутствие E1-региона (1034 п. о.). 8 — инфицированные клетки, 9 — положительный контроль (pFG140), 10 — отрицательный контроль

Выходы

В ходе работы осуществлен синтез гена человеческого кателицидина методом сборки из праймеров. Полученный ген вставлен в плазмидный шаттл-вектор. Затем получен репликативно-дефектный вектор на основе аденоовириуса человека 5-го серотипа, несущий ген кателицидина.

Литература

1. World Health Organization WHO bacterial priority pathogens list, 2024: Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. URL: <https://www.who.int/publications/item/9789240093461> (accessed: 14.05.2025).
2. Wang G. et al. Design of antimicrobial peptides: progress made with human cathelicidin LL-37 // Antimicrob. Peptides: Basics Clin. Appl. 2019. P. 215–240.