

регенерации после операционного вмешательства, что позволит снизить риски развития неблагоприятных послеоперационных исходов.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Соломон, Л. Ортопедия и травматология по Эпли / Л. Соломон, Д. Уорик, Н. Селвадураи. – Москва : Издательство Панфилова, 2016. – 360 с.
2. Остеопороз у пожилых пациентов / Е.Н. Дудинская, Н.В. Браилова, В.А. Кузнецова, О.Н. Ткачева // Остеопороз и остеопатии. – 2019. – № 22(3). – С. 34 – 40.
3. Водно – электролитный обмен и его нарушения : руководство для врачей / под ред. А. И. Карпищенко. – Москва : ГЭОТАР – Медиа, 2022. – 208 с.
4. Перелом кости и её заживление – Текст : электронный // Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии имени Н.Н. Приорова. : [сайт]. – URL: <https://www.cito-priorov.ru/clinic/opisanie-pozologii/perelom-kosti-i-ego-zazhivlenie.php> (дата обращения: 11.01.2025).
5. Каплан, А.В. Повреждения костей и суставов : монография / А.В. Каплан – Москва : «МЕДИЦИНА», 1979. – 568 с.
6. Борзилова, Ю.А. Васкулоэндотелиальные факторы роста (VEGF): роль и место в патологических процессах / Ю.А. Борзилова, Л.А. Болдырева, И.В. Шлык // Вестник офтальмологии – 2016. – № 132(4). – С. 98 – 103.

Сведения об авторах

М.Е. Козлова* – студент

И.В. Голюк – студент

Н.С. Фертикова – старший преподаватель

Е.С. Козлов – кандидат медицинских наук, заведующий травматологическим отделением, врач – ортопед

Information about the authors

M.E. Kozlova* – Student

I.V. Golyuk – Student

N.S. Fertikova – Senior Lecturer

E.S. Kozlov – Candidate of Sciences (Medicine), Head of the Traumatology Department, orthopedic doctor

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

missroch245@mail.ru

УДК: 577.218

РАЗРАБОТКА ГЕННО – ИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ ИНДУКЦИИ ГИПЕРЭКСПРЕССИИ ГЕНА *AKT1*

Колесова Елизавета Сергеевна¹, Мелехин Всеволод Викторович^{1,2}

¹НОиИЦ ХФТ ХТИ

ФГАОУ ВО «УрФУ имени первого Президента России Б.Н. Ельцина»

²Кафедра биологии и биотехнологий

ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России

Екатеринбург, Россия

Аннотация

Введение. Одним из перспективных направлений в биомедицине является поиск новых диагностических методов и лечебных подходов, основанных на изучении молекулярных механизмов заболеваний. Особый интерес представляет ген *AKT1*. *AKT1* – изоформа протеинкиназы В, играющая центральную роль в сигнальном пути Р3К/АКТ, который контролирует клеточный рост, пролиферацию и апоптоз. Гиперэкспрессия *AKT1* характерна для многих злокачественных новообразований, что делает его перспективной мишенью для противоопухолевой терапии. Актуальной задачей является создание генно – инженерных систем для контролируемой гиперэкспрессии *AKT1* и получения на их основе стабильных клеточных линий человека с целью поиска новых диагностических и терапевтических стратегий. **Цель исследования** – разработать генно – инженерную конструкцию на основе экспрессионной векторной плазмиды, содержащей кодирующую последовательность *AKT1*. **Материал и методы.** Выделена суммарная мРНК из клеточной линии колоректальной аденокарциномы человека (CaCo – 2). мРНК использована в реакции обратной транскрипции для получения кДНК. К кодирующей последовательности кДНК *AKT1* были подобраны праймеры, содержащие с 5' – конца нуклеотиды – зацепки и сайты рестрикции EcoRI и BamHI. Подбор праймеров был осуществлен при помощи NCBI Primer – BLAST, Ugene, Gene Runner, bioinformatics.org. Клонировали кодирующую последовательность гена *AKT1* методом ПЦР. ДНК гена – интереса и плазмидного вектора pTagGFP2 – С подвергали реакциям рестрикции и лигированию. Для визуализации результатов и оценки успешности прохождения реакций использовали метод гель – электрофореза в 1 % агарозном геле. В качестве трансфекционного реагента использовали PEI. **Результаты.** В результате работы были получены положительные клоны, несущие рекомбинантную плазмиду pTagGFP2 – С – *AKT1*. Проведены ключевые этапы клонирования, включая рестрикцию, лигирование и трансфекцию, что подтверждает корректность сборки конструкции. **Выводы.** Разработан эффективный метод создания генно – инженерной конструкции, обеспечивающей гиперэкспрессию гена *AKT1*. Данный подход обладает значительным

потенциалом для фундаментального изучения клеточной регуляции и идентификации новых молекулярных мишеней в противоопухолевой терапии.

Ключевые слова: гиперэкспрессия, AKT1, плазмиды, противоопухолевая терапия

DEVELOPMENT OF A GENETIC ENGINEERING CONSTRUCT FOR INDUCTION OF *AKT1* GENE HYPEREXPRESSION

Kolesova Elizaveta Sergeevna¹, Melekhin Vsevolod Viktorovich^{1,2}

¹Scientific, Educational and Innovation Center of the Chemical and Pharmaceutical Technologies, Institute of Chemical Technology

Ural Federal University named after the First President of Russia B. N. Yeltsin

²Department of Biology and Biotechnologies

Ural State Medical University

Yekaterinburg, Russia

Abstract

Introduction. One of the promising directions in biomedicine is the development of novel diagnostic methods and therapeutic approaches based on studying molecular mechanisms of diseases. Particular interest is focused on the *AKT1* gene. AKT1 is an isoform of protein kinase B that plays a central role in the PI3K/AKT signaling pathway, regulating cell growth, proliferation, and apoptosis. *AKT1* overexpression is characteristic of many malignant neoplasms, making it a potential target for anticancer therapy. An urgent task is the development of genetic engineering systems for controlled *AKT1* overexpression and the establishment of stable human cell lines to explore new diagnostic and therapeutic strategies. **The aim of the study** was to design a genetic engineering construct based on an expression vector plasmid containing the *AKT1* coding sequence. **Materials and methods.** Total mRNA was isolated from a human colorectal adenocarcinoma cell line (CaCo-2) and used for cDNA synthesis via reverse transcription. *AKT1* – specific primers with 5' – overhangs and EcoRI/BamHI restriction sites were designed using NCBI Primer – BLAST, Ugene, Gene Runner, and bioinformatics.org. The *AKT1* coding sequence was PCR – amplified and cloned into the pTagGFP2 – C plasmid via restriction – ligation. Reaction success was verified by 1% agarose gel electrophoresis. PEI was used as a transfection reagent. **Results.** Positive clones carrying the recombinant pTagGFP2 – C – AKT1 plasmid were obtained. Key cloning steps—restriction, ligation, and transfection—were successfully performed, confirming proper vector assembly. **Conclusions.** An efficient method for creating a genetic engineering construct enabling *AKT1* overexpression was developed. This approach holds significant potential for fundamental research in cellular regulation and the identification of novel molecular targets in cancer therapy.

Keywords: hyperexpression, AKT1, plasmids, cancer therapy

ВВЕДЕНИЕ

Современная биомедицина активно развивает методы генной инженерии, позволяющие целенаправленно модифицировать клеточные линии для изучения молекулярных механизмов заболеваний. Одним из ключевых направлений является создание генно – инженерных конструкций, обеспечивающих гиперэкспрессию целевых генов, таких как протеинкиназа В (АКТ/ПКВ). Это особенно актуально в исследованиях, нацеленных на изучение механизмов опухолеобразования, поскольку АКТ1, одна из наиболее экспрессируемых изоформ этого белка, часто сверхэкспрессируется при различных злокачественных новообразованиях и играет важную роль в их развитии. АКТ1 способствует пролиферации клеток, в основном, через ингибирование пути BCL2 и MDM2, которые в противном случае способствуют апоптозу. Хотя путь PI3K/AKT строго регулируется в нормальных клетках, он дерегулируется в опухолевых клетках, что приводит к повышенной пролиферации, росту и выживанию, а также устойчивости к апоптозу [1]. Миграция и инвазия клеток являются двумя наиболее важными процессами, вовлеченными в метастазирование опухолей, на долю которых приходится > 90% всех смертей, связанных со злокачественными новообразованиями. В большинстве случаев именно активация АКТ1 связана с миграцией, инвазией и метастазированием раковых клеток [2]. Кроме того, активация АКТ способствует устойчивости ко многим химиотерапевтическим агентам [3]. Поэтому разработка генно – инженерной конструкции для последующей индукции гиперэкспрессии гена *AKT1*, а также создание модельных культивируемых клеточных линий человека с его гиперэкспрессией является актуальной задачей для области поиска новых диагностических методов и лечебных подходов.

Цель исследования – разработать генно – инженерную конструкцию на основе экспрессионной векторной плазмиды, содержащей кодирующую последовательность *AKT1*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследования проведены на культивируемых клетках эмбриональной рабдомиосаркомы человека (линия Rd) и на культивируемых клетках колоректальной аденокарциномы человека (линия CaCo – 2) полученных из ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных» (Институт цитологии РАН, г. Санкт – Петербург, Россия).

Клетки культивировали с использованием среды DMEM/F – 12 с содержанием 10% фетальной бычьей сыворотки при 37°C, 5% CO₂ и 98% влажности в культуральном флаконе 75 см² с вентилируемой крышкой. Субкультивирование с применением раствора трипсина 0,25% проводили при достижении культурой ≥ 90% конfluenceности.

На основе изученной литературы в качестве источника мРНК гена *AKT1* была выбрана клеточная линия колоректальной аденокарциномы человека (CaCo – 2) [4, 5]. мРНК была использована в качестве матрицы для синтеза кДНК в реакции обратной транскрипции. Для выделения суммарной РНК и проведения обратной транскрипции клетки высевали в культуральные флаконы 25 см². При достижении культурой 70% конfluenceности клетки гомогенизировали. Суммарную РНК экстрагировали с использованием реагента ExtractRNA («Евроген», Россия) в соответствии с протоколом производителя. Сухой осадок растворяли в 40 мкл воды без нуклеаз обработанной диэтилпирокарбонатом (DEPC) («Евроген», Россия). Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием набора реагентов «Обратная транскриптаза RNAscribe RT» (Биолабмикс, Россия) в соответствии с протоколом производителя. РНК – матрицу брали в количестве 1 мкг.

Был проведен биоинформатический анализ кодирующей последовательности гена *AKT1* и плазмидного вектора pTagGFP2 – С длиной 4700 п. н. (Евроген, Россия) с использованием таких программ и сайтов, как NCBI Primer – BLAST, Ugene, Gene Runner, bioinformatics.org. По полученным данным *AKT1* и GFP будут представлять собой единый химерный белок, соединенный через С – конец GFP. К кодирующей последовательности кДНК *AKT1* были подобраны праймеры, содержащие с 5' – конца нуклеотиды – зацепки и сайты рестрикции EcoRI и BamHI. Длина ампликона *AKT1* составляет 1479 п. н. Олигонуклеотидные праймеры были синтезированы на заказ («ДНК – Синтез», Россия). Была поставлена ПЦР с добавлением 5 % ДМСО в реакционную смесь с использованием набора Мастер – микс БиоМастер LR HS – ПЦР. Амплификацию осуществляли на приборе в термоциклере GeneExplorer GE – 96G (Bioer, Китай).

Для визуализации результатов и оценки успешности прохождения реакций использовали метод гель – электрофореза в 1 % агарозном геле. Гель – электрофорез проводили в течение 60 минут при напряжении 80 В, силе тока 400 мА буфере 1x TAE.

Полученные ампликоны *AKT1* вырезались скальпелем и выделялись при помощи набора для очистки ДНК из агарозного геля и реакционных смесей HiPure Gel Pure DNA Kit (Magen, Китай) согласно инструкции производителя.

ДНК гена – интереса и плазмидного вектора подвергали реакции рестрикции. Реакция проводилась согласно инструкциям производителя FlyCut EcoRI и FlyCut BamHI (TransGen Biotech, Китай). Реакционная смесь инкубировалась в течение 15 минут при 37°C и инактивировалась нагреванием при 80°C в течение 20 минут. После проведения реакции линеаризованную ДНК pTagGFP2 – С, а также ДНК *AKT1* анализировали и отделяли от низкомолекулярных фрагментов ДНК при помощи электрофореза в 1% агарозном геле, после чего выделяли ДНК из агарозного геля.

После реакции рестрикции и выделения из геля ДНК *AKT1* и pTagGFP2 – С подвергали реакции лигирования с использованием набора «5min Universal Ligation Mix» (Nanjing Vazyme Biotech Co, Китай) в соответствии с протоколом производителя. ДНК pTagGFP2 – С и гена – интереса брали в молярном соотношении 1:3. Реакционную смесь инкубировали 5 мин при 25 °С. После инкубации смесь помещали на лед.

Полученную реакционную смесь после реакции лигирования использовали для трансфекции клеточной линии эмбриональной рабдомиосаркомы человека (Rd). В качестве трансфекционного реагента использовали PEI, набор «Реагент для трансфекции нуклеиновых кислот в эукариотические клетки при помощи PEI – 01» (Диаэм, Россия). Для этого высадили клетки линии Rd на 96 – луночный планшет с необходимой плотностью. Инкубировали при 37°C в 5% CO₂ – инкубаторе в течение 24 часов. Конфлюентность клеток на момент трансфекции составляла 70%. В эппендорфе смешали в равном объеме PEI и буфер для трансфекции. Проинкубировали смесь при комнатной температуре в течение 5 мин. В другом эппендорфе смешали 8,5 мкл рTagGFP2 – С – АКТ1 (9,2 нг/мкл) и 0,78 мкл буфера для трансфекции. Обе смеси тщательно перемешали вортексом. После две смеси смешали и проинкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин. Перед внесением смеси к клеткам произвели смену питательной среды с добавлением 2 % сыворотки. Внесли реакционную смесь. Сменили среду через 12 часов на свежую. В качестве положительного контроля использовали ДНК рTagGFP2 – С.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Была клонирована методом ПЦР кодирующая последовательность гена *AKT1*, проведены реакции рестрикции и лигирования. Полученные электрофореграммы представлены на Рис. 1.

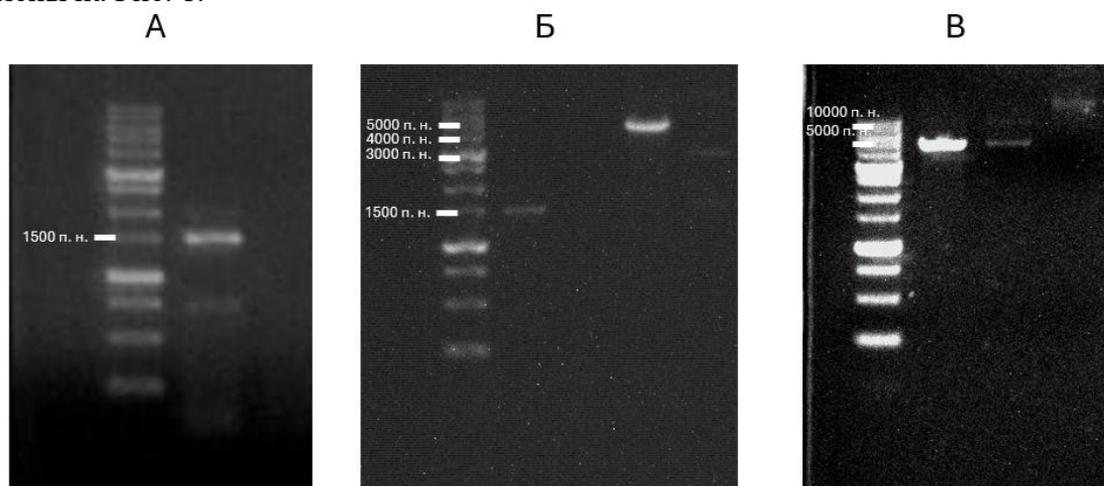


Рис. 1. Электрофорез после ПЦР и реакций рестрикции и лигирования *AKT1* и рTagGFP2 – С. А – *AKT1*, длина ампликона 1476 пар оснований; Б – *AKT1* (дорожка № 2), рTagGFP2 – С (дорожка № 4) после рестрикции, рTagGFP2 – С (дорожка № 5) нативная плаزمида; В – рTagGFP2 – С (дорожка № 2) после рестрикции, рTagGFP2 – С – АКТ1 (дорожка № 4) после лигирования

Уровень флуоресценции трансфецированных клеток Rd плазмидным вектором рTagGFP2 – С – АКТ1 сопоставим с уровнем положительного контроля (рTagGFP2 – С) (Рис. 2)



Рис. 2. Результаты микрофотографирования трансфецированной клеточной линии Rd. А – плазмидным вектором рTagGFP2 – С – АКТ1; Б – плазмидным вектором рTagGFP2 – С. Увеличение X200, синий свет.

ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно электрофореграмме, представленной на рисунке 1, можно сделать вывод, что рестрикция плазмиды прошла успешно, так как она находится выше нелинейной нативной плазмиды. Отсутствие фрагмента ДНК, отделяемого от плазмиды, можно объяснить малым размером – 31 п. н. В результате сверхспирализации нативная плазида имеет большую электрофоретическую подвижность нежели линейная ДНК, поэтому полоса, соответствующая рTagGFP2 – С, находится на уровне 3000–4000 п. н. Об успешности прохождения реакции лигирования говорит тот факт, что ДНК, находящаяся в лигазной смеси, имеет больший размер, чем плазида, подвергшаяся рестрикции. Однако ДНК, полученная после реакции лигирования, имеет низкую проходящую способность и выше максимального размера ДНК на маркерной лестнице – 10 000 п. н. Нарушения в проходимости рTagGFP2 – С – АКТ1 могут быть связаны с измененной конформацией ДНК.

В результате трансфекции были получены положительные клоны (рис. 2). Различия в интенсивности флуоресценции после трансфекций плазмидными векторами рTagGFP2 – С – АКТ1 и рTagGFP2 – С связаны с измененной конформацией белка GFP, так как в случае рTagGFP2 – С – АКТ1 GFP и АКТ1 представляют собой единый химерный белок, соединенный через С – конец GFP.

ВЫВОДЫ

В данной статье представлен способ получения генно – инженерной конструкции для индукции гиперэкспрессии гена *AKT1*. Успешно проведены ключевые этапы клонирования, включая рестрикцию, лигирование и трансфекцию, что подтверждает корректность сборки конструкции. Полученные результаты демонстрируют не только эффективность подхода для фундаментальных исследований клеточных процессов, но и его перспективность для поиска новых мишеней противоопухолевой терапии.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. The unconventional role of Akt1 in the advanced cancers and in diabetes – promoted carcinogenesis / A. Alwhaibi, A. Verma, M.S. Adil, P.R. Somanath // Pharmacological Research. – 2019. – Vol. 145. – P. 104270.
2. Distinct roles of Akt1 in regulating proliferation, migration and invasion in HepG2 and HCT 116 cells / C. Liang, Q.H. Kang, Y. Chen [et al.] // Oncology reports. – 2014. – Vol. 31. – P. 737 – 744.
3. Cuesta, C. The Importance of Being PI3K in the RAS Signaling Network / C. Cuesta, C. Arévalo – Alameda, E. Castellano // Genes. – 2021. – Vol. 12, № 1094. – P. 67 – 72.
4. Regulation of AKT1 expression by beta – catenin/Tcf/Lef signaling in colorectal cancer cell / S. Dihlmann, M. Kloor, C. Fallsehr, M. von Knebel Doeberitz // Carcinogenesis. – 2005. – Vol. 26. – P. 1503 – 1512.
5. AKT1 amplification regulates cisplatin resistance in human lung cancer cells through the mammalian target of rapamycin/p70S6K1 pathway / L.Z. Liu, X.D. Zhou, G. Qian [et al.] // Cancer Research. – 2007. – Vol. 67. – P. 6325 – 6332.

Сведения об авторах

Е.С. Колесова* – инженер лаборатории ПБКиГТ НОиИЦ ХФТ ХТИ УрФУ, студент магистратуры ХТИ УрФУ
В.В. Мелехин – кандидат медицинских наук., доцент, заведующий лаборатории ПБКиГТ НОиИЦ ХФТ ХТИ УрФУ, доцент

Information about the authors

E.S. Kolesova – Engineer of the Laboratory of Primary Bioscreening, Cellular and Gene Technologies, M. S. student of the Institute of Chemical Technology, UrFU

V.V. Melekhin – Candidate of Science (Medicine), Associate Professor, Head of the Laboratory of Primary Bioscreening, Cellular and Gene Technologies, Associate Professor

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

elizaveta.kolesova@urfu.ru

УДК: 616.9

МЕХАНИЗМЫ И ПОСЛЕДСТВИЯ ПРОНИКНОВЕНИЯ SARS – COV – 2 ЧЕРЕЗ ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКИЙ БАРЬЕР

Коляда Эльдар Артемович

Кафедра биологии и биотехнологий

ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России

Екатеринбург, Россия

Аннотация