

Влияние РНК-интерференции на экспрессию гена AML1-ETO

Д. В. Посредник
научный руководитель В. В. Гринев
Белорусский государственный университет
кафедра генетики



Цель:

оценка эффективности подавления экспрессии гибридного гена *aml1-eto* с помощью РНК-интерференции в клетках ОМЛ линий Kasumi-1 и SKNO-1.



Задачи:

- Оценить эффективность подавления экспрессии гибридного гена *aml1-eto* в клетках ОМЛ линий Kasumi-1 и SKNO-1 с помощью РНК-интерференции, запускаемой кшРНК.
- Синтезировать и клонировать последовательность, кодирующую искусственные анти-AML1-ETO микроРНК.
- Разработать челночный плазмидный вектор pDsRed1/*ami*AML1-ETO, кодирующий искусственные анти-AML1-ETO микроРНК, и изучить его функциональную активность.
- Оценить эффективность подавления экспрессии гибридного гена *aml1-eto* в клетках ОМЛ линий Kasumi-1 и SKNO-1 с помощью РНК-интерференции, запускаемой искусственными анти-AML1-ETO микроРНК.



Основные понятия:

- РНК-интерференция — это механизм подавления экспрессии гена, то есть проявления данного гена в организме в форме определенного признака на стадии трансляции.
- МикроРНК — класс некодирующих РНК, которые имеют длину около 22 нуклеотидов. Эти РНК играют важную роль в регуляции трансляции и деградации мРНК.
- кшРНК – то же, что и микроРНК, но внеклеточного происхождения, то есть, не кодируются геномом клетки и не проходят процессинг в ядре.



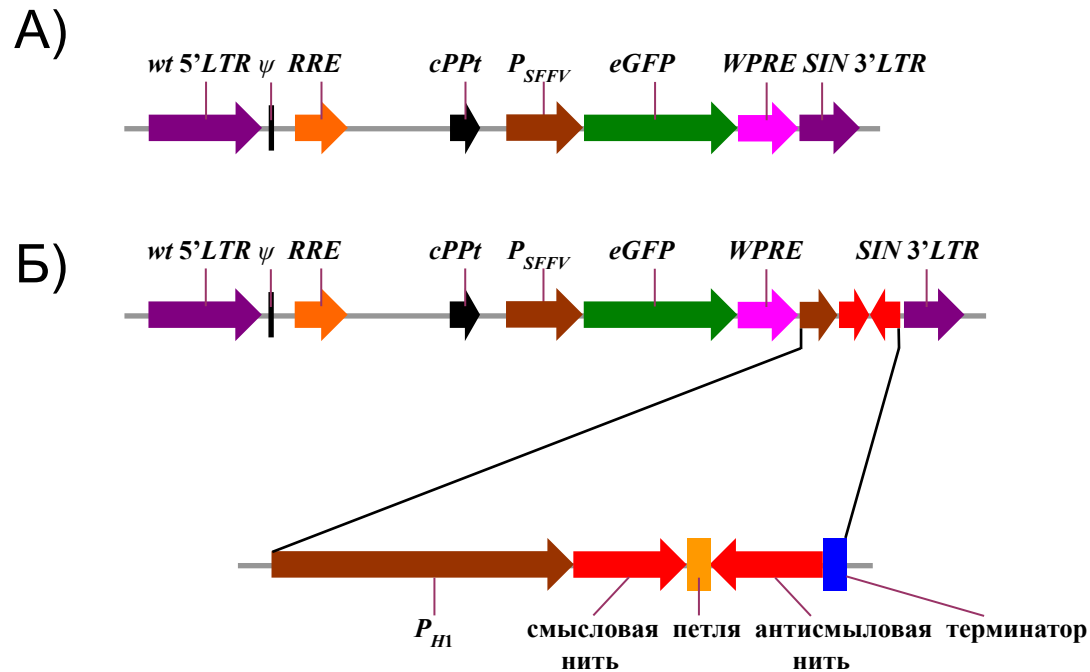
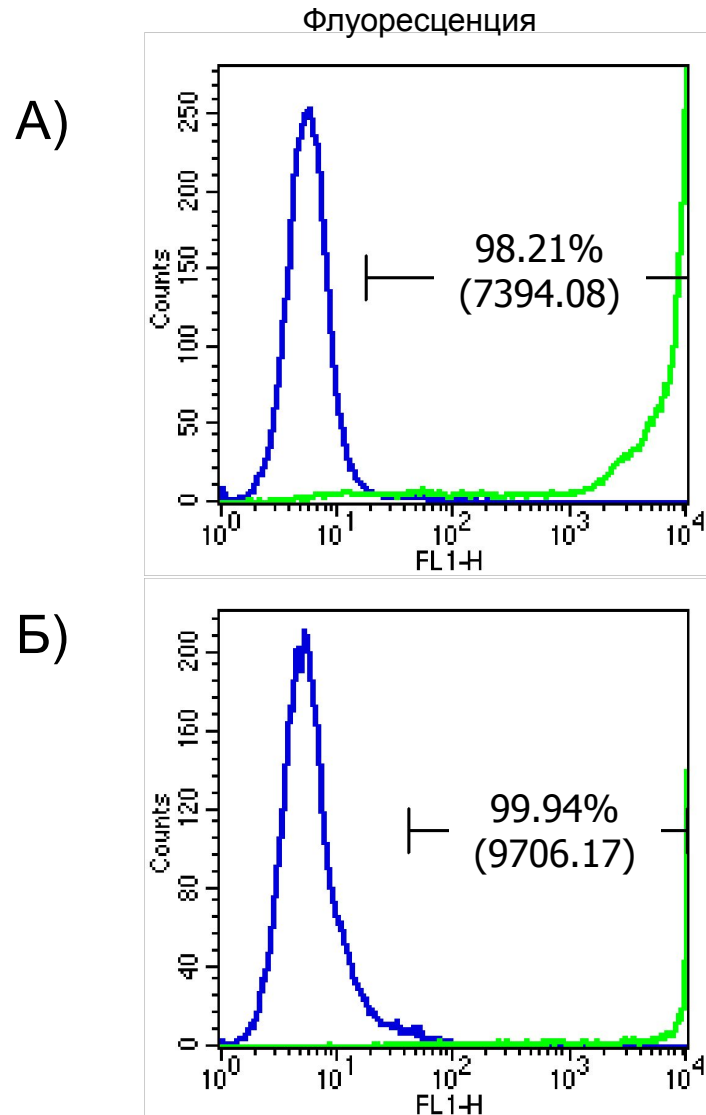
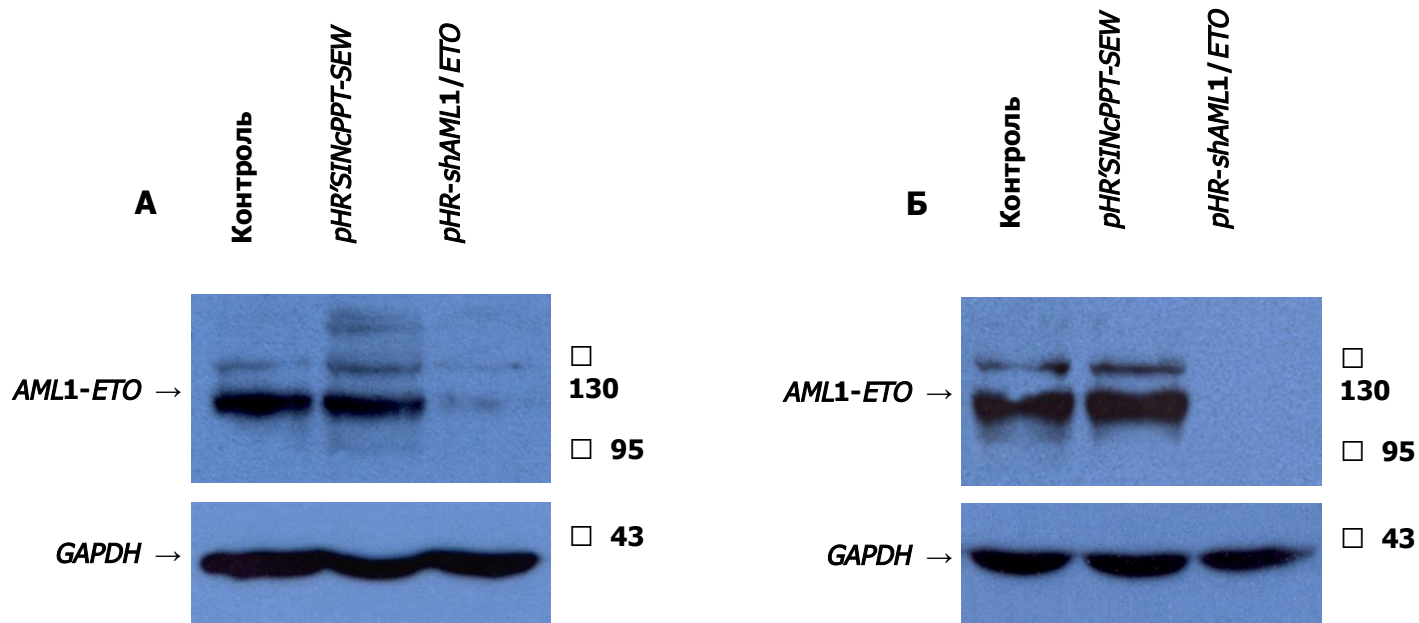


Схема строения лентивирусных векторов доставки pHR'SINcPPT-SEW (А) и pHR-shAML1/ETO (Б).





Эффективность трансдукции клеток линий Kasumi-1 (А) и SKNO-1 (Б) VSV-G псевдотипированным лентивирусом, основанным на векторе pHR-shAML1/ETO.



Искусственное подавление белка AML1-ETO с помощью anti-AML1-ETO коротких интерферирующих РНК в клетках острого миелоидного лейкоза линий Kasumi-1 (А) и SKNO-1 (Б).



F_AML1-ЕТО

[BamHI]

[перекрывающаяся область]

5'-ATGGATCCAGTGAGCGCACCTCGAAATCGAATACTGAGAAGGGTGAAGCCACAGATG-3'

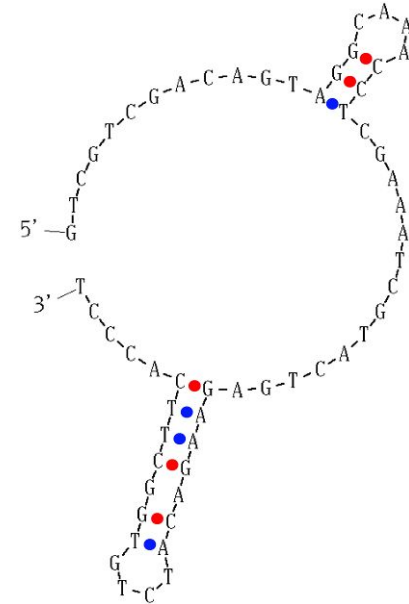
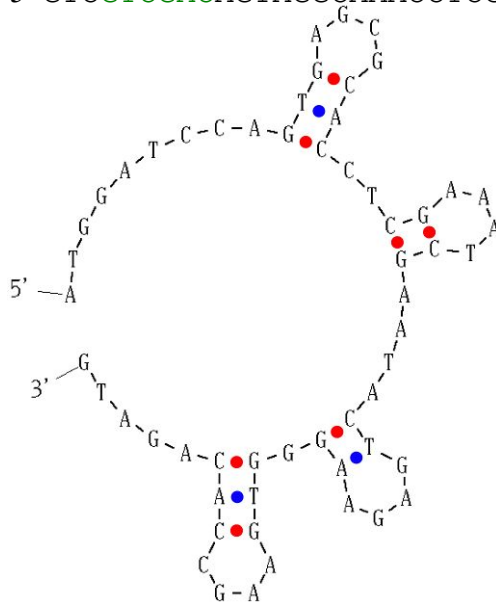
R_AML1-ЕТО

[SaII]

[перекрывающаяся

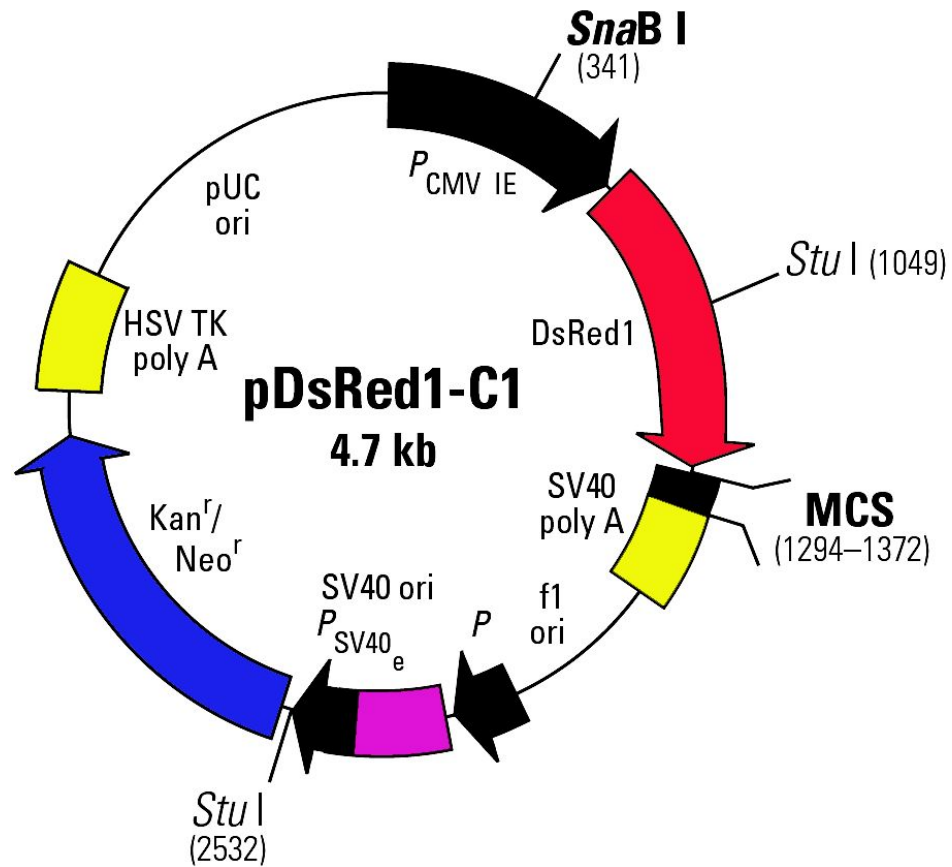
область]

5'-GTCGTCGACAGTAGGCCAAACCTCGAAATCGTACTGAGAAGACATCTGTGGCTTCACCCT-3'



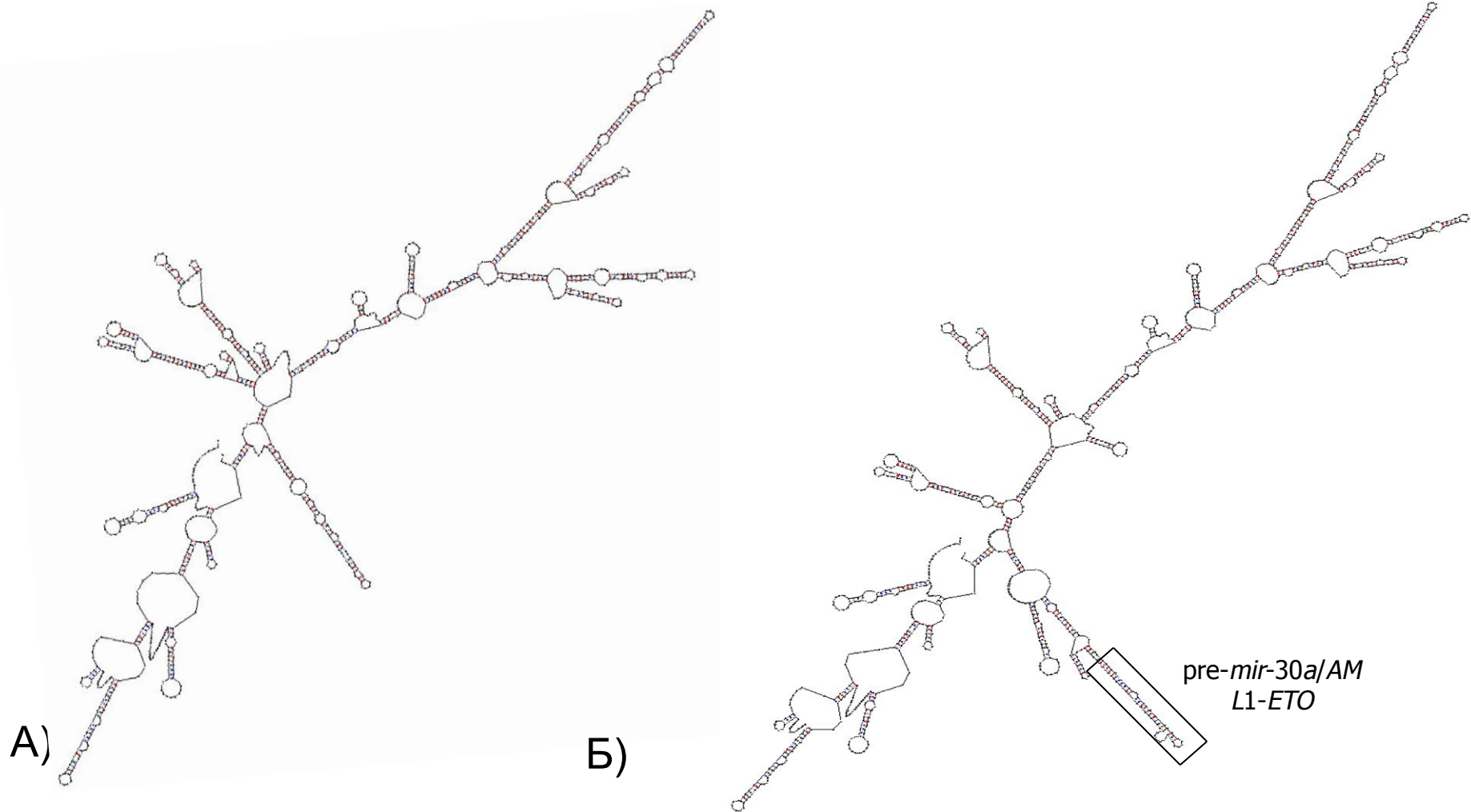
Сиквенс олигонуклеотидов и их вторичная структура, рассчитанная с помощью программного пакета Mfold 3.2 ([Na⁺] = 60 mM, [Mg²⁺] = 1.5 mM и +37°C).





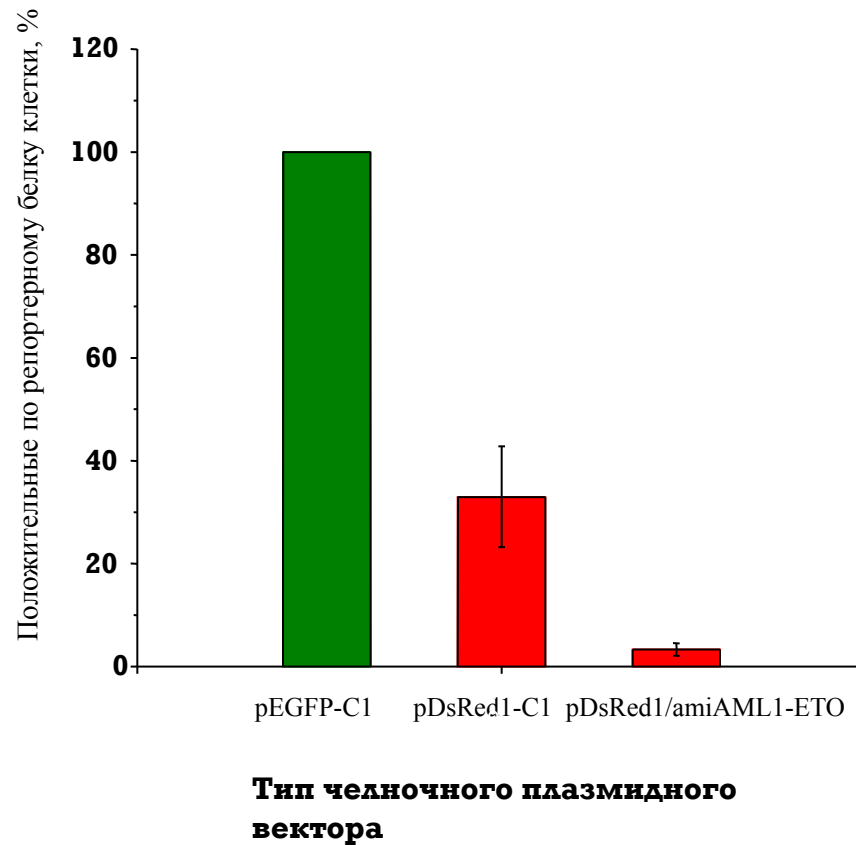
Карта челночного плазмидного вектора pDsRed1-C1.





Вторичные структуры DsRed1 mRNA (A) и DsRed1/AML1-ETO mRNA (Б), рассчитанные с помощью программного пакета Mfold





Результаты котрансфекции челночными
плазмидными векторами
pDsRed1-C1, pDsRed1/amiAML1-ETO и
pEGFP-C1 клеток линии 293Т НЕК

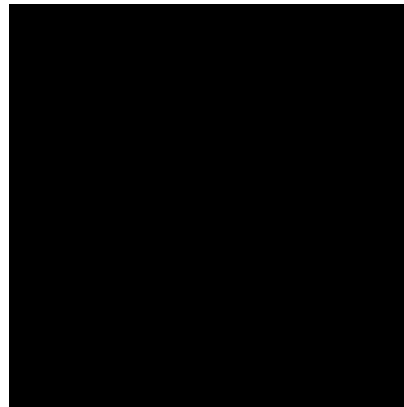
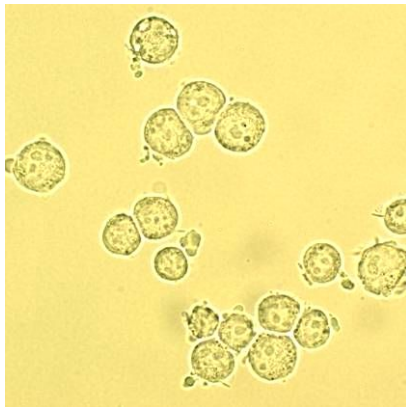


Свет

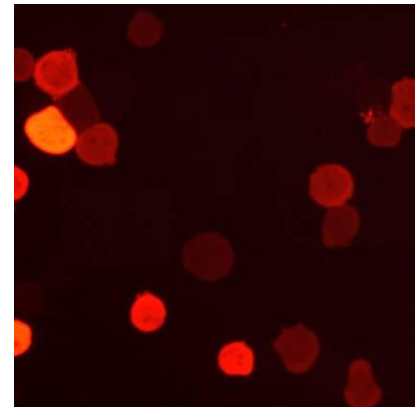
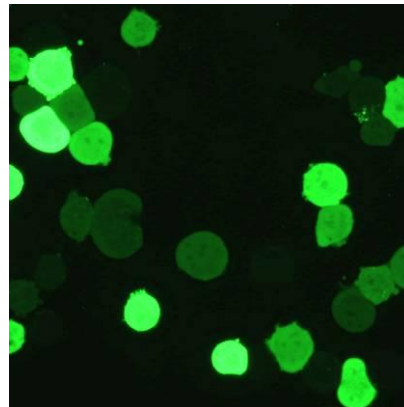
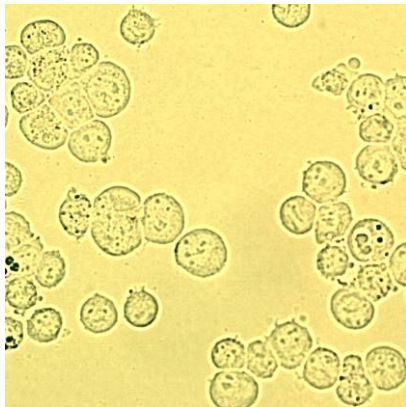
Зеленая флуоресценция

Красная флуоресценция

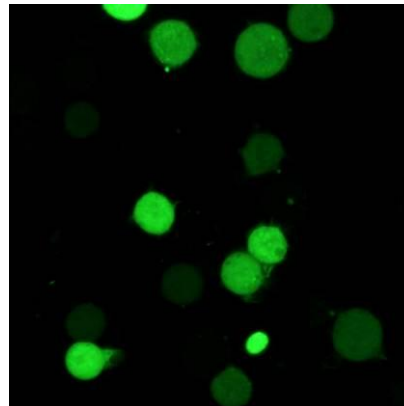
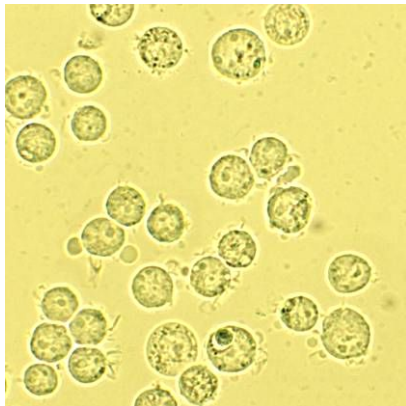
A)

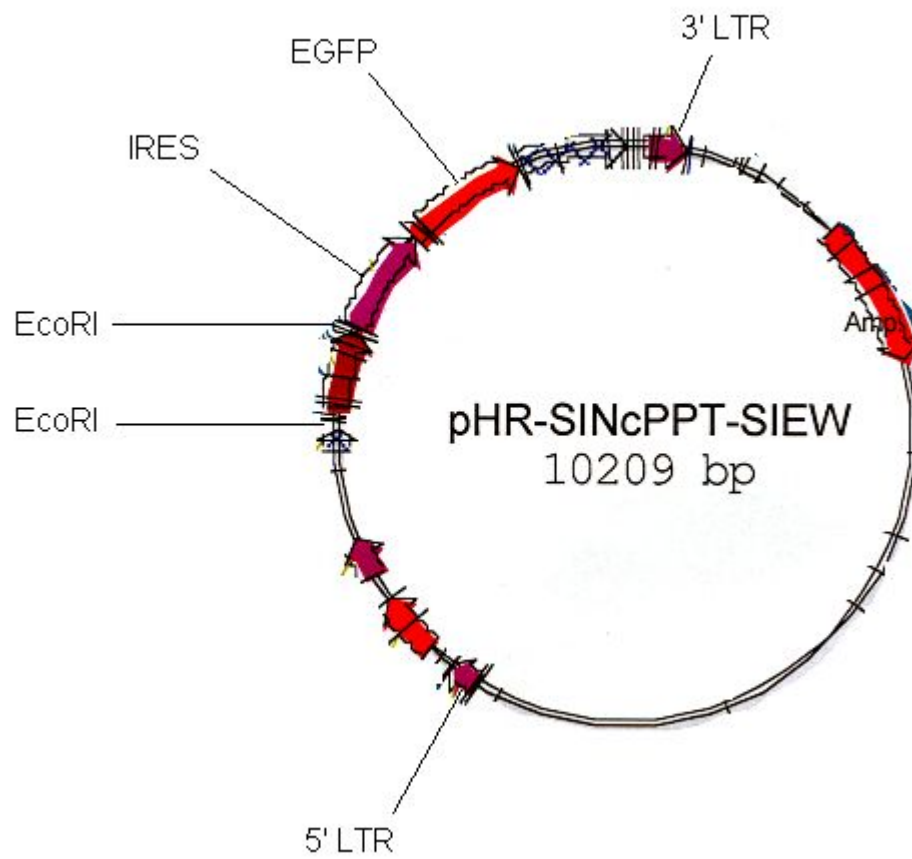


Б)



В)





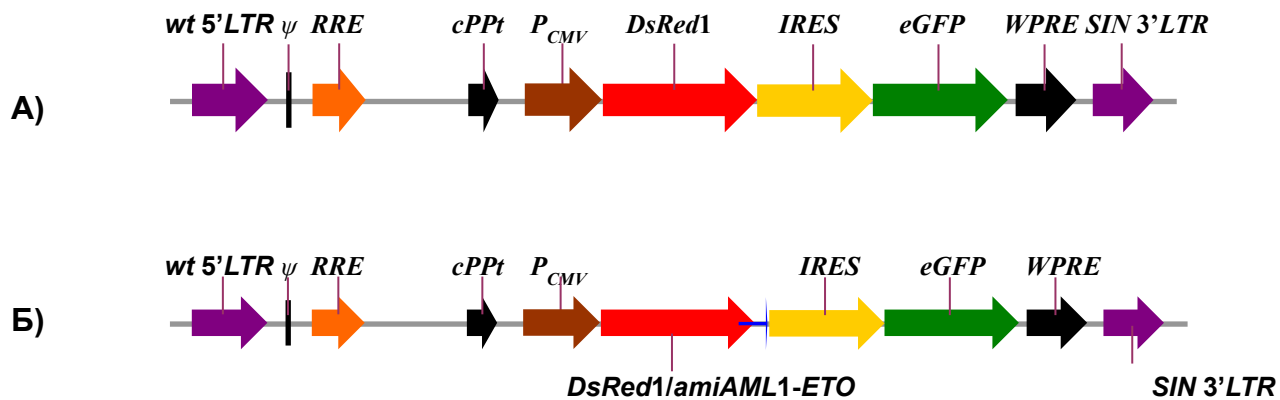
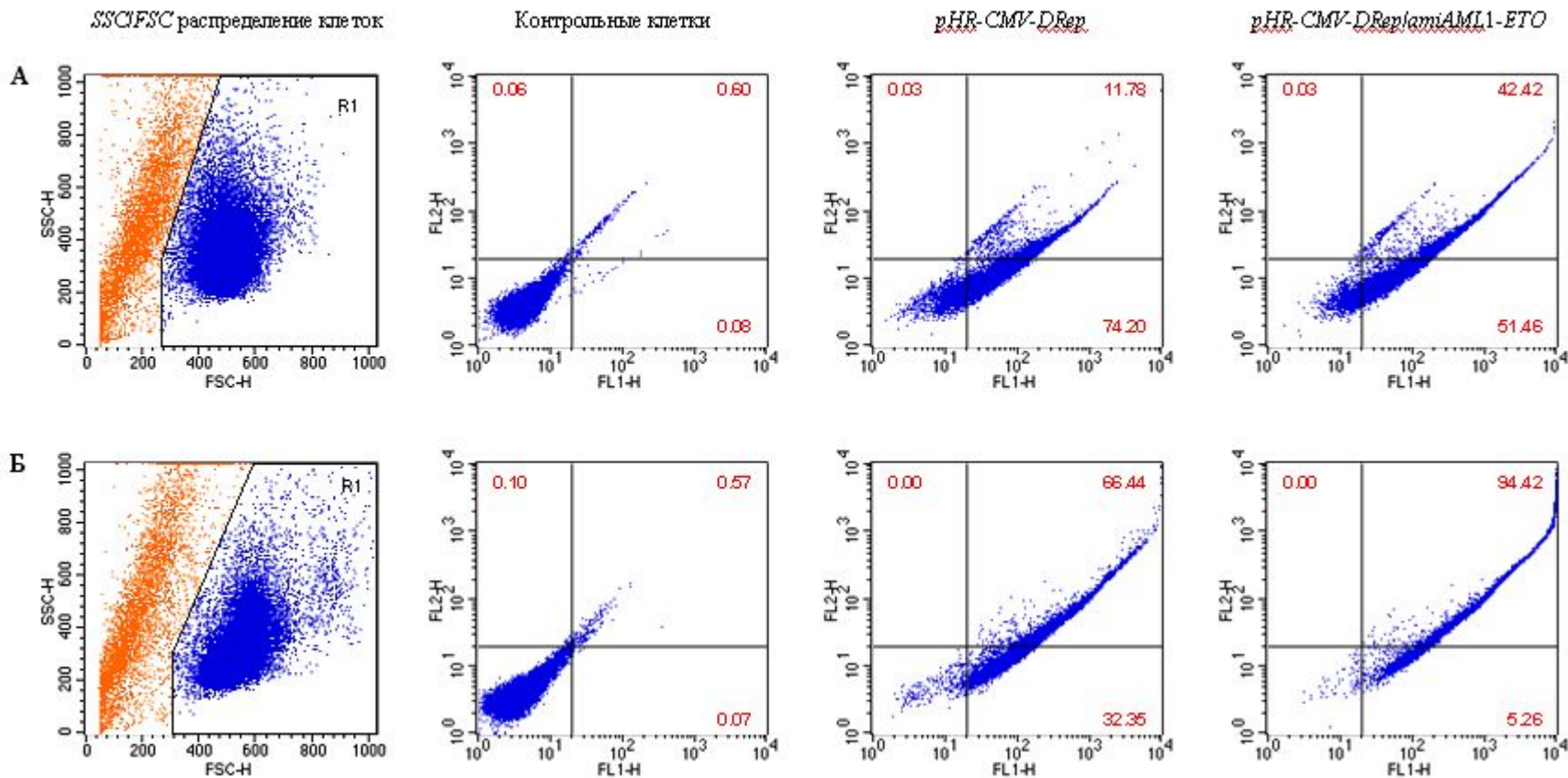


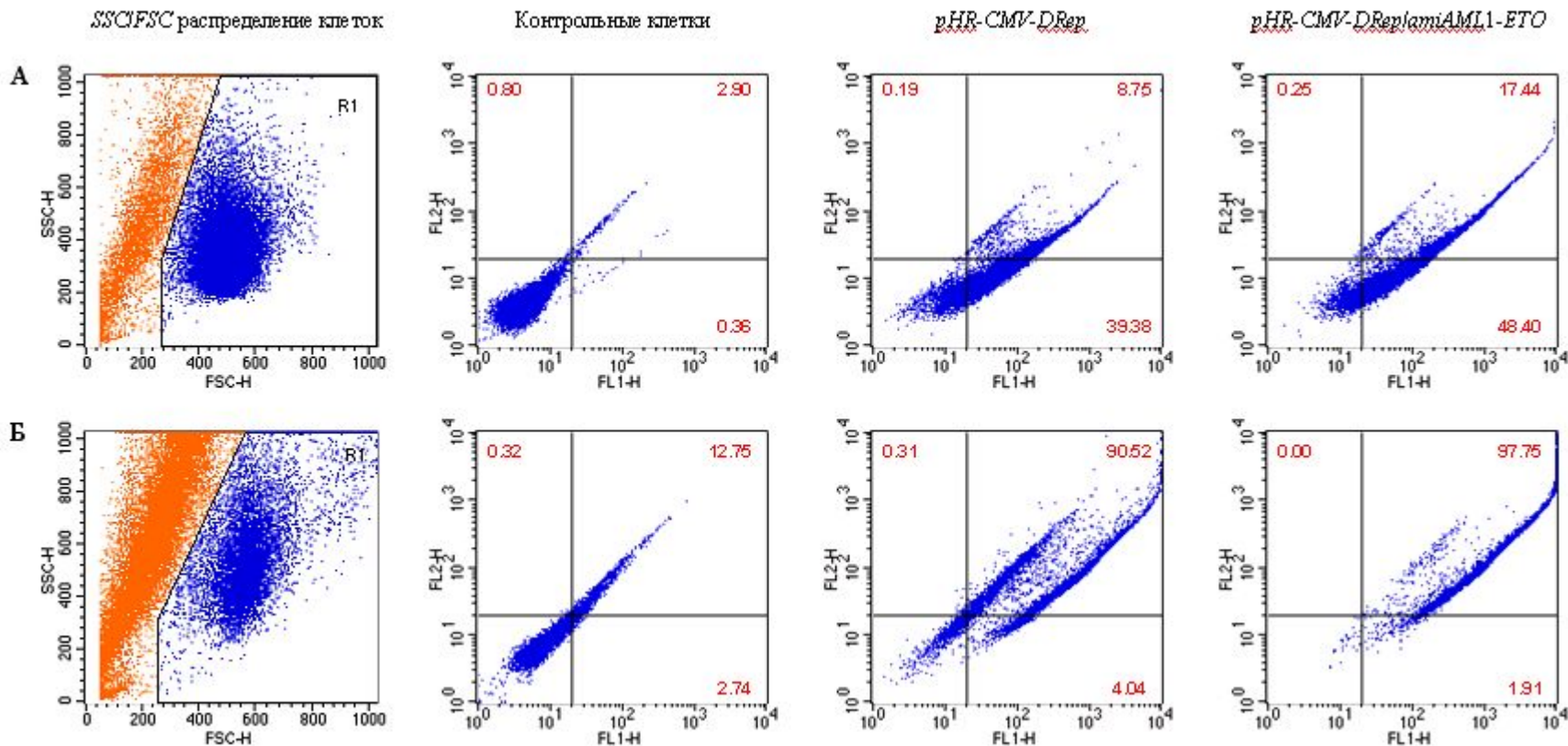
Схема строения лентивирусных векторов доставки рHR-CMV-DRep (A) и рHR-CMV-DRep/amiAML1-ETO (Б)





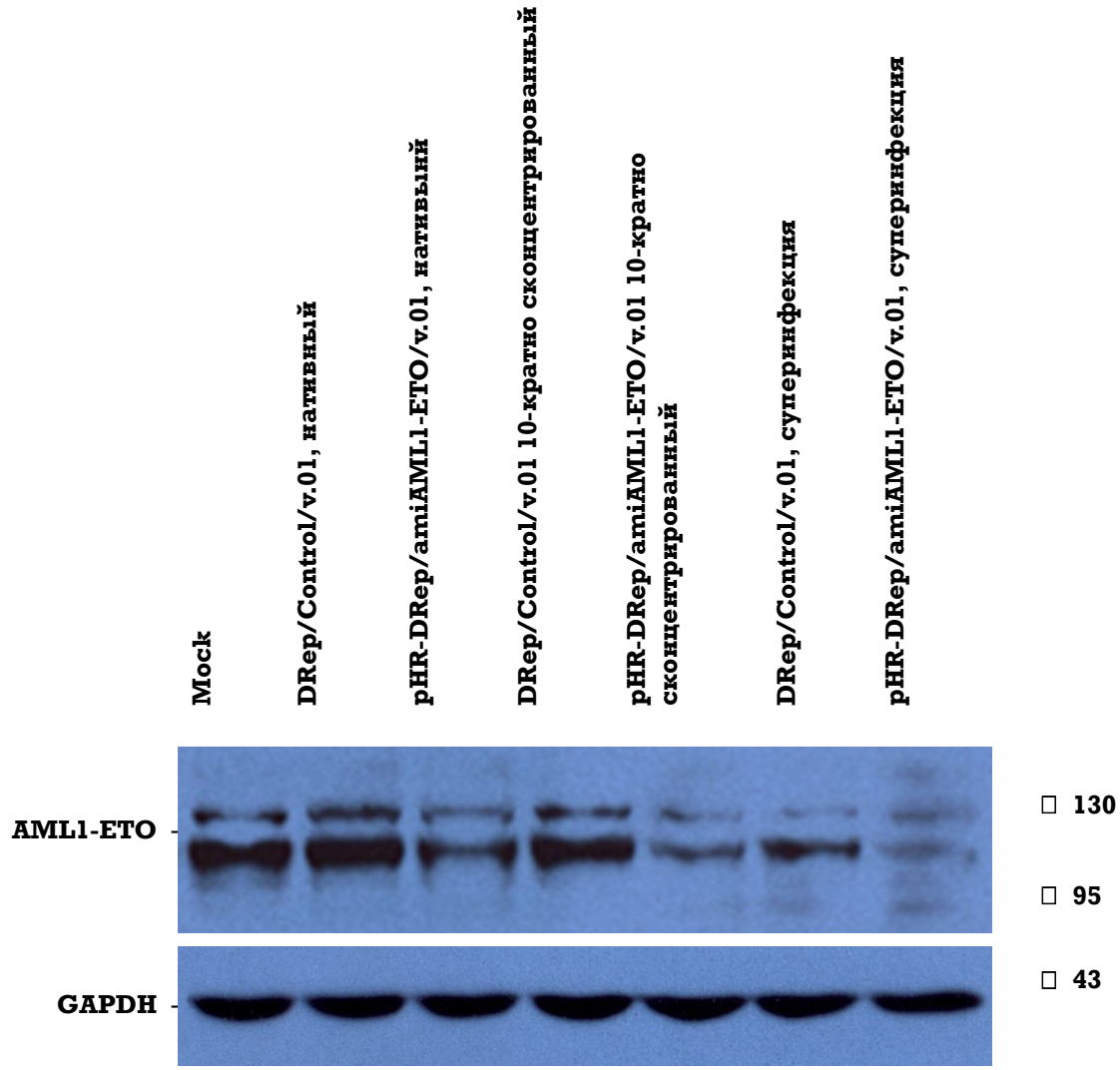
Эффективность трансдукции клеток линий Kasumi-1 и SKNO-1 DRep/Control/v.01 и pHR-DRep/amiAML1-ETO/v.01 VSV-G-псевдотипированными лентивирусами.





Стабильность наследования лентивирусных векторов DRep/Control/v.01 и *pHR-DRep/amiAML1-ETO/v.01* в клетках линий Kasumi-1 и SKNO-1, интегрировавшихся в геном.





Выводы были озвучены по ходу доклада.



автор благодарен

С.В. Глушену за помощь в проведении
микроскопических исследований

И.Н. Северину за помощь в проведении
цитометрических исследований

D. Tropeo за предоставленные вектора pCMV_dR8.91 и
pMD2.G

M. Scherr за базовый лентивирусный вектор доставки
pHR-SINcPPT-SIEW

O. Heidenreich за векторы pHR'SINcPPT-SEW и
pHR-shAML1/ETO

сотрудникам лаборатории клеточной и молекулярной
биологии лейкозов за помощь в проведениях
исследований



Спасибо за внимание.

[вернуться к началу](#)
[презентации](#)