

DOI: <https://doi.org/10.17816/onco629570>

Оценка функциональной активности и специфичности промотора гена *hSLPI*

Е.В. Дудкина, А.С. Коснырев, В.В. Ульянова, А.И. Надырова, П.С. Морозова, Е.А. Куприянова, О.Н. Ильинская

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

АННОТАЦИЯ

Обоснование. Одной из основных проблем современной онкотерапии является отсутствие избирательности действия используемых противоопухолевых препаратов, приводящее к их системной токсичности на организм. Направленная экспрессия терапевтических генов представляет собой новый подход в генотерапии рака. Одним из способов достижения избирательности действия терапевтических генов по отношению к опухолевым клеткам является использование промоторов, которые активны только в опухолевых, но не в нормальных клетках.

Цель. Оценить функциональную активность и специфичность промотора ингибитора секреторной лейкоцитарной протеазы человека *hSLPI*.

Материалы и методы. Промотор гена *hSLPI* клонировали в беспромоторный вектор *pTurboGFP-PRL*. Функциональную активность и специфичность промотора оценивали по экспрессии мРНК репортёрного гена *TurboGFP* и интенсивности его свечения в опухолевых клетках A549, MCF-7, HeLa и нормальных — WI-38 методами полимеразной цепной реакции в реальном времени с обратной транскрипцией и флуоресцентного анализа, соответственно.

Результаты. Несмотря на данные литературы, промотор гена *hSLPIa* продемонстрировал высокую транскрипционную активность только в отношении опухолевых клеток рака шейки матки HeLa. При этом в клетках аденокарциномы легкого A549 и рака груди MCF-7, как и в нормальных клетках WI-38, наблюдался пониженный уровень активности промотора.

Заключение. Полученные данные подтверждают необходимость проведения предварительной оценки функциональной активности опухоль-специфичных промоторов в отношении опухолевых и нормальных клеток.

Ключевые слова: опухоль-специфичный промотор; *hSLPI*; *turboGFP*.

Как цитировать:

Дудкина Е.В., Коснырев А.С., Ульянова В.В., Надырова А.И., Морозова П.С., Куприянова Е.А., Ильинская О.Н. Оценка функциональной активности и специфичности промотора гена *hSLPI* // Российский онкологический журнал. 2024. Т. 29, № 1. С. 13–22. DOI: <https://doi.org/10.17816/onco629570>

DOI: <https://doi.org/10.17816/onco629570>

Evaluation of the functional activity and specificity of the *hSLPI* gene promoter

Elena V. Dudkina, Alexander S. Kosnyrev, Vera V. Ulyanova, Alsu I. Nadyrova, Polina S. Morozova, Elena A. Kupriyanova, Olga N. Ilinskaya

Kazan Federal University, Kazan, Russia

ABSTRACT

BACKGROUND: One of the main problems of modern oncotherapy is the lack of selectivity of the antitumor drugs, leading to their systemic toxicity on the body. Targeted expression of therapeutic genes represents a new approach in cancer gene therapy. One of the ways to achieve the selectivity of action of the therapeutic genes towards tumor cells is the use of promoters that are active only in tumor cells, but not in normal cells.

AIM: To evaluate the functional activity and specificity of the promoter of the human secretory leukocyte protease inhibitor *hSLPI*.

MATERIALS AND METHODS: The promoter of the *hSLPI* gene was cloned into the promoterless vector *pTurboGFP-PRL*. The functional activity and specificity of the promoter were assessed by the expression of the mRNA of the *TurboGFP* reporter gene and the intensity of its luminescence in A549, MCF-7, HeLa tumor cells and WI-38 normal cells using real-time polymerase chain reaction with reverse transcription and fluorescence analysis, respectively.

RESULTS: Despite the literature data, the promoter of the *hSLPI* gene demonstrated high transcriptional activity only against HeLa cervical cancer tumor cells. At the same time, in the cells of lung adenocarcinoma A549 and breast cancer MCF-7, as in normal WI-38 cells, a reduced level of promoter activity was observed.

CONCLUSION: The data obtained confirm the need for a preliminary assessment of the functional activity of tumor-specific promoters in relation to tumor and normal cells.

Keywords: tumor-specific promoter; secretory leukocyte peptidase inhibitor; green fluorescent protein.

To cite this article:

Dudkina EV, Kosnyrev AS, Ulyanova VV, Nadyrova AI, Morozova PS, Kupriyanova EA, Ilinskaya ON. Evaluation of the functional activity and specificity of the *hSLPI* gene promoter. *Russian Journal of Oncology*. 2024;29(1):13–22. DOI: <https://doi.org/10.17816/onco629570>

ОБОСНОВАНИЕ

Рак является одной из основных причин смертности во всём мире, как среди мужчин, так и среди женщин. Несмотря на успехи в области химиотерапии, хирургии и лучевой терапии, по-прежнему существуют ограниченные возможности лечения рака на поздних стадиях, которые включают лишь паллиативные методы [1]. Согласно стандартным протоколам противоопухолевой терапии, для лечения местных неметастатических опухолей применяют хирургию и лучевую терапию, в то время как системная химиотерапия, гормональная и биологическая терапия предпочтительно используются для лечения прогрессирующих метастатических опухолей. Улучшение понимания молекулярной биологии опухолевых клеток, исключительные особенности опухолевого роста, а также токсичность, оказываемая химиотерапевтическими препаратами и вызывающая нежелательное массивное разрушение нормальных клеток организма, обусловили необходимость поиска альтернативных целенаправленных и эффективных методов лечения рака, среди которых наиболее перспективным считается генная терапия [2].

Подходы генной терапии основаны на внесении в клетки-мишени терапевтического гена с целью замены мутантных генов, ассоциированных с развитием канцерогенеза, или генов, вызывающих гибель опухолевых клеток [3–5]. Первые генотерапевтические конструкции, в которых терапевтический ген находился под контролем конститутивных промоторов цитомегаловируса (*CMV*) или вируса обезьян (*SV-40*), не обладали избирательностью действия и экспрессировали противоопухолевый агент во всех клетках организма, оказывая токсический эффект и на нормальные клетки. Достичь строгого уровня селективности генотерапевтических препаратов позволило открытие опухоль-специфичных промоторов, гиперактивных в определённых типах раковых клеток и практически не активных в нормальных клетках [6]. Среди них выделяют регуляторные области генов, кодирующих белки, гиперэкспрессированные в различных типах опухолевых клеток и ассоциированные с их злокачественной трансформацией: теломеразу (*hTERT*), блокаторы апоптоза (*BIRC5*), рецептор эпидермального фактора роста (*EGFR*), белки гомологичной рекомбинации (*Rad51*), тирозинный транскрипционный фактор 1 (*TTF-1*), ингибитор секреторной лейкоцитарной протеазы человека (*hSLPI*), карциноэмбриональный антиген (*CEA*) и другие [2, 7–9]. Кроме того, известны промоторы, гиперактивные на определённых стадиях канцерогенеза, таких как ангиогенез и метастазирование [10].

Несмотря на полученные данные, характеризующие специфичность и активность опухоль-специфичных регуляторных областей, гетерогенность раковых клеток не позволяет чётко спрогнозировать транскрипционную активность определённой промоторной области,

и как следствие, эффективность терапии. Поэтому критически важным фактором в разработке селективных генотерапевтических подходов является подбор оптимального опухоль-специфичного промотора для конкретного типа опухолевой ткани.

Цель — оценка функциональной активности и специфичности промотора ингибитора секреторной лейкоцитарной протеазы человека *hSLPI* для последующей разработки на его основе генетической конструкции, селективно экспрессирующей цитотоксические терапевтические гены в опухолевых клетках.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Бактериальные плазмиды, штаммы и условия культивирования

Промоторную область гена ингибитора секреторной лейкоцитарной протеазы человека (*hSLPI*) клонировали в вектор *pTurboGFP-PRL* (Евроген, Россия) с использованием штамма *Escherichia coli* NEB5 α (New England Biolabs, США). Бактерии выращивали на стандартной среде LB (пептон — 1,5%, NaCl — 0,5%, дрожжевой экстракт — 0,5%) при 37 °C в шейкер-инкубаторе Multitron Standart (INFORS HT, Швейцария) при 160 об./мин. При выращивании штаммов, несущих плазмиды, в среду добавляли канамицин (30 мкг/мл).

Для оценки эффективности трансфекции использовали плазмиду *pTurboGFP-C* (Евроген, Россия), в которой репортёрный ген зелёного флуоресцентного белка *TurboGFP* находится под контролем конститутивного промотора цитомегаловируса *CMV*.

Клеточные линии

Для трансфекции использовали линии опухолевых клеток аденокарциномы лёгких человека A549, эпителиоидной карциномы шейки матки HeLa, аденокарциномы молочной железы MCF-7, полученные из коллекции ATCC (США), и культуру клеток нормальных фибробластов лёгких эмбриона человека WI-38, полученную из «Коллекции клеточных культур позвоночных» Института цитологии Российской академии наук. Клетки растили при 37 °C в атмосфере с 5% CO₂ на стандартной среде DMEM (ПанЭко, Россия) с добавлением 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (FBS), 2 мМ глутамина, пенициллина/стрептомицина и канамицина (по 100 ед.).

Полимеразная цепная реакция

Полноразмерный промотор гена *hSLPI* и его фрагменты амплифицировали с геномной ДНК фибробластов лёгкого L-68 (Сибэнзим, Россия) с использованием высокоточных Phusion (Thermo Fisher Scientific, США) и Encyclo (Евроген, Россия) ДНК-полимераз и праймеров *F-hSLPI-Xho*, *F-hSLPIa-Xho*, *F-hSLPIb-Xho* и *R-hSLPI-Bam*,

последовательность которых представлена в табл. 1. Температуру отжига праймеров рассчитывали с использованием сервиса Tm Calculator (Thermo Fisher Scientific, США).

Для оптимизации условий полимеразной цепной реакции (ПЦР) подбирали ДНК-полимеразу, варьировали состав реакционной смеси (количество матрицы, праймеров и ионов Mg_2^{+}), а также режим амплификации (длительность каждого этапа реакции, температуру отжига праймеров). Оптимизированный режим амплификации полноразмерного промотора *hSLPI* и его фрагментов представлен в табл. 2.

Электрофорез

Горизонтальный электрофорез ДНК проводили в 1–1,5% агарозном геле в TAE буфере (48,4 г/л трис-аминометана, 11,4 мл/л ледяной уксусной кислоты, 100 мл/л 0,5 М ЭДТА, pH 8,5), при напряжении 100 В, в течение 30–45 мин. Для контроля подвижности ДНК в геле, а также для детекции ДНК в ультрафиолетовом свете использовали раствор 6×DNA-Dye NonTox (AppliChem GmbH, Германия). Гель просматривали в ультрафиолетовом свете при длине волны 365 нм. Для приблизительной оценки длин фрагментов ДНК использовали ДНК-маркеры 1 Kb (Сибэнзим, Россия) и 50 bp+ (Евроген, Россия).

Клонирование промотора

Полученный продукт амплификации промотора гена *hSLPIa* и вектор *pTurboGFP-PRL* гидролизировали по сайтам рестрикции XhoI и BamHI в течение 3 ч при 37 °С. ПЦР-продукт до и после проведения рестрикции очищали от примесей с помощью GeneJet PCR Purification kit (Thermo Fisher Scientific, США). Рестрицированные фрагменты вектора разделяли в агарозном геле, а участки, соответствующие необходимым фрагментам, вырезали из геля и экстрагировали с использованием набора LumiPure DNA Gel Extraction Kit (Lumiprobe, Россия). Очищенные продукты рестрикции лигировали при температуре 4 °С в течение 14–16 ч с использованием T4 ДНК лигазы (Евроген, Россия).

Полученной конструкцией трансформировали химически-компетентные клетки *E. coli* NEB 5α методом теплового шока [11]. Для трансформации к 100 мкл компетентных клеток добавляли 10 мкл лигазной смеси. Далее подвергали клетки температурному шоку: инкубировали на льду в течение 40 мин, затем нагревали до 42 °С на водяной бане в течение 90 с, после чего снова помещали на лед на 2 мин. В каждый образец добавляли 600 мкл среды LB и инкубировали при 37 °С в течение 60 мин с аэрацией. После инкубации клетки высевали на чашки с L-агаром с добавлением канамицина (30 мкг/мл) и отбирали канамицин-устойчивые клоны. Правильность сборки конструкции подтверждали ПЦР и рестрикционным анализом и секвенированием по Сэнгеру.

Трансфекция клеток

Для проведения трансфекции культуры клеток A549 (10^5 кл./лунку), HeLa ($1,5 \times 10^5$ кл./лунку) MCF-7 (2×10^5 кл./лунку), и WI-38 (2×10^5 кл./лунку), высевали в 24-луночные культуральные планшеты и растили до достижения клетками 70–85% конфлюентности. На следующий день клетки трансфицировали созданной репортёрной конструкцией *pTurboGFP-hSLPIa* и плазмидой *pTurboGFP-C*, применяемой для оценки эффективности трансфекции, при помощи реагента Lipofectamine-3000 (Invitrogen, США), согласно протоколу производителя. Соотношение реагента к ДНК в реакции составило 3:1, количество ДНК в лунке — 500 нг. В отдельных пробирках смешивали 1,5 мкл Липофектамина 3000 и 25 мкл среды Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific, США), и 500 нг ДНК и 25 мкл среды Opti-MEM, содержащей 1 мкл реагента P3000 (Thermo Fisher Scientific, США). Содержимое пробирок объединяли и инкубировали 15 мин при комнатной температуре. Полученную смесь добавляли к клеткам и инкубировали в атмосфере 5% CO_2 при 37 °С в течение 48 ч.

Таблица 1. Праймеры, используемые в работе

Table 1. Primers used in the study

Праймер	Последовательность 5'→3'
F-hSLPI-Xho	ACTATACTCGAGCTCACTGCAGCCTCAAAC
F-hSLPIa-Xho	ACTATACTCGAGAGATCTCAAATTATCTCACAGCT
F-hSLPIb-Xho	ACTATACTCGAGCTGAGACAAGTGAAGCTCCAG
R-hSLPI-Bam	AGATAAGGATCCGGTGAAGGCAGGAGTGAC
GFP_F	GAGATCGAGTGCCGCATCAC
GFP_R	GCCTTGGTGCTCTTCATCTTG
GAPDH_F	CCAGGTGGTCTCCTCTGACTTC
GAPDH_R	CAAAGTGGTCGTTGAGGGCAATG

Таблица 2. Режимы амплификации полноразмерного промотора гена *hSLPI* и его фрагментов

Table 2. Modes of amplification of the full-size *hSLPI* gene promoter and its fragments

Этапы реакции	<i>hSLPI</i>	<i>hSLPIa/hSLPIb</i>
Предварительная денатурация	95 °С, 3 мин	95 °С, 3 мин
Денатурация	95 °С, 10 с	95 °С, 1 мин
Отжиг	56 °С, 30 с	64 °С, 45 с
Элонгация	72 °С, 51 с	72 °С, 1 мин
Количество циклов	30	35
Финальная элонгация ДНК-полимераза	72 °С, 5 мин Phusion	72 °С, 10 мин Encyclo

Оценка эффективности трансфекции

Эффективность трансфекции оценивали по интенсивности флуоресценции репортёрного белка TurboGFP в голубом спектре (480 нм) на флуоресцентном микроскопе Axio Imager 2.0 (Carl Zeiss, Германия). Максимум возбуждения флуоресценции для TurboGFP составляет 482 нм, максимум эмиссии — 502 нм.

Выделение суммарной рибонуклеиновой кислоты

Суммарную РНК трансфицированных клеток A549, MCF-7, HeLa и WI-38 выделяли реагентом RNeasy (Диа-М, Россия) согласно протоколу производителя. Концентрацию выделенных образцов РНК измеряли на флуориметре Qubit 2.0 (Invitrogen, США). Полученную суммарную РНК обрабатывали ДНКазой I, прогревали 10 минут при 75 °C.

Полимеразная цепная реакция в реальном времени с обратной транскрипцией

Уровень экспрессии промотора *hSLPa* оценивали по количеству транскриптов гена зелёного флуоресцентного белка *TurboGFP*. Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием набора RNAscribe RT (Biolabmix, Россия). Реакционную смесь, состоящую из 10 нг суммарной РНК и 2,5 мкМ смеси случайных нонануклеотидов и олиго(dT)18 (Biolabmix, Россия), прогревали в течение 3 минут при 70 °C. В охлаждённую смесь добавляли 5×RT-буфер и 100 ед. RNAscribe RT ревертазы, инкубировали 5 минут при 25 °C, а затем 30 минут при 50 °C. Реакцию останавливали прогреванием при 85 °C в течение 5 минут. Полученную кДНК использовали для ПЦР в реальном времени, добавляя 2,5 мкл в реакционную смесь, состоящую из 2×ПЦР-смеси БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue (Biolabmix, Россия), 0,4 мкМ прямого и обратного олигонуклеотидов. Последовательности олигонуклеотидов, используемых для амплификации генов *GAPDH* и *TurboGFP*, представлены в табл. 1. Программа ПЦР включала первичную денатурацию в течение 5 минут при 95 °C и 39 циклов, состоящих из денатурации (15 секунд, 95 °C), отжига (15 секунд, 60 °C) и элонгации (20 секунд, 72 °C). Амплификацию проводили с использованием CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США). Режим реакции представлен в табл. 2.

Полученные данные ПЦР анализировали с помощью стандартной программы Bio-Rad iQ5 v.2.0 (Bio-Rad Laboratories, США). Для каждого образца определяли пороговый цикл (Ct). Уровень представленности транскриптов и относительной экспрессии мРНК в опухолевых клетках нормализовали на уровень экспрессии гена домашнего хозяйства *GAPDH*. Уровень экспрессии промотора *hSLPa* оценивали относительно уровня экспрессии конститутивного промотора *CMV* в контроле. Для этого вычисляли уровень экспрессии *TurboGFP* в контрольном ($\Delta\text{CtCMV}=\text{CtCMV}-\text{CtGAPDH}$) и опытных ($\Delta\text{CtSLPa}=\text{CtSLPa}-\text{CtGAPDH}$) образцах. Изменение экспрессии *TurboGFP*

в опытных образцах относительно контрольного вычисляли по формуле $\Delta\Delta\text{Ct}=\Delta\text{CtSLPa}-\Delta\text{CtCMV}$. Относительный уровень экспрессии *GFP* рассчитывали, как $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, что определяет кратное увеличение или уменьшение экспрессии исследуемого гена в опытных образцах относительно контрольного.

Статистическая обработка

Статистическую обработку и визуализацию полученных данных выполняли в программе GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, США). Для множественного сравнения нескольких независимых выборок использовали дисперсионный анализ (ANOVA) с апостериорным тестом Тьюки. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез в данном исследовании принимался $p=0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Создание генетической конструкции для экспрессии репортёрного гена под управлением промотора *hSLPa*

Для промотора гена ингибитора секреторной протеазы лейкоцитов человека *hSLPI* показано, что высокой транскрипционной активностью помимо полноразмерного участка размером 1250 пар оснований обладают и его редуцированные фрагменты протяжённостью 877 пар оснований (область с -849 до +22) и 684 пар оснований (область с -650 до +22), обозначенные как *hSLPIa* и *hSLPIb* соответственно [12]. Для получения промоторных областей гена *hSLPI* в данной работе использовали соответствующие праймеры, позволяющие амплифицировать участки различной протяжённости, отличающиеся 5'-областями (рис. 1, а). Поскольку промоторные области, ввиду высокого ГЦ-состава, относятся к сложноамплифицируемым матрицам [13], на первом этапе работы проводили оптимизацию условий полимеразной цепной реакции: увеличивали продолжительность первичной денатурации, варьировали концентрацию праймеров и ионов магния, изменяли температуру отжига, а также подбирали ДНК-полимеразу. В качестве матрицы использовали геномную ДНК фибробластов лёгких человека L-68. В результате высокоспецифичные фрагменты *hSLPIa* и *hSLPIb*, размером около 900 пар оснований и 700 пар оснований соответственно, удалось получить с использованием полимеразы Encyclo при увеличении первичной денатурации ДНК-матрицы до 3 минут, а концентрации магния до 2 мМ, температура отжига праймеров составила 64 °C (см. рис. 1, б). ПЦР-продукт полноразмерного участка промотора *hSLPI* содержал примесные фрагменты (см. рис. 1, б), поэтому для следующего этапа работы среди полученных участков промотора *hSLPI* был выбран более протяжённый — *hSLPa*, размером 877 пар оснований.

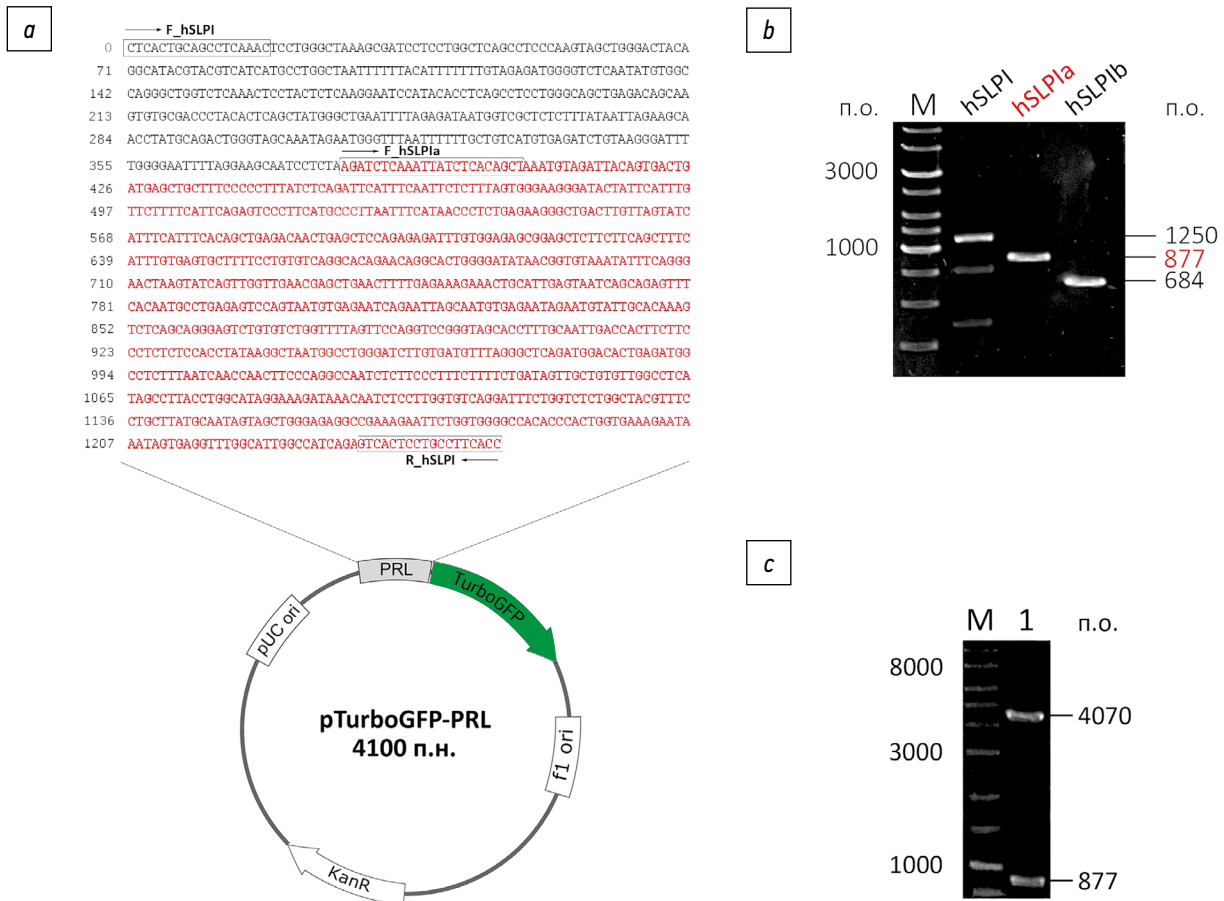


Рис. 1. Клонирование фрагментов промотора гена *hSLPI* в вектор *pTurboGFP-PRL*: *a* — последовательность фрагментов промотора гена *hSLPI* и схема плазмиды *pTurboGFP-PRL*; *b* — продукты амплификации фрагментов промотора гена *hSLPI*; *c* — рестрикционный анализ вектора *pTurboGFP-PRL* и вставки *hSLPa*, размером 4070 пар оснований и 877 пар оснований соответственно.

Fig. 1. Cloning of fragments of the *hSLPI* gene promoter into the *pTurboGFP-PRL* vector: *a* — nucleotide sequence of the *hSLPI* promoter fragments and the scheme of the *pTurboGFP-PRL* plasmid; *b* — products of amplification of the *hSLPI* gene promoter fragments; *c* — restriction analysis of the *pTurboGFP-PRL* vector (4070 base pairs) and the *hSLPa* insertion (877 base pairs).

Для оценки функциональной активности и специфичности промотора *hSLPa* его клонировали по сайтам BamHI и XhoI в беспромоторный вектор *pTurboGFP-PRL*, содержащий репортёрный ген зелёного флуоресцентного белка *TurboGFP*. Наличие вставки в составе полученной плазмиды подтверждали рестрикционным анализом (см. рис. 1, с), правильность нуклеотидной последовательности клонируемого участка — секвенированием по Сэнгеру.

Таким образом, была создана генетическая репортёрная конструкция *pTurboGFP-hSLPa*, содержащая ген зелёного флуоресцентного белка *TurboGFP* под контролем промотора *hSLPIa*.

Оценка функциональной активности и специфичности промотора *hSLPla*

Специфичность транскрипционной активности промотора *hSLPIa* оценивали на опухолевых клетках аденокарциномы лёгких человека A549, рака шейки матки HeLa, рака груди MCF-7 и нормальной линии фибробластов лёгкого эмбриона человека WI-38 с помощью флуоресцентной микроскопии по интенсивности свечения зелёного флуоресцентного белка

TurboGFP. Клетки-реципиенты трансфицировали созданной репортёрной конструкцией *pTurboGFP-hSLPa*, в качестве положительного контроля использовали вектор *pTurboGFP-C*, в котором репортёрный ген *TurboGFP* находится под управлением конститутивного промотора цитомегаловируса *CMV*, активного во всех клетках млекопитающих. Для трансфекции использовали метод липофекции, оптимальные условия подбирали с использованием репортёрной конструкции *pTurboGFP-C*. При проведении трансфекции использовали соотношение липофектамина к ДНК — 3:1, количество ДНК в лунке — 200 нг/лунку.

Флуоресценция зелёного белка TurboGFP, экспрессируемого под управлением промотора *CMV*, была детектирована во всех клеточных линиях, трансфицированных плазмидой *pTurboGFP-C* (рис. 2). При этом при трансфекции клеток созданной репортёрной конструкцией *pTurboGFP-hSLPa* флуоресценция белка TurboGFP, обусловленная активностью работы промотора *hSLPa*, активно детектировалась только в клетках рака шейки матки HeLa (см. рис. 2). В нормальных клетках WI-38 сигнал флуоресценции выявлялся лишь в единичных клетках (см. рис. 2).

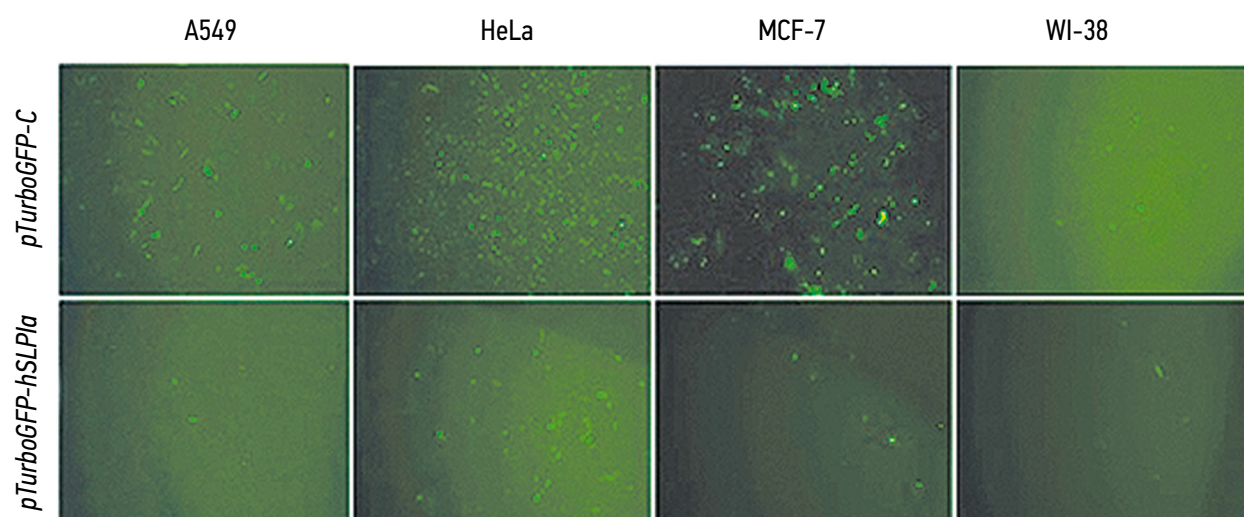


Рис. 2. Флуоресцентный анализ специфичности работы промотора *hSLPa* в клетках, трансфицированных генетической конструкцией *pTurboGFP-hSLPa*, спустя 48 ч культивирования; увеличение $\times 100$.

Fig. 2. Fluorescent analysis of the specificity of the *hSLPa* promoter in cells transfected by the *pTurboGFP-hSLPa* after 48 hours of cultivation; magnification $\times 100$.

Количественную оценку функциональной активности промотора *hSLPa* в составе созданной конструкции *pTurboGFP-hSLPa* проводили методом ПЦР в реальном времени по уровню экспрессии мРНК репортёрного гена *TurboGFP* в трансфицированных клетках через 48 ч культивирования. Транскрипционную активность промотора *hSLPa* рассчитывали относительно конститутивного промотора *CMV*, активного во всех клетках. Так, повышенный уровень экспрессии мРНК гена *TurboGFP* был выявлен в опухолевых клетках HeLa, что говорит о наибольшей транскрипционной активности промотора *hSLPa* в данном типе опухолевых клеток (рис. 3). При этом в опухолевых клетках рака лёгкого A549 и рака груди MCF-7, также как в нормальных клетках WI-38, экспрессия мРНК детектировалась на низком уровне (см. рис. 3).

Таким образом, было показано, что истинной функциональной активностью и специфичностью промотор *hSLPa* обладает лишь в отношении опухолевых клеток рака шейки матки HeLa. В других исследованных в работе опухолевых линиях A549 и MCF-7 промотор *hSLPa* не проявлял транскрипционной активности. При этом в нормальных клетках WI-38 активность промотора также не детектировалась, что указывает на возможность разработки высокоселективной генотерапевтической конструкции на основе промотора *hSLPa*.

ОБСУЖДЕНИЕ

Опухоль-специфичные промоторы — одни из многообещающих инструментов в генотерапии рака, позволяющих селективно запускать экспрессию терапевтических генов исключительно в опухолевых клетках [2]. В настоящее время изучен широкий спектр промоторных областей генов, гиперэкспрессируемых в раковых клетках [7–9].

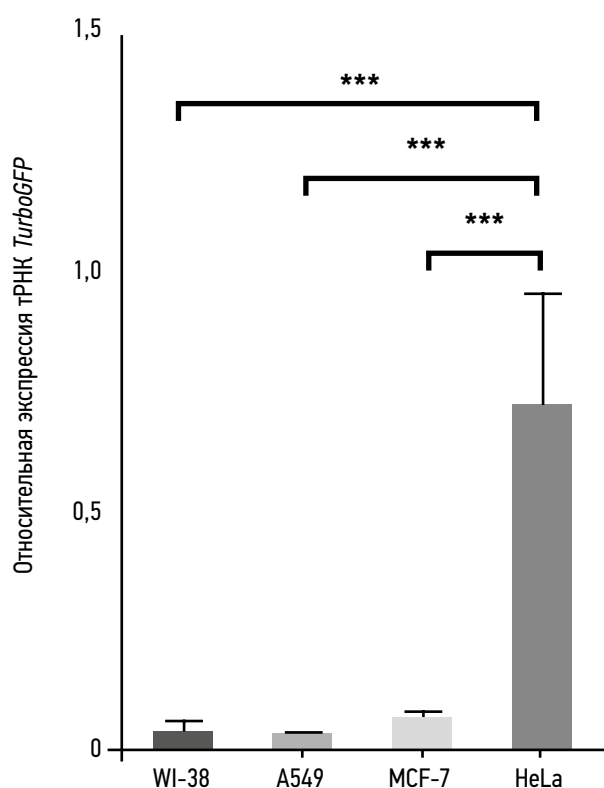


Рис. 3. Анализ экспрессии мРНК гена *TurboGFP* с промотора *hSLPa* в клетках, трансфицированных генетической конструкцией *pTurboGFP-hSLPa*. За единицу принят уровень экспрессии мРНК гена *TurboGFP* с промотора *CMV* в тех же клеточных линиях, трансфицированных плазмидой *pTurboGFP-C*; *** $p=0,0002$.

Fig. 3. Analysis of *TurboGFP* mRNA expression from the *hSLPa* promoter in cells transfected by the *pTurboGFP-hSLPa* genetic construct. The expression level of the *TurboGFP* mRNA from the *CMV* promoter in the same cell lines transfected with the *pTurboGFP-C* plasmid was taken as 1; *** $p=0.0002$.

Одним из перспективных считается промотор ингибитора секреторной протеазы лейкоцитов человека (*hSLPI*). Целью данной работы стала оценка его функциональной активности и специфичности.

Для этого на первом этапе работы было необходимо создать репортёрную генетическую конструкцию, в которой ген зелёного флуоресцентного белка находится под контролем промотора *hSLPI*. Промоторные области представляют собой сложные матрицы, богатые большим количеством ГЦ-повторов, устойчивых к плавлению вторичных структур, и вызывающих остановку ДНК-полимераз, что часто приводит к неполной и неспецифической амплификации [13]. Именно поэтому для получения промотора *hSLPI* были использован набор праймеров, позволяющий амплифицировать его фрагменты различной протяжённости. В результате была получена репортёрная генетическая конструкция *pTurboGFP-hSLPIa*, содержащая фрагмент промотора *hSLPI*, размером 877 пар оснований (см. рис. 1, b).

Известно, что промотор *hSLPI* обладает широким спектром функциональной активности. Гиперэкспрессия гена *hSLPI* обнаружена в клетках рака лёгких [14], шейки матки [15], поджелудочной железы [16] и яичников [17]. При этом в клеточной линии нормальных клеток лёгкого INR-90 детектируется низкий уровень экспрессии мРНК гена *SLPI* [18]. Трансфекция опухолевых клеток созданной нами репортёрной конструкцией *pTurboGFP-hSLPIa* показала, что промотор *hSLPIa* способен эффективно запускать экспрессию гена флуоресцентного зелёного белка только в опухолевых клетках HeLa (см. рис. 2). В линиях опухолевых клеток рака лёгкого A549 и рака груди MCF-7 флуоресценция белка TurboGFP наблюдалась лишь в единичных клетках. Количественный анализ экспрессии мРНК гена *TurboGFP* показал, что активность промотора *hSLPIa* в клетках HeLa многократно превышает его активность как в опухолевых клетках A549 и MCF-7, так и в нормальных клетках WI-38 (см. рис. 3). При этом уровень активности опухоль-специфичного промотора *hSLPIa* в клетках HeLa был сопоставим с активностью неспецифичного сильного промотора *CMV* и составил 72% относительно активности промотора *CMV* в тех же клетках, которую принимали за 100%.

Таким образом, показано, что промотор ингибитора секреторной протеазы лейкоцитов человека *hSLPI* обладает высокой функциональной активностью и специфичностью по отношению к опухолевым клеткам рака шейки матки HeLa, что делает его перспективным инструментом для создания на его основе генотерапевтических конструкций, нацеленных на лечение рака шейки матки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на большое количество исследований, посвящённых изучению активности опухоль-специфичных промоторов, гетерогенность раковых клеток не позволяет чётко спрогнозировать транскрипционную активность той

или иной промоторной области и, как следствие, эффективность терапии. Согласно данным литературы, промотор *hSLPI* активен в широком спектре опухолевых линий. Однако в данной работе транскрипционная активность промотора *hSLPI* была обнаружена только в клетках рака шейки матки HeLa. В связи с этим необходимо проводить подбор оптимального опухоль-специфичного промотора для определённой опухолевой ткани.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Источник финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-74-10036) в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией). Наибольший вклад распределён следующим образом: Е.В. Дудкина — проведение исследований, анализ и визуализация полученных результатов, написание и редактирование текста статьи; А.С. Коснырев — проведение исследований, обработка полученных результатов и их визуализация, написание текста статьи; В.В. Ульянова — анализ полученных результатов, написание и редактирование текста статьи, подготовка текста статьи к публикации; А.И. Надырова — проведение исследований, визуализация полученных результатов, подготовка текста статьи к публикации; П.С. Морозова, Е.А. Куприянова — проведение исследований; О.Н. Ильинская — консультирование по этапам работы, редактирование текста статьи.

ADDITIONAL INFORMATION

Funding source. This work was supported by the Russian Science Foundation (project no. 21-74-10036) within the framework of the Strategic Academic Leadership Program of the Kazan (Volga region) Federal University ("Priority-2030").

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work. Dudkina EV — performed experiments, analyzed and visualized the obtained results, wrote and edited the manuscript; Kosnyrev AS — performed experiments, processed the results obtained and visualized them, wrote and edited the manuscript; Ulyanova VV — analyzed the results obtained, wrote and edited the manuscript, prepared the manuscript for publication; Nadyrova AI — performed experiments, visualized the results obtained, prepared the text of the article for publication; Morozova PS, Kupriyanova EA — performed experiments; Ilinskaya ON — consulted on research, edited the manuscript.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sasaki H., Endo K., Okuda K., et al. Epidermal growth factor receptor gene amplification and gefitinib sensitivity in patients with recurrent lung cancer // *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2008. Vol. 134. P. 569–577. doi: 10.1007/s00432-007-0320-z
2. Montaña-Samaniego M., Bravo-Estupiñan D.M., Méndez-Guerrero O., Alarcón-Hernández E., Ibáñez-Hernández M. Strategies for targeting gene therapy in cancer cells with tumor-specific promoters // *Frontiers in oncology*. 2020. Vol. 10. P. 609380. doi: 605380.10.3389/fonc.2020.605380
3. Aiuti A., Roncarolo M.G., Naldini L. Gene therapy for ADA-SCID, the first marketing approval of an ex vivo gene therapy in Europe: paving the road for the next generation of advanced therapy medicinal products // *EMBO Mol Med*. 2017. Vol. 9, N 6. P. 737–740. doi: 10.15252/emmm.201707573
4. Yan M., Chen J., Jiang H., et al. Effective inhibition of cancer cells by recombinant adenovirus expressing EGFR-targeting artificial microRNA and reversed-caspase-3 // *PLoS One*. 2020. Vol. 15, N 8. P. e0237098. doi: 10.1371/journal.pone.0237098
5. Ginn S.L., Amaya A.K., Alexander I.E., Edelstein M., Abedi M.R. Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update // *J Gene Med*. 2018. Vol. 20, N 5. P. 1–16. doi: 10.1002/jgm.3015
6. Rama Ballesteros A., Hernández R., Perazzoli G., et al. Specific driving of the suicide E gene by the CEA promoter enhances the effects of paclitaxel in lung cancer // *Cancer Gene Ther*. 2020. Vol. 27. P. 657–668. doi: 10.1038/s41417-019-0137-3
7. Chen C., Yue D., Lei L., et al. Promoter-operating targeted expression of gene therapy in cancer: current stage and prospect // *Molecular Therapy-Nucleic Acids*. 2018. Vol. 11. P. 508–514. doi: 10.1016/j.omtn.2018.04.003
8. Wang Y., Xu H.X., Lu M.D., Tang Q. Expression of thymidine kinase mediated by a novel non-viral delivery system under the control of vascular endothelial growth factor receptor 2 promoter selectively kills human umbilical vein endothelial cells // *World Journal of Gastroenterology: WJG*. 2008. Vol. 14, N 2. P. 224. doi: 10.3748/wjg.14.224
9. Naoum G.E., Zhu Z.B., Buchsbaum D.J., Curiel D.T., Arafat W.O. Surviving a radiogenetic promoter for glioblastoma viral gene therapy independently from CARg motifs // *Clinical and Translational Medicine*. 2017. Vol. 6. P. 1–11. doi: 10.1186/s40169-017-0140-y
10. Suhail Y., Cain M.P., Vanaja K., et al. Systems biology of cancer metastasis // *Cell systems*. 2019. Vol. 9, N 2. P. 109–127. doi: 10.1016/j.cels.2019.07.003
11. Sambrook J., Russell D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3d ed. Cold Spring Harbor : Cold Spring Harbor Lab. Press, 2001.
12. Chen J., Yang B., Zhang S., et al. Antitumor potential of SLPI promoter controlled recombinant caspase-3 expression in laryngeal carcinoma // *Cancer Gene Ther*. 2012. Vol. 19, N 5. P. 328–335. doi: 10.1038/cgt.2012.5
13. Sahdev S., Saini S., Tiwari P., Saxena S., Saini K.S. Amplification of GC-rich genes by following a combination strategy of primer design, enhancers and modified PCR cycle conditions // *Molecular and cellular probes*. 2007. Vol. 21, N 4. P. 303–307. doi: 10.1016/j.mcp.2007.03.004
14. Shuhong H., Xiaoyuan D., Yang S., et al. Targeted gene therapy of the HSV-TK/hIL-12 fusion gene controlled by the hSLPI gene promoter of human non-small cell lung cancer in vitro // *Oncology Letters*. 2018. Vol. 15, N 5. P. 6503–6512. doi: 10.3892/ol.2018.8148
15. Robertson M.W., Wang M., Siegal G.P., et al. Use of a tissue-specific promoter for targeted expression of the herpes simplex virus thymidine kinase gene in cervical carcinoma cells // *Cancer Gene Ther*. 1998. Vol. 5. P. 331–336.
16. Zuo J., Zhang C., Ren C., et al. Secretory leukocyte protease inhibitor is a proliferation and survival factor for pancreatic cancer cells // *Clin Transl Oncol*. 2015. Vol. 17, N 4. P. 314–321. doi: 10.1007/s12094-014-1232-4
17. Barker S.D., Coolidge C.J., Kanerva A., et al. The secretory leukoprotease inhibitor (SLPI) promoter for ovarian cancer gene therapy // *The Journal of Gene Medicine*. 2003. Vol. 5, N 4. P. 300–310. doi: 10.1002/jgm.341
18. Maemondo M., Saijo Y., Narumi K., et al. Gene therapy with secretory leukoprotease inhibitor promoter-controlled replication-competent adenovirus for non-small cell lung cancer // *Cancer research*. 2004. Vol. 64, N 13. P. 4611–4620. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-03-2549

REFERENCES

1. Sasaki H, Endo K, Okuda K, et al. Epidermal growth factor receptor gene amplification and gefitinib sensitivity in patients with recurrent lung cancer. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2008;134:569–577. doi: 10.1007/s00432-007-0320-z
2. Montaña-Samaniego M, Bravo-Estupiñan DM, Méndez-Guerrero O, Alarcón-Hernández E, Ibáñez-Hernández M. Strategies for targeting gene therapy in cancer cells with tumor-specific promoters. *Frontiers in oncology*. 2020;10:609380. doi: 605380.10.3389/fonc.2020.605380
3. Aiuti A, Roncarolo MG, Naldini L. Gene therapy for ADA-SCID, the first marketing approval of an ex vivo gene therapy in Europe: paving the road for the next generation of advanced therapy medicinal products. *EMBO Mol Med*. 2017;9(6):737–740. doi: 10.15252/emmm.201707573
4. Yan M, Chen J, Jiang H, et al. Effective inhibition of cancer cells by recombinant adenovirus expressing EGFR-targeting artificial microRNA and reversed-caspase-3. *PLoS One*. 2020;15(8):e0237098. doi: 10.1371/journal.pone.0237098
5. Ginn SL, Amaya AK, Alexander IE, Edelstein M, Abedi MR. Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update. *J Gene Med*. 2018;20(5):1–16. doi: 10.1002/jgm.3015
6. Rama Ballesteros A, Hernández R, Perazzoli G, et al. Specific driving of the suicide E gene by the CEA promoter enhances the effects of paclitaxel in lung cancer. *Cancer Gene Ther*. 2020;27:657–668. doi: 10.1038/s41417-019-0137-3
7. Chen C, Yue D, Lei L, et al. Promoter-operating targeted expression of gene therapy in cancer: current stage and prospect. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*. 2018;11:508–514. doi: 10.1016/j.omtn.2018.04.003
8. Wang Y, Xu HX, Lu MD, Tang Q. Expression of thymidine kinase mediated by a novel non-viral delivery system under the control of

vascular endothelial growth factor receptor 2 promoter selectively kills human umbilical vein endothelial cells. *World Journal of Gastroenterology: WJG*. 2008;14(2):224. doi: 10.3748/wjg.14.224

9. Naoum GE, Zhu ZB, Buchsbaum DJ, Curiel DT, Arafat WO. Surviving a radiogenetic promoter for glioblastoma viral gene therapy independently from CARg motifs. *Clinical and Translational Medicine*. 2017;6:1–11. doi: 10.1186/s40169-017-0140-y

10. Suhail Y, Cain MP, Vanaja K, et al. Systems biology of cancer metastasis. *Cell systems*. 2019;9(2):109–127. doi: 10.1016/j.cels.2019.07.003

11. Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3d ed.* Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Lab. Press; 2001.

12. Chen J, Yang B, Zhang S, et al. Antitumor potential of SLPI promoter controlled recombinant caspase-3 expression in laryngeal carcinoma. *Cancer Gene Ther*. 2012;19(5):328–335. doi: 10.1038/cgt.2012.5

13. Sahdev S, Saini S, Tiwari P, Saxena S, Saini KS. Amplification of GC-rich genes by following a combination strategy of primer design, enhancers and modified PCR cycle conditions. *Molecular and cellular probes*. 2007;21(4):303–307. doi: 10.1016/j.mcp.2007.03.004

14. Shuhong H, Xiaoyuan D, Yang S, et al. Targeted gene therapy of the HSV-TK/hIL-12 fusion gene controlled by the hSLPI gene promoter of human non-small cell lung cancer in vitro. *Oncology Letters*. 2018;15(5):6503–6512. doi: 10.3892/ol.2018.8148

15. Robertson MW, Wang M, Siegal GP, et al. Use of a tissue-specific promoter for targeted expression of the herpes simplex virus thymidine kinase gene in cervical carcinoma cells. *Cancer Gene Ther*. 1998;5:331–336.

16. Zuo J, Zhang C, Ren C, et al. Secretory leukocyte protease inhibitor is a proliferation and survival factor for pancreatic cancer cells. *Clin Transl Oncol*. 2015;17(4):314–321. doi: 10.1007/s12094-014-1232-4

17. Barker SD, Coolidge CJ, Kanerva A, et al. The secretory leukoprotease inhibitor (SLPI) promoter for ovarian cancer gene therapy. *The Journal of Gene Medicine*. 2003;5(4):300–310. doi: 10.1002/jgm.341

18. Maemondo M, Saijo Y, Narumi K, et al. Gene therapy with secretory leukoprotease inhibitor promoter-controlled replication-competent adenovirus for non-small cell lung cancer. *Cancer research*. 2004;64(13):4611–4620. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-03-2549

ОБ АВТОРАХ

* **Дудкина Елена Владимировна**, канд. биол. наук, доцент; адрес: Россия, Казань, 420008, ул. Кремлёвская, д. 18; ORCID: 0000-0002-2817-1384; eLibrary SPIN: 5874-7417; e-mail: ELVDudkina@kpfu.ru

Коснырев Александр Сергеевич; ORCID: 0009-0008-4341-5181; eLibrary SPIN: 8593-7837; e-mail: AleSKosnyrev@kpfu.ru

Ульянова Вера Владимировна, канд. биол. наук, доцент; ORCID: 0000-0003-1768-3314; eLibrary SPIN: 8479-4593; e-mail: Vera.Uljanova@kpfu.ru

Надырова Алсу Ильдаровна; ORCID: 0000-0002-1312-0605; eLibrary SPIN: 9618-7816; e-mail: alsu.nadyrova@yandex.ru

Морозова Полина Сергеевна; ORCID: 0009-0006-7205-5774; e-mail: polinam0r0zz@ya.ru

Куприянова Елена Андреевна; ORCID: 0000-0002-9185-4217; eLibrary SPIN: 9456-5596; e-mail: elena.a.kupriyanova@gmail.com

Ильинская Ольга Николаевна, д-р биол. наук, профессор; ORCID: 0000-0001-6936-2032; eLibrary SPIN: 7972-5807; e-mail: Olga.Ilinskaya@kpfu.ru

AUTHORS' INFO

* **Elena V. Dudkina**, Cand. Sci. (Biology), Associate Professor; address: 18 Kremlyovskaya street, Kazan, 420008, Russia; ORCID: 0000-0002-2817-1384; eLibrary SPIN: 5874-7417; e-mail: ELVDudkina@kpfu.ru

Alexander S. Kosnyrev; ORCID: 0009-0008-4341-5181; eLibrary SPIN: 8593-7837; e-mail: AleSKosnyrev@kpfu.ru

Vera V. Ulyanova, Cand. Sci. (Biology), Associate Professor; ORCID: 0000-0003-1768-3314; eLibrary SPIN: 8479-4593; e-mail: Vera.Uljanova@kpfu.ru

Alsu I. Nadyrova; ORCID: 0000-0002-1312-0605; eLibrary SPIN: 9618-7816; e-mail: alsu.nadyrova@yandex.ru

Polina S. Morozova; ORCID: 0009-0006-7205-5774; e-mail: polinam0r0zz@ya.ru

Elena A. Kupriyanova; ORCID: 0000-0002-9185-4217; eLibrary SPIN: 9456-5596; e-mail: elena.a.kupriyanova@gmail.com

Olga N. Ilinskaya, Dr. Sci. (Biology), Professor; ORCID: 0000-0001-6936-2032; eLibrary SPIN: 7972-5807; e-mail: Olga.Ilinskaya@kpfu.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author