

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ

Руководитель магистерской программы

\_\_\_\_\_ Т. Г. Волова

« \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2022 г.

## МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

на тему: «Онкомаркер сурвивин при диагностике рака мочевого пузыря»

Направление 06.04.01 Биология

Магистерская программа 06.04.01.01 – Микробиология и биотехнология

Научный руководитель	_____	профессор, д.б.н.	Л.А. Франк
	подпись, дата	должность, ученая степень	
Выпускник	_____		Н.С. Панамарёв
	подпись, дата		
Рецензент	_____	к.б.н.	Л.П. Буракова
	подпись, дата	ученая степень	
Консультант	_____	к.б.н.	Е.Е. Башмакова
	подпись, дата	ученая степень	

Красноярск 2022

## АННОТАЦИЯ

В настоящее время наблюдается рост заболеваемости злокачественными новообразованиями, в том числе раком мочевого пузыря (РМП), который занимает седьмое место среди самых встречаемых типов рака. Существующие методы диагностики РМП, такие как цистоскопия, являются дорогими и инвазивными методами, часто применяемыми при наличии серьёзных симптомов заболевания – когда рак находится на последней стадии. В связи с этим, требуется разработка нового неинвазивного, чувствительного и высокоспецифичного метода для обнаружения и прогнозирования рака мочевого пузыря. Кроме этого, существует метод доклинического определения риска развития РМП при помощи маркеров генетической предрасположенности. Онкомаркер сурвивин и полиморфизмы его гена могут быть перспективными маркерами для ранней диагностики РМП, однако литературные данные по данной теме противоречивы. Поэтому является актуальной проблема оценки сурвивина как онкомаркера при диагностике рака мочевого пузыря.

В рамках работы проведена оценка сурвивина как онкомаркера, определена его чувствительность и специфичность. Была обнаружена взаимосвязь между риском РМП и полиморфизмом промотора сурвивина - 31G/C.

Ключевые слова: РАК МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ, ОНКОМАРКЕР, СУРВИВИН, БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ ИММУНОАНАЛИЗ, ОДНОНУКЛЕОТИДНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ, RED-БИОЛЮМ, RS9904341

## АВТОРЕФЕРАТ

Магистерская диссертация по теме «Онкомаркер сурвивин при диагностике рака мочевого пузыря» содержит 85 страниц текстового документа, 32 иллюстрации, 8 таблиц, 63 использованных источника.

РАК МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ, ОНКОМАРКЕР, СУРВИВИН, БИОЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЙ ИММУНОАНАЛИЗ, ОДНОНУКЛЕОТИДНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ, PED-БИОЛЮМ, RS9904341

Целью данной работы являлось определение значимости онкомаркера сурвивина для диагностики рака мочевого пузыря

В результате проведённых исследований был предложен биолюминесцентный иммуноанализ сурвивина в конкурентном и сэндвич формате. Были получены все необходимые составляющие аналитической системы. Определены условия проведения анализа. Определены возможности метода по выявлению сурвивина в модельных и клинических образцах. Анализ клинических образцов мочи без предварительной пробоподготовки конкурентным вариантом иммуноанализа показывал ложноположительные результаты из-за неспецифичной («чужой») конкуренции элементов мочи. Показано, что с помощью биолюминесцентного иммуноанализа сэндвич типа возможно выявление сурвивина в диапазоне концентраций от 0,2 до 54 нг/мл, что существенно грубее (почти на порядок), чем необходимо для выявления диагностически важного содержания сурвивина. Коммерческим колориметрическим иммуноанализом для выявления сурвивина (R&D Systems, США) были проанализированы 44 клинических образца мочи. Выявленные повышенные концентрации сурвивина в моче пациентов с РМП указывают на важность данного показателя для диагностики. Чувствительность сурвивина как онкомаркера составила 69%. Помимо этого, при помощи метода «PED-Биолюм» был определён генотип по полиморфизму -31G/C промотора сурвивина у 361 участника исследования. Была установлена взаимосвязь,

указывающая на протекторный эффект генотипа СС в отношении мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря.

По материалам работы опубликована статья в рецензируемом журнале, индексируемом в базе данных Scopus, статья в журнале, входящем в список ВАК, получен 1 патент РФ на изобретение. Результаты работы были представлены на научных конференциях всероссийского и международного уровня: «Перспектив Свободный 2021», «Биотехнология новых материалов - окружающая среда - качество жизни» (Красноярск).

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	7
<b>1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	9
1.1 Структура белка сурвивина .....	9
1.2 Функции сурвивина в организме и клетке .....	11
1.3 Сурвивин как маркер рака.....	14
1.4 Использование $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемых фотопротеинов в качестве метки для иммуноанализа .....	17
1.5 Коммерческие наборы для определения концентрации сурвивина в биологических образцах.....	22
1.6 Полиморфизм промотора гена сурвивина.....	25
1.7 Выявление однонуклеотидных полиморфизмов .....	27
<b>2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ</b> .....	30
2.1 Вещества и реактивы .....	30
2.2 Выявление полиморфизма в гене промотора сурвивина.....	31
2.2.1 Выделение геномной ДНК.....	31
2.2.2 ПЦР-амплификация фрагмента гена.....	31
2.2.3 РЕХТ-реакция и биоллюминесцентный анализ её продуктов .....	32
2.3 Получение компонентов необходимых для разработки аналитической системы по выявлению сурвивина.....	34
2.3.1 Получение генетической конструкции, кодирующей гибридный белок сурвивин-обелин .....	34
2.3.2 Трансформация компетентных клеток <i>E. coli</i> XL1-Blue плазмидной ДНК и ПЦР-скрининг колоний.....	35
2.3.3 Выделение плазмидной ДНК.....	36

2.3.4 Трансформация компетентных клеток <i>E. coli</i> BL21-CodonPlus плазмидной ДНК.....	36
2.3.5 Культивирование рекомбинантных клеток <i>E. coli</i> .....	36
2.3.6 Экстракция и очистка рекомбинантных белков .....	37
2.3.7 Активация обелинового домена гибридного белка целентеразином .....	38
2.3.8 Химический синтез конъюгата AbSurv-Обелин.....	39
2.4 Электрофорез белковых молекул в полиакриламидном геле .....	39
2.5 Сравнительный биолюминесцентный твердофазный анализ рекомбинантных сурвивинов.....	40
2.6 Модельный биолюминесцентный твердофазный анализ конкурентного и «сэндвич» формата.....	40
2.7 Статистическая обработка результатов.....	42
<b>3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....</b>	<b>43</b>
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>	<b>74</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....</b>	<b>77</b>
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ .....</b>	<b>79</b>

## ВВЕДЕНИЕ

На переходно-клеточный рак мочевого пузыря (РМП) приходится 2,8% случаев заболевания раком в России у обоих полов, а у мужчин доходит до 4,7%. Также он занимает седьмое место по встречаемости среди самых распространённых типов рака [1]. Цистоскопия, которая является стандартом для определения данного типа рака и прогнозирования выживаемости после лечения, является инвазивным и дорогим методом. Дополнением к этому методу служит уринарный цитологический анализ, при помощи которого хорошо выявляется болезнь на поздней стадии, однако у него не хватает чувствительности для обнаружения опухолей на начальной стадии. Также этот метод дорогой и значительно зависит от квалификации проводящего её цитопатолога. Поэтому необходима разработка нового неинвазивного, чувствительного и высоко специфичного метода для обнаружения и прогнозирования рака мочевого пузыря.

Отличительной чертой карциногенеза человека является нарушение регуляции апоптоза: клетки рака способны сопротивляться программируемой смерти благодаря изменённой экспрессии антиапоптотических белков, в число которых входит сурвивин. Он вовлечён в ингибирование апоптоза и контроль митоза и способен вызывать изменения в генах, связанных с инвазивностью клеток опухоли.

Сурвивин экспрессируется совершенно по-разному в нормальных и злокачественных клетках: в нормальных тканях сурвивина почти нет, но в злокачественных образованиях его количество значительно повышено. Это делает сурвивин удобным маркером для диагностики рака [2,3].

Для применения онкомаркера в клинической практике он должен быть высокочувствительным и специфичным, анализ по его выявлению должен быть дешёвым, массовым и удобным для пациентов [4]. Сообщается, что мочевой сурвивин является отличным онкомаркером для диагностики рака мочевого

пузыря. Однако среди опубликованных работ существует разброс данных по специфичности и чувствительности сурвивина, поэтому необходимы дополнительные исследования для уточнения данных показателей.

Помимо этого, вариации в гене сурвивина могут использоваться в качестве генетических маркеров предрасположенности развития рака и рецидивов. Так, в промоторном участке гена *BIRC5*, кодирующего сурвивин, было выявлено несколько однонуклеотидных полиморфизмов (SNP), которые могут влиять на уровень экспрессии гена белка. Наиболее изученным является полиморфизм rs9904341(G/C), мутация в котором коррелирует с повышенным уровнем экспрессии сурвивина. Влияние данного полиморфизма на риск рака, в том числе и для РМП, было показано для азиатских популяций[5]. В отношении европейских популяций подобных исследований было проведено крайне мало.

Целью работы являлось определение значимости онкомаркера сурвивина для диагностики рака мочевого пузыря.

Исходя из поставленной цели сформулированы следующие задачи:

1. Подобрать условия проведения ПЦР для синтеза матриц, содержащих полиморфизм -31G/C (rs9904341), и оптимизировать условия билюминесцентного анализа по его выявлению;
2. Провести билюминесцентный анализ по выявлению исследуемого полиморфизма и проанализировать полученные результаты статистическими методами;
3. Разработать дизайн билюминесцентного иммуноанализа в конкурентном и «сэндвич» формате для определения концентрации сурвивина. Получить все необходимые составляющие для разработки аналитической системы;
4. Изучить аналитический потенциал иммуноанализа на модельных и клинических образцах мочи;
5. Определить концентрацию сурвивина в клинических образцах мочи пациентов больных РМП. Оценить чувствительность сурвивина как онкомаркера для диагностики РМП.

# 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1 Структура белка сурвивина

Сурвивин относится к группе белков-ингибиторов апоптоза (IAP), все члены которого имеют как минимум 1 бакуловирусный IAP повтор (BIR), который состоит примерно из 70 аминокислот. Данный повтор обеспечивает их взаимодействие с проапоптотическими белками.

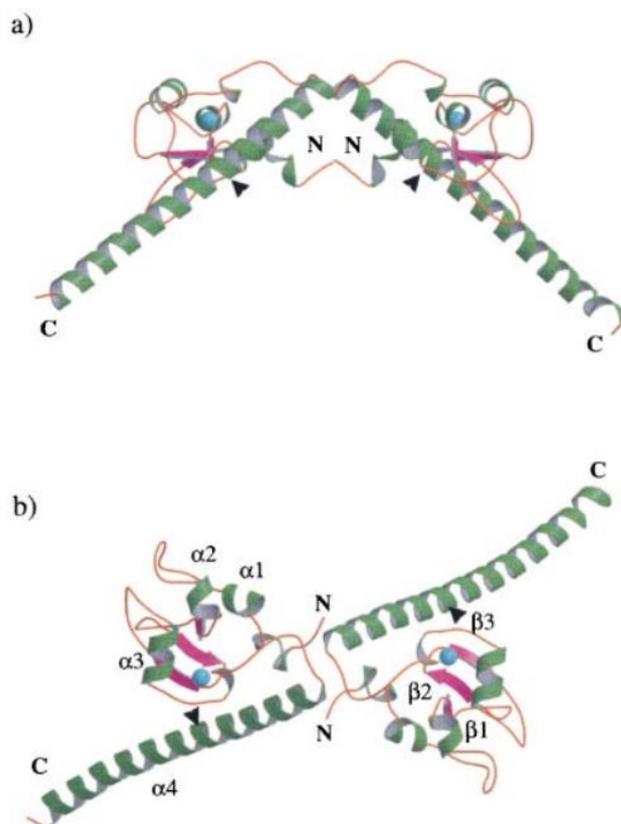


Рис.1.1. Структура димера сурвивина [6]

Зеленым и фиолетовым обозначены  $\alpha$ -спирали и  $\beta$ -цепи соответственно, голубым – атомы цинка. Черным стрелками обозначены сайты расщепления трипсином  
(а) 2-кратная ось димера находится в плоскости рисунка  
(б) 2-кратная ось перпендикулярна плоскости рисунка.

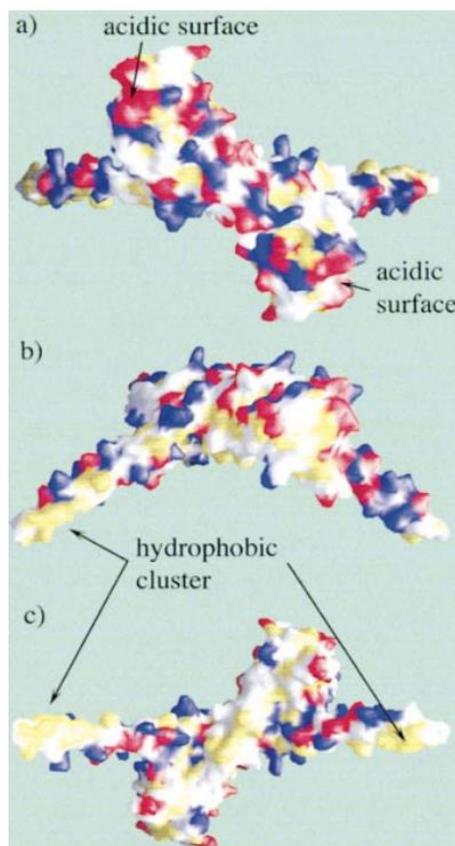


Рис.1.2. Молекулярная поверхность димера сурвивина [6]

Аминокислоты обозначены в соответствии с их химическими свойствами: кислотные, основные, полярные и гидрофобные в красный, синий, белый и жёлтый цвета соответственно.  
а) – внешняя, «выпуклая» поверхность;  
б) – вид сбоку;  
с) – вогнутая, внутренняя поверхность.

Мономер данного белка состоит из глобулярного N-концевого домена цинкового пальца (1-88 а.о.), линкерного участка (89-97 а.о.) и длинной C-концевой спирали (98-142 а.о.). Домен цинкового пальца и спираль плотно упакованы вместе. В общем мономер содержит 4 спирали, имеющих больше одного оборота, 3 цепи  $\beta$ -листа. ВІR мотив состоит из 3-х  $\alpha$ -спиралей и трёхцепочечного антипараллельного  $\beta$ -листа

В растворе сурвивин образует стабильные димеры (структура на рис.1.1), которые не диссоциируют при разведении раствора, в котором он находится. Димер имеет уникальную форму галстука-бабочки. Поверхность сурвивина (рис.1.2) имеет разные химические свойства, обусловленные их аминокислотным составом. Так, выпуклая поверхность представлена небольшими вкраплениями основных, кислотных, гидрофобных или полярных аминокислот. Вогнутая же сторона состоит в основном из гидрофобных аминокислот, в частности два крупных гидрофобных кластера расположены на C-конце спирали  $\alpha 4$ . Эти кластеры участвуют в межбелковых взаимодействиях, например, связываются с микротрубочками.

В образовании димера вовлечены: N-концевой регион белка, линкерная часть и N-концевая часть спирали  $\alpha 4$ . Граница, на которой взаимодействуют димеры в основном гидрофобна, так как на 75% состоит из неполярных аминокислот [6].

## 1.2 Функции сурвивина в организме и клетке

С биологической точки зрения, сурвивин – мультифункциональный белок, способный ингибировать апоптоз, регулировать деление клеток и способствовать ангиогенезу. В некоторых исследованиях указывается, что главной функцией белка является контроль митоза. Ингибирование сурвивина вызывает дефекты в сегрегации хромосом, цитокинезе и нарушает финальные стадии деления клетки. Также его ингибирование значительно подавляет ангиогенез в моделях опухолей, что указывает на взаимосвязь функций сурвивина и ангиогенеза[7].

В нормальных тканях синтез и деградация сурвивина полностью зависят от клеточного цикла, что подтверждает его роль в регуляции митоза. При митозе сурвивин функционирует небольшой промежуток времени во время метафазы и анафазы, при этом локализуясь в двух субклеточных пулах (Рис.1.3). Один пул сурвивина участвует в полимеризации тубулина посредством взаимодействия с центросомами, микротрубочками метафазного и анафазного веретена деления и остатками митотического аппарата, главным образом регулируя их динамику. Второй пул сурвивина локализован у кинетохора митотической хромосомы. В этом пуле сурвивин ассоциирован с регуляторами цитокинеза, такими как киназа *auroга В*, внутренний белок центромеры (*inner centromere protein, INCENP*), и бореалин (*Borealin/Dasra*), которые поддерживают роль сурвивина как часть комплекса белков-хромосомных пассажиров (*chromosomal passenger complex - CPC*) [8]. Этот комплекс участвует в регуляции ключевых митотических событий: прикрепление микротрубочек к кинетохору, активация сборки и дальнейшая регуляция веретена деления и сократительного аппарата, управляющего цитокинезом[9].

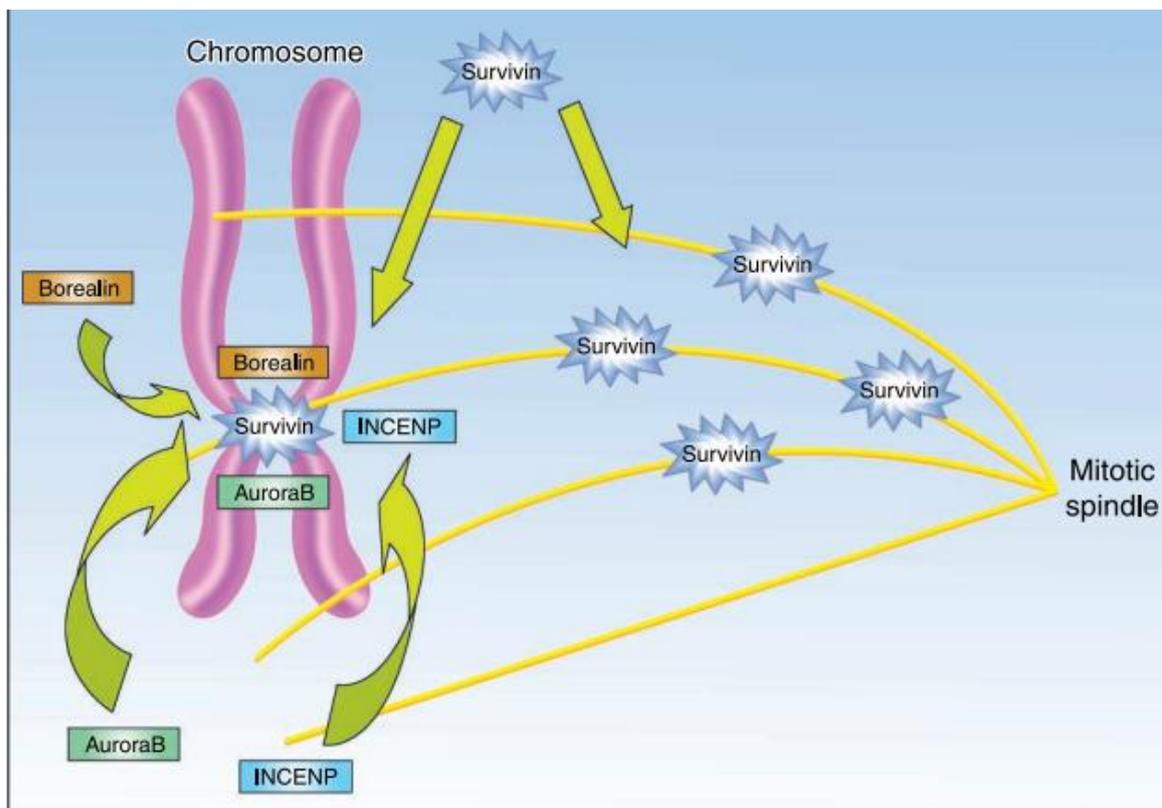


Рис.1.3. Функции сурвивина при митозе. Сурвивин – компонент CPC, который необходим для правильной сегрегации хромосом и цитокинеза. Дополнительно, отдельный пул сурвивина связан с полимеризацией тубулина и способствует регуляции динамики микротрубочек [8].

Роль сурвивина в ингибировании апоптоза была предметом многочисленных дискуссий. Изначально считалось, что сурвивин и другие IAP избирательно связывают и способствуют деградации каспаз 3, 7 и 9. Однако дальнейшие эксперименты показали, что сурвивин ингибирует только каспазу 9 (Рис.1.4), при этом требуется присутствие кофактора-белка, взаимодействующего с X – белком вируса гепатита В (hepatitis В X-interacting protein, HBХIP). Также есть предположение что антиапоптотическая роль сурвивина может быть связана с белком-ингибитором апоптоза XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein - XIAP), с которым сурвивин взаимодействует через бакуловирусный домен, при этом повышая стабильность XIAP, что приводит к синергетическому ингибированию активации каспазы-9 [8].

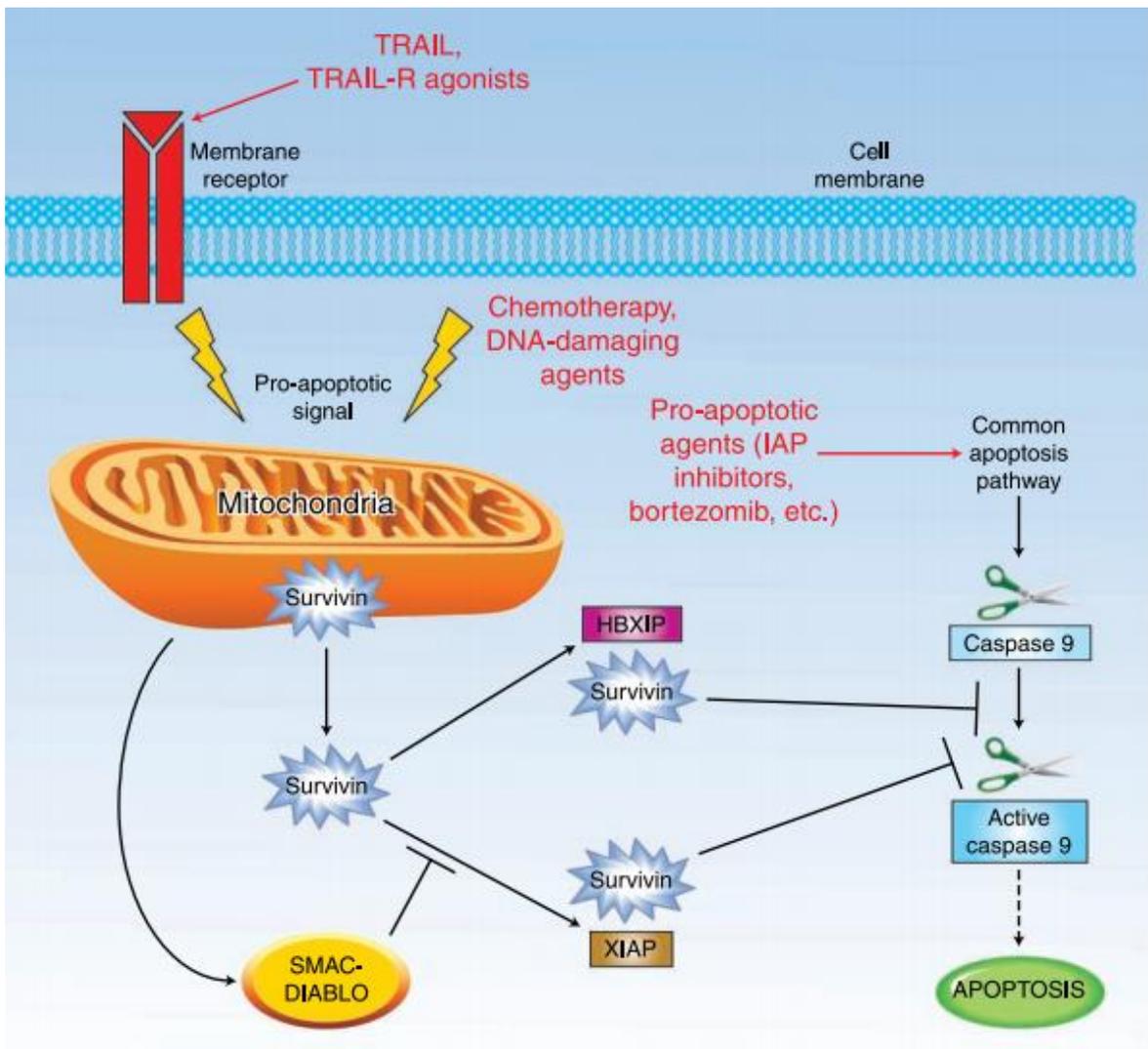


Рис.1.4. Функции сурвивина как ингибитора апоптоза. После активации проапоптотического клеточного сигнального пути сурвивин освобождается из митохондрии в цитозоль и ингибирует активацию каспазы-9. Эта функция требует ассоциации с HBXIP и/или XIAP и ингибируется митохондриальным белком Smac/Diablo [8].

Ангиогенез – физиологический процесс, характеризующийся образованием новых кровеносных сосудов из уже существующих. Данный процесс увеличивает доставку кислорода и питательных веществ, что необходимо для существования и роста возникшей опухоли. Процесс образования новых сосудов включает в себя следующие этапы: 1) освобождение проангиогенных факторов из опухолевых клеток; 2) изменения в

морфологии эндотелиоцитов; 3) освобождение протеолитических ферментов, разрушающих базальную мембрану; 4) миграция и формирование трубчатых структур; 5) пролиферация эндотелиоцитов и б) дифференциация в капилляры. Среди всех белков, участвующих в этих процессах особенно важным является фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor - VEGF), т.к. он участвует во всех этапах, за исключением первого. Фактор роста эндотелия сосудов связывается с соответствующими рецепторами (семейства VEGFR) и через сигнальный путь PI3K/Akt способствует выживанию и пролиферации эндотелиальных клеток.

Сурвивин также способствует активации данного пути (пока ещё не известным способом), который в свою очередь через ряд других механизмов увеличивает экспрессию VEGF.

### **1.3 Сурвивин как маркер рака**

Сурвивин практически отсутствует в нормальных тканях взрослого человека, но при этом сверхэкспрессируется практически во всех злокачественных опухолях (таблица 1), включая рак мочевого пузыря, рак лёгких, рак молочной железы, желудка, пищевода, печени, яичника и других [10]. В настоящее время сурвивин рассматривают как потенциальный маркер генитоуретальных типов рака, так при таких типах болезни белок попадает в мочу, где он может быть легко обнаружен при помощи теста на основе антител. Это позволяет создать простой, неинвазивный и относительно дешёвый метод для диагностики таких типов рака. Данный метод может быть очень полезен для диагностики рака мочевого пузыря, так как он плохо обнаруживается стандартными методами (цистоскопия, цитологические методы) на ранних стадиях, которые к тому же являются инвазивными, из-за чего вызывают дискомфорт у пациентов. Также рак мочевого пузыря имеет высокую вероятность рецидива, что требует обследования пациента минимум раз в три

месяца. Помимо этого, эффективность цистоскопии и уринарной цитологии сильно зависят от квалификации врача, проводящего диагностику, что сильно сказывается на результатах. Чувствительность цистоскопии оценивается в 47-52%, а у цитологического исследования клеток осадка мочи (urine cytology) в 40-60% при опухолях на низкой стадии и до 95% при высокой [11].

Таблица 1 – Сверхэкспрессия белка сурвивина при различных типах рака [11]

Тип рака	Увеличение экспрессии, %
Рак лёгких	85,5
Рак пищевода	80
Рак груди	70,7-90,2
Рак поджелудочной железы	76,9-88
Рак яичников	73,5
Злокачественная меланома	67
Гепатоцеллюлярная карцинома	41-87
Колоректальный рак	63,5
Рак мочевого пузыря	57,8
Острый миелоидный лейкоз	54,8
Острый лимфобластный лейкоз	68,8
Рак ротовой полости	72-75

S. Ziaee et al проверили пригодность сурвивина как маркера рака мочевого пузыря. Они разделили испытуемых на 2 группы: исследуемую, включающую больных раком мочевого пузыря пациентов (N=20) и контрольную (имеют другие нарушения мочеиспускательного тракта, N=18). В итоге положительные результаты в тесте (ОТ-ПЦР – метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией) на сурвивин были получены для 18 участников из исследуемой группы и 9-ти из контрольной, т.е. в данном случае тест обладает 90% чувствительностью и 50% специфичностью. При этом в исследуемой группе было 10 пациентов, у которых цитологическое

исследование не выявило наличие рака, однако все из них имели положительный результат в тесте на сурвивин. Позже было выявлено, что 9 пациентов из этой группы имели опухоли ранней стадии. Результаты данного эксперимента продемонстрировали, что тест на сурвивин имеет лучшую чувствительность чем стандартные методы (цистоскопия и цитологическое исследование клеток осадка мочи) при диагностике рака на низкой стадии [12].

Также в работе Srivastava A.K. et al [13] при помощи ИФА была определена концентрация сурвивина в моче 48 здоровых участников контрольной группы и 117 пациентов с гистологически подтвержденной уротелиальной карциномой. Было обнаружено, что сурвивин значительно выше в группе случаев ( $P < 0,05$ ). Было предложено пороговое значение сурвивина 17,7 пг/мл с приблизительной чувствительностью 82,9% и специфичностью 81,1% ( $P < 0,0001$ ), тогда как цитология мочи имела чувствительность 66,7% и специфичность 96,0%.

Среди опубликованных исследований существует разброс данных по специфичности и чувствительности сурвивина. Можно встретить как крайне низкие значения чувствительности (21,1%) [14], как средние (53%; 70,6%) [15,16], так и крайне высокие (100%) [17]. Мета-анализ, включающий в себя в совокупности данные по 2051 участнику определил значение чувствительности в 77,2%. Данные о специфичности также остаются не ясны. В том же мета-анализе авторы отмечают, что при включении большого количества здоровых в контрольную группу значение специфичности может завышаться, полученное значение специфичности у них составило 91,8% [18]. Клиническую значимость использования сурвивина ещё только предстоит выяснить, так как существующие исследования имеют ограниченную выборку и разные подходы к дизайну исследования. Поэтому работы по выявлению сурвивина всё ещё являются актуальными.

#### **1.4 Использование $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемых фотопротеинов в качестве метки для иммуноанализа**

Иммуноанализ – это разнообразная группа аналитических методов, используемых во всех клинических лабораториях. С 1959 года, когда Розалин Ялов и Соломон Берсон разработали принципы иммуноанализа, развитие метода в плане повсеместности применения и создания оригинальных схем анализа растёт экспоненциально. Вне зависимости от применения и лежащей в основе технологии анализ включает в себя четыре компонента: антиген (Ag); обнаруживаемое антитело (Ab), используемое для обнаружения; способ разделения комплекс антиген-антитело (Ag-Ab) из несвязанных реагентов (в случае если это гетерогенный анализ) и метод обнаружения комплекса Ag – Ab. Множество форматов иммуноанализа было разработано в течение последних лет [19]. Схема проведения самых распространённых из них представлена на рисунке 1.5.

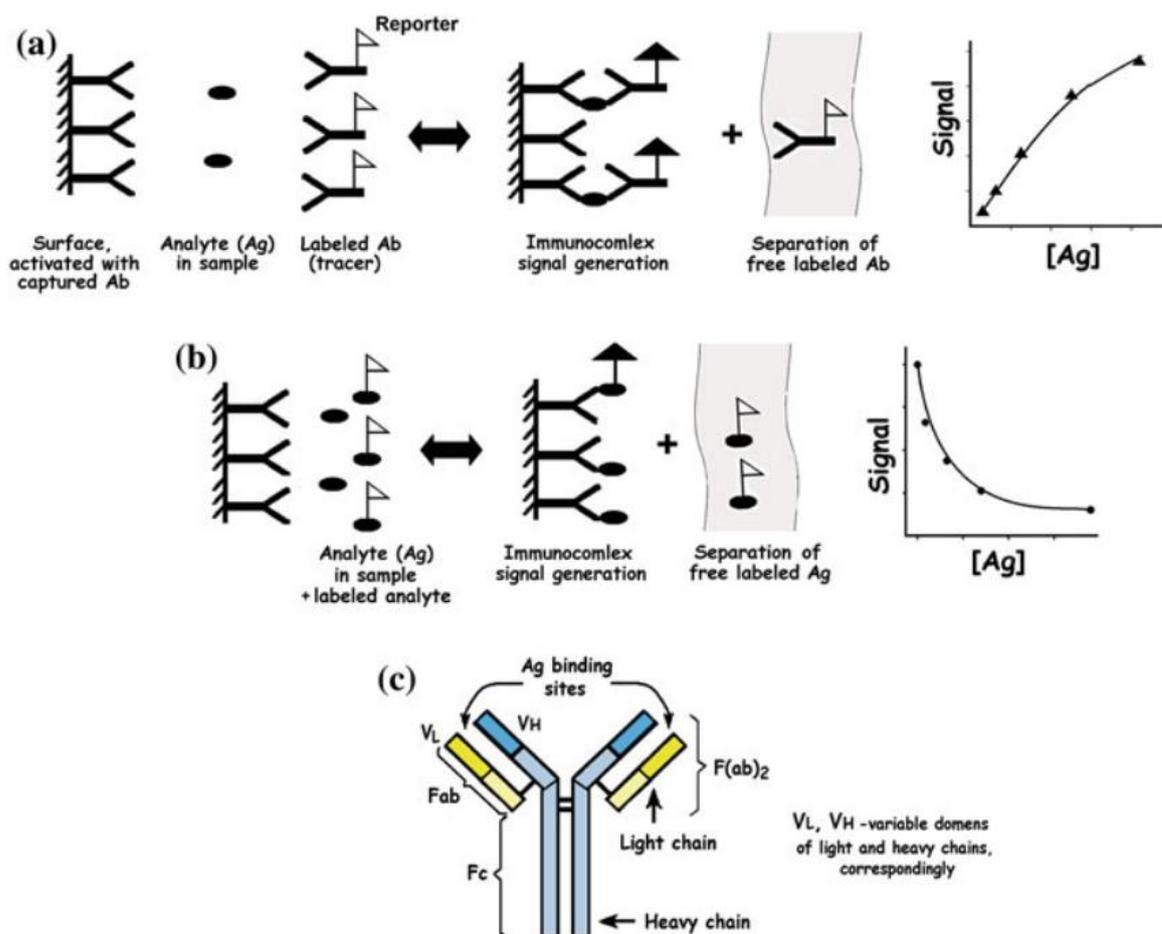


Рис.1.5. Схема для: **a** «сэндвич» и **b** конкурентного иммуноанализов; **c** - структура антитела (человеческий IgG), показывающая пары идентичных тяжёлых (выделены светло-голубым) и лёгких (выделены светло-жёлтым) цепей. Обе пары цепей содержат переменные домены,  $V_H$  и  $V_L$ , отвечающие за связывание с антигеном [19].

Эффективность любого иммуноанализа зависит от двух факторов: эффективность формирования иммунокомплекса и способность детектирующей системы обнаруживать этот комплекс с высокой чувствительностью. Формирование комплексов обеспечивается аффинностью антител к антигену. Антитела — это белки, которые вырабатываются у животных в результате иммунологического ответа на наличие чужеродного вещества (рис. 1.5 схематично представляет строение антитела). Антитела являются важнейшим компонентом иммуноанализа, который обеспечивает его большую

эффективность, благодаря их способности связываться с чрезвычайно широким спектром природных и искусственных молекул, клеток и вирусов. Исключительная специфичность для анализируемого вещества позволяет анализировать его в сложных биологических средах (сыворотка, моча и т.д.).

Система обнаружения иммунокомплекса (генерация сигнала плюс устройство для измерения) влияет на чувствительность иммуноанализа. Основным требованием для системы обнаружения является уровень сигнала метки, который должен быть выше фонового шума. Множество разновидностей меток применяются в иммунологическом анализе. Первыми использовались радиоактивные метки, но проблемы, связанные с радиоактивными отходами и нестабильность, присущая радиоактивно-меченым реагентам, стимулировали развитие нерадиоактивных меток.

Ферменты, катализирующие химические реакции с визуальными сигналами (например, цвет или свет) теперь используются чаще, чем другие метки. Ферменты могут быть обнаружены в очень низкой концентрации, потому что одна молекула фермента может катализировать множество реакций, при этом оставаясь стабильной. Таким образом, сигнал и, следовательно, чувствительность анализа увеличивается на несколько порядков в отличие от метки, которая производит только одно сигнальное событие. Чтобы стать репортёром, фермент ковалентно связывают с антителом или антигеном (в зависимости от формата анализа).

Чтобы соответствовать требованиям для использования в качестве метки, любой фермент должен выполнять еще несколько условий: доступность, устойчивость к химической модификации; стабильность при хранении, простота использования и отсутствие токсичности. Поиск ферментов, отвечающих этим требованиям, продолжается. В настоящее время люциферазы представляют интерес, потому что они имеют высокий квантовый выход биолюминесцентной реакции и, благодаря возможностям современных фотометров, их обнаружение возможно вплоть до аттомоля. Поэтому они

являются отличными репортёрами при использовании в большом разнообразии иммуноанализов.

В настоящее время среди биолюминесцентных белков наиболее известны те, которые получены из светлячков, морских бактерий, кишечнорастворимых и бесполовых ракообразных. Однако большинство люцифераз не обладают необходимыми свойствами для использования в качестве метки: некоторые из них нельзя искусственно синтезировать в рекомбинантных бактериальных клетках, некоторые теряют свою активность при хранении или химическом конъюгировании. Но  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемые фотопротеины светящихся морских кишечнорастворимых, такие как обелин и акворин, не имеют таких недостатков. Последовательности ДНК, кодирующие данные белки, были клонированы в клетки бактерий и экспрессированы с большим выходом белка. Рекомбинантные апопротеины эффективно активируются синтетическим целентеразином в условиях отсутствия кальция и в присутствии кислорода. Они всесторонне изучены относительно биохимических и биофизических свойств, третичной структуры, механизма биолюминесценции (механизм и характеристики биолюминесценции акворина и обелина представлены на рис.1.6). Эти знания наряду с возможностью получения практически неограниченного количества рекомбинантных белков служат основой для разработки уникальной биолюминесцентной детекционной системы, которая является «автономной», легко запускаемой, быстрой, высокочувствительной и безопасной [20].

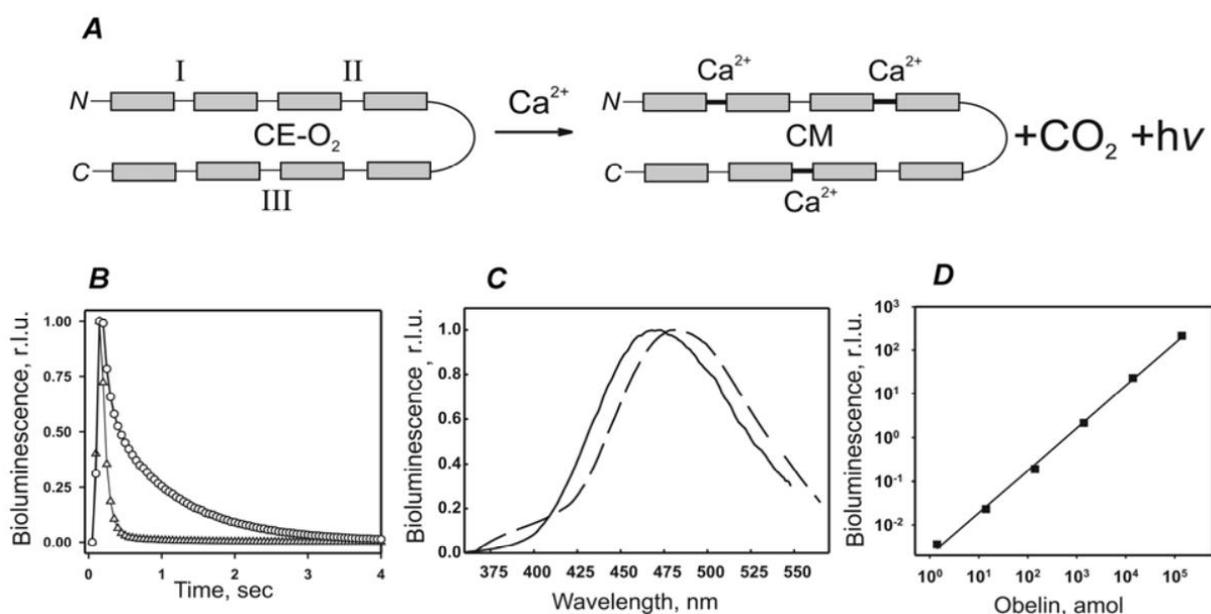


Рис.1.6. Биолуминесценция  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемых фотопротеинов. (А) Схема реакции: фотопротейн – комплекс из одноцепочечного полипептида, содержащего  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающие сайты (I, II, III) and предокисленный целентеразин ( $\text{CE-O}_2$ ). Связывание  $\text{Ca}^{2+}$  приводит к декарбоксилированию целентеразина с образованием стабильного комплекса полипептида, трёх ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и целентерамида (CM), при этом выделяется  $\text{CO}_2$  и квант света. (В) Кинетика биолуминесцентных сигналов акворина (-○-) и обелина (-Δ-). (С) Спектр биолуминесценции акворина (сплошная линия) и обелина (прерывистая линия). (D) Биолуминесценция в зависимости от количества обелина [Ошибка! Закладка не определена.]. r.l.u. – относительные световые единицы.

Чтобы использовать фотопротейн в иммуноанализе его необходимо связать с каким-либо биоспецифическим участником анализа. Это можно сделать через химическое конъюгирование. Однако при этом белок существенно теряет в активности, что уменьшает чувствительность анализа. Для решения данной проблемы был разработан другой метод – соединение генов биоспецифического белка и фотопротейна, что позволяет экспрессировать монолитный гибридный белок, обладающий

функциональными доменами родительских белков. Главная задача при конструировании гибридного белка - сохранить функции родительских белков. Распознаваемый элемент в гибридном белке может обладать универсальной биоспецифичностью (как, например, в случае системы биотин-стрептавидин, которая работает как мост между молекулами), или исключительной специфичностью (как, например, в случае взаимодействия антител с антигеном). Множество биолюминесцентных репортёров такого типа было разработано, и теперь они широко используются при проведении анализов *in vitro* и *in vivo* [21].

### **1.5 Коммерческие наборы для определения концентрации сурвивина в биологических образцах**

В настоящее время в продаже можно встретить несколько коммерческих наборов для определения концентрации сурвивина в образце, все они – не для клинического применения. Чаще всего встречаются стандартные Sandwich-ELISA наборы с колориметрическим типом определения концентрации (иностранные фирмы NovusBiologicals[22], Cloud-Clone corp[23], FineTest[24], Abcam[25]). Они устроены по типу метода авидин-биотинового комплекса (ABC-method)[26]. Механизм можно рассмотреть на примере набора Human Survivin ELISA SimpeStep Kit (Abcam). Схема представлена на рисунке 1.7.

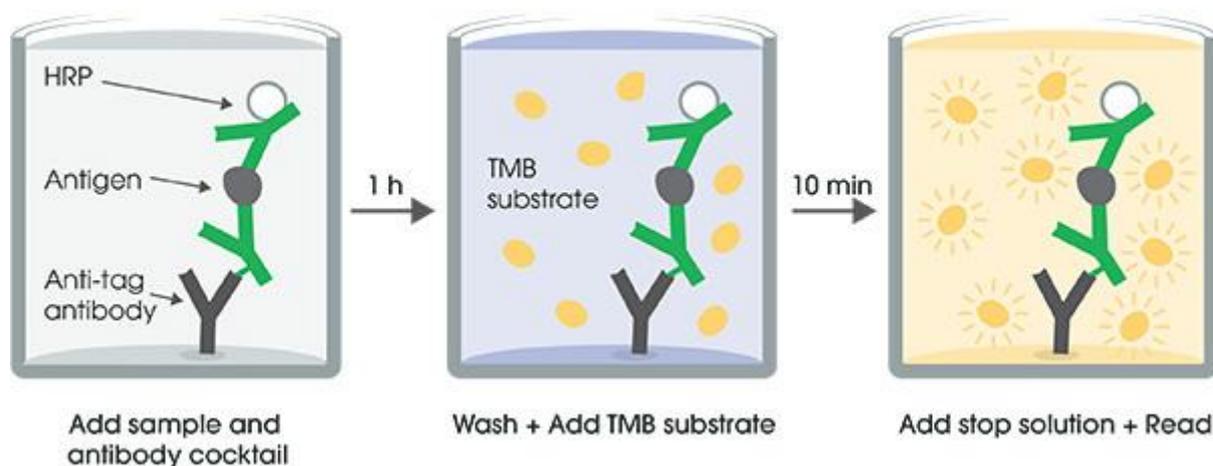


Рис.1.7. Схема проведения анализа Human Survivin ELISA SimpeStep Kit (Abcam) [25]

В планшет, покрытый универсальными моноклональными антителами (anti-tag antibody), добавляют смесь детектирующего и захватывающего антител вместе с образцом. Захватывающие антитела к сурвивину конъюгированы с аффинной меткой, к которой специфичны универсальные моноклональные антитела, что позволяет им прилипнуть к поверхности лунки планшета. Детектирующие антитела связаны через биотиновый мостик с гликопротеином авидином, имеющим 4 места для связывания с биотином. Через 3 оставшихся биотиновых мостика к авидину присоединена пероксидаза хрена, которая катализирует окисление хромогенного субстрата (тетраметилбензидин). После добавления в растворе образуются комплексы из антигена, захватывающего и детектирующего антител. Комплексы через аффинную метку захватывающего антитела связываются с антителами на поверхности лунки планшета.

После промывки в лунки планшета добавляют раствор с субстратом, который под воздействием пероксидазы окрашивается. По интенсивности окраски определяют концентрацию антигена. Определяемый диапазон концентраций для наборов такого типа в среднем 30-4000 пг/мл, предел чувствительности 2-20 пг/мл (пример калибровочного графика на рис.1.8).

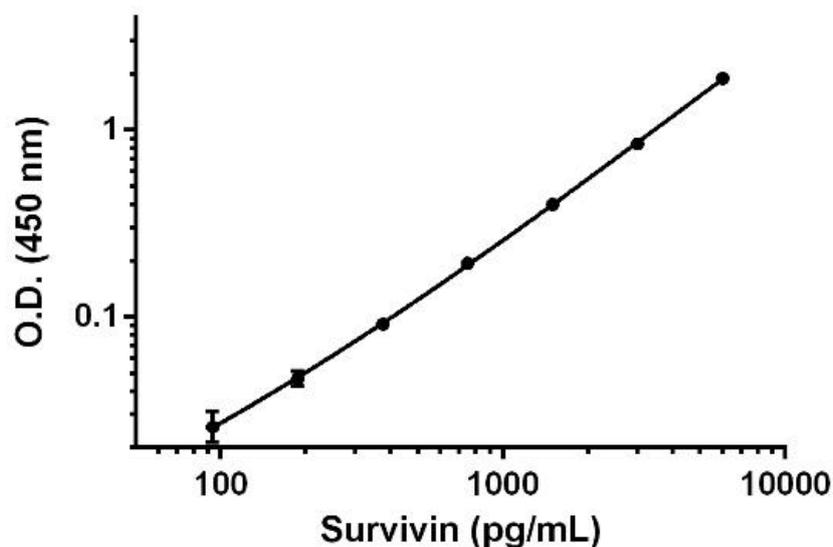


Рис.1.8. График зависимости оптической плотности от концентрации сурвивина для набора Human Survivin ELISA SimpeStep Kit (Abcam) [25]

Реже встречаются наборы с флуоресцентной меткой, например, набор фирмы ThermoFisher - Survivin Human ProcartaPlex [27]. Главным отличием от предыдущих наборов состоит в том, что здесь не используется поверхность лунки планшета, детектируемые комплексы образуются на поверхности магнитных шариков. Детектирующее антитело устроено по похожему принципу, только вместо авидина антитело связывается через биотиновый мостик со стрептавидином, конъюгированным с R-фикоэритрином (который и используется в качестве флуоресцентной метки). Диапазон определяемых концентраций данного набора 108-440000 пг/мл. Более высокий нижний диапазон определяемых концентраций компенсируется возможностью одновременного определения нескольких белков-мишеней.

В результате поиска в литературе не было обнаружено российских наборов для определения концентрации сурвивина в биологических образцах. Кроме того, все перечисленные ранее наборы предназначены только для исследовательских целей, поэтому разработка чувствительных наборов для определения сурвивина в настоящее время является актуальной задачей.

## 1.6 Полиморфизм промотора гена сурвивина

Однонуклеотидный полиморфизм (single-nucleotide polymorphism – SNP) – вариация нуклеотида в определённом положении, встречающаяся более чем у 1% популяции. Данный вид генетической изменчивости является самым распространённым, примерно на каждые 300 пар оснований встречается один нуклеотидный полиморфизм [28]. Были обнаружены миллионы SNP у человека, однако большинство из них расположены в некодирующих областях генома. Такие полиморфизмы не имеют фенотипических проявлений, но всё же используются, например, для изучения структуры генома [29]. Однако наибольший интерес представляют SNP в кодирующих и регуляторных областях, было проведено множество исследований по поиску ассоциаций между SNP и различными заболеваниями.

Так, SNP в промоторной области различных генов способны могут значительно влиять на транскрипционную активность гена. Например, мутантная аллель полиморфизма -330 промотора интерлейкина 2 (rs2069762) повышает уровень транскрипции гена в 2-3 раза, и также была показана её связь с более высоким риском возникновения рассеянного склероза [30,31].

Похожий полиморфизм, -31 G/C (rs9904341), существует и в промоторной области гена сурвивина (BIRC5). Сообщается, что данный полиморфизм расположен в области сайта CDE/CHR (cell cycle-dependent element) с которым связывается репрессор, подавляющий транскрипцию гена сурвивина когда клетка не делится. Мутантный аллель нарушает связывание сайта с репрессором, что приводит к сверхэкспрессии сурвивина. Большое количество сурвивина нарушает нормальные пути апоптоза клетки, что приводит к накоплению мутировавших клеток, и, как следствие, появлению опухоли и её быстрому прогрессированию [32].

Влияние полиморфизма rs9904341 на экспрессию сурвивина определяет его влияние на генетическую предрасположенность к раку, его течению и

рецидивам. Было проведено множество исследований, по поиску ассоциаций между этим полиморфизмом и различными типами рака. Обнаружена связь между генотипом CC и повышенным возникновением рака толстой кишки, желудка, уротелия [33].

Также было выявлено различное распределение аллелей и степени ассоциации мутантного аллеля с риском рака для разных этнических групп. Так, в азиатских популяциях мутантная аллель встречается намного чаще (0,48), нежели в европейских (0,36). Помимо этого, связь между мутантным аллелем и риском развития рака намного более явная (Таблица 2).

Таблица 2 – Ассоциация риска возникновения раков мочевыделительной системы с мутантным аллелем полиморфизма rs9904341 [34]

	CC vs GG		GC vs GG	
	ОШ	p-значение	ОШ	p-значение
Тип рака				
Рак мочевого пузыря	1.77	0.004	0.97	0.853
Почечно-клеточный рак	1.42	0.008	0.85	0.579
Рак простаты	1.65	<0.001	1.37	0.008
Этническая принадлежность				
Азиаты	2.02	<0.001	1.26	0.112
Европейцы	1.54	0.045	0.97	0.953

В отношении рака мочевого пузыря для азиатских популяций показана связь носительства аллели C с повышенным риском рака мочевого пузыря [35, 36]. Однако для европейцев данные о связи аллельного состава с риском РМП весьма немногочисленны. Единственное исследование на эту тему, проведенное в Европе (Сербия), обнаружило эффект повышенного риска уротелиального рака для носителей GG генотипа [37]. Для других типов рака у европейской популяции аллель C был связан с защитой против рака полости

рта, рака лёгких и опухоли Вильмаса, а для таких типов рака, как гепатоцеллюлярная карцинома, карцинома пищевода, рак кожи и рак шейки матки ассоциаций вообще не было выявлено.

### **1.7 Выявление однонуклеотидных полиморфизмов**

Начальным этапом большинства методов генотипирования однонуклеотидных полиморфизмов является амплификация участка гена, содержащего исследуемый SNP. После проведения ПЦР существует 4 метода для определения аллеля [38]:

- Гибридизация с аллель-специфическими олигонуклеотидными (Allele-Specific Oligonucleotide – ASO) зондами в определённых условиях (температура, ионная сила, органические растворители), в которых зонд связывается только с полностью комплементарным ему аллелем;
- Реакция лигирования олигонуклеотидов (oligonucleotide ligation reaction - OLR), в которой целевая ДНК гибридизируется с двумя олигонуклеотидами: аллель-специфическим зондом который имеет специфичный 3'- или 5'-нуклеотид, и общим, который связывается рядом с полиморфизмом. ДНК-лигаза соединит олигонуклеотиды только в том случае, если они полностью комплементарны целевой последовательности.
- Реакция инвазивного расщепления (Invasive cleavage reaction), при которой используются аллель-специфические зонды, содержащие «метку» на 5'-конце, состоящую из нуклеотидов не комплементарных мишени. Зонд-захватчик гибридизуется с меткой 5' полиморфного сайта, и если они полностью комплементарны, фермент распознает образовавшуюся перекрывающуюся структуру и расщепляет 5'-сегмент аллель-специфического зонда.
- Реакция удлинения праймера (Primer extension - PEХТ), которая основана на использовании высокоточной ДНК-полимеразы (схема на рис.1.9). В

типичной реакции РЕХТ аллель-специфический праймер, 3'-конец которого комплементарен нуклеотиду в полиморфном сайте, гибридизуется с исследуемым фрагментом. Из-за высокой точности полимеразы удлинение цепи будет происходить только в случае, если праймер в точности соответствует ДНК-мишени. Для каждого SNP проводят две РЕХТ-реакции: одну для нормального варианта аллели, другую для мутантного.

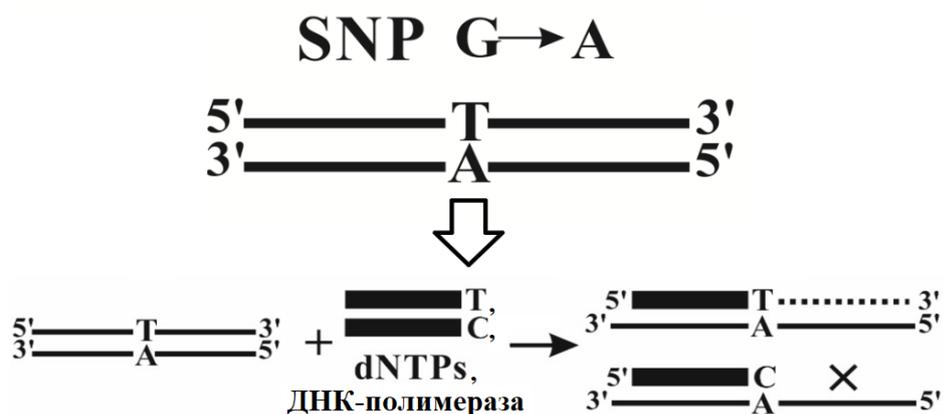


Рис.1.9. Реакция дискриминации аллеля на основе удлинения аллель-специфического праймера – РЕХТ реакция [39]

В лаборатории фотобиологии ИБФ СО РАН успешно разработан и применён метод выявления однонуклеотидных полиморфизмов, названный «РЕД-Биолюм». Он основан на проведении РЕХТ-реакции, выявление продуктов которой осуществляют цветными биолюминесцентными метками на основе кальций-зависимых фотопротеинов.[40]. Метод основывается на использовании двух рекомбинантных вариантах фотопротеина обелина: W92F,H22E, испускающий быстрый сигнал, сдвинутый в коротковолновую область ( $\lambda_{\max} = 387$  нм), и Y138F с медленным сигналом, сдвинутым в длинноволновую область ( $\lambda_{\max} = 493$  нм) [41]. Данные различия в цвете и кинетике биолюминесценции позволили разделить их с помощью широкополосных оптических фильтров и временного разрешения (рис. 1.10).

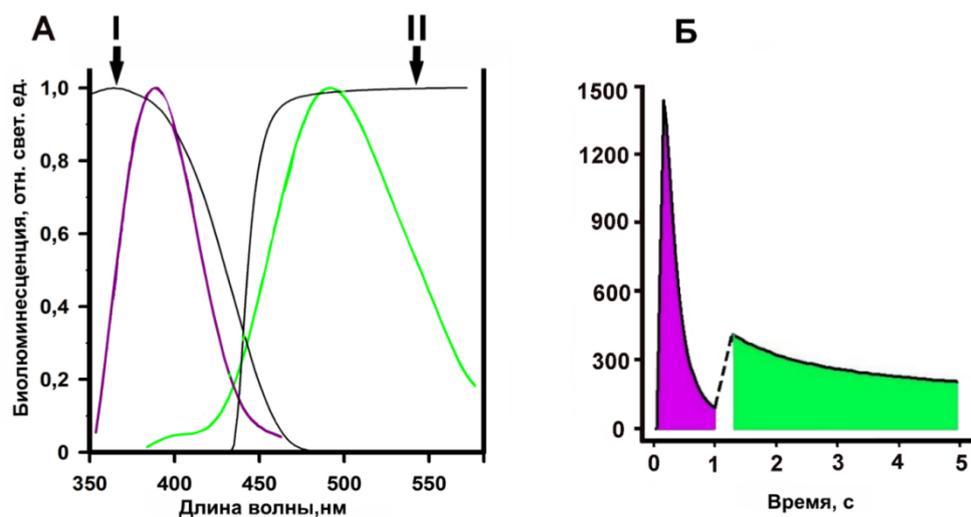


Рис.1.10 – А: Спектры билюминесценции обелина с заменами W92F, H22E и Y138F (фиолетовая и зеленая линии), I – спектр пропускания оптического фильтра ФС6, II – спектр пропускания оптического фильтра ЖС16; Б: Билюминесцентный сигнал смеси обелиновых мутантов, записанный через фильтр I - быстрый сигнал фиолетового мутанта и фильтр II - медленный сигнал зеленого мутанта [39]

Данный метод успешно использовался для обнаружения мутации Лейдена и генотипирования полиморфизмов ассоциированных с нейросенсорной тугоухостью, меланомой и нарушениями гемостаза [42,43].

## 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Вещества и реактивы

Таблица 3 – Состав буферных растворов и сред, используемых в работе

Название	Состав
SOC-среда	20 г/л бакто-триптона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 0,6 г/л NaCl, 2,5 мМ KCl, 10 мМ MgCl <sub>2</sub> , 10 мМ MgSO <sub>4</sub> pH 7,0 + 20 мМ глюкозы
LB-среда	20 г/л бакто-триптона, 10 г/л дрожжевого экстракта, 5-7 г/л NaCl, pH 7,4
LB-агар	1,5% агара в LB-среде
Буфер А	6 М мочевины, 20 мМ Tris-HCl, 5 мМ CaCl <sub>2</sub>
Буфер Б	0-1 М ацетата натрия в буфере А
Буфер Т	20 мМ Tris-HCl pH 7,0
Буфер ТЕ	Буфер Т + 5 мМ ЭДТА
Кальциевый буфер	0,1 М CaCl <sub>2</sub> , 0,1 М Tris-HCl pH 8,8
Промывочный буфер	PBS, 0,1% Tween 20, 5 мМ ЭДТА
Буфер PBS 7,5	0,1 М Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,1 М K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,15 М NaCl
Буфер TGB	25 мМ Tris-base, 250 мМ глицин, 0,1% SDS
Гибридизационный буфер	0,1 М MAB, 5 мМ ЭДТА, 1% БСА
Буфер для меток	20 мМ Tris-HCl pH 7,0; 5 мМ ЭДТА, 0,1 М NaCl, 0.1% БСА

Реактивы, использованные для проведения исследования: бычий сывороточный альбумин (Sigma-Aldrich, США), агароза LE, изопропил-β-D-тиогалактопиранозид (ИПТГ) (ДИА-М, Россия), бактотриптон (Panreac, Испания), Tris base, мочевины, ЭДТА-натриевая соль, кальций хлорид (Sigma-Aldrich, США), агар бактериологический (ДИА-М, Россия), дрожжевой экстракт (Медиген, Россия). Антитела к сурвивину (AbSurv) получены от фирм

Abcam (Великобритания), Novus Biologicals (США) и CloudClone (США). Для проведения белкового электрофореза использовали персульфат аммония, додецилсульфат натрия, стандартные смеси белков для электрофореза (Abcam, Великобритания), акриламид, бис-акриламид (Медиген, Россия), ТЕМЕД (Helicon, Россия). Контрольные сыворотка и моча получены от компании «Вектор-Бест» (Россия).

Последовательность гена, кодирующего сурвивин, оптимизированная для бактериальной экспрессии была синтезирована и клонирована в вектор pMALc5x (NEB, Великобритания) фирмой Евроген, Россия.

## **2.2 Выявление полиморфизма в гене промотора сурвивина**

### **2.2.1 Выделение геномной ДНК**

Образцы венозной крови брали у больных раком мочевого пузыря, зарегистрированных в канцер-регистре Красноярского краевого клинического онкологического диспансера им. А.И. Крыжановского. Сбор материала проводился сотрудниками диспансера. При сборе материала получено информированное согласие от каждого участника.

ДНК выделяли колоночным методом набором «ExtractDNA Blood» (Евроген, Россия), концентрацию выделенной ДНК определяли спектрофотометрически на приборе NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, США).

### **2.2.2 ПЦР-амплификация фрагмента гена**

Участок гена BIRC5 содержащий полиморфизм rs9904341 длиной 171 п.о., синтезировали ПЦР с использованием образца геномной ДНК человека. 25 мкл реакционной смеси содержали 5 ед. акт. ДНК-полимеразы Hot Start Taq (Евроген, Россия), 1-кратный Taq-буфер (Евроген, Россия), 0,2 mM каждого dNTP (СибЭнзимб Россия), и по 0,4  $\mu$ M следующих праймеров (Биосан,

Россия): Up праймер — 5'-GAAGGCCGCGGGGGGTGGACC-3'; Dn праймер — 5'-GCGGTGGTCCTTGAGAAAGGGCTGCC-3'. ПЦР проводили на амплификаторе MJ Mini («Bio-Rad», США) по следующей программе: 95°C в течение 5 мин; 30 циклов (95°C – 30 сек, 66°C – 30 сек, 72°C – 40 сек); 72°C в течение 10 мин.

Концентрацию продуктов ПЦР определяли по электрофореграмме с источником тока Electrophoresis Power Supply – EPS 3501 XL («Amersham pharmacia biotech», Великобритания) в камере для горизонтального электрофореза («Bio-Rad», США) с 1-кратным TAE буфером (таблица 3) в 2% агарозном геле, окрашенном этидием бромидом, с помощью программного обеспечения Alpha Easy™ («Alpha Innotech Co», США), в качестве калибровочных маркеров использовали ДНК-маркер 100+50 kb DNA (СибЭнзим, Россия).

### **2.2.3 PEXТ-реакция и биолюминесцентный анализ её продуктов**

А) PEXТ- реакция (реакция удлинения аллель-специфического праймера)

ПЦР-продукт наработки матриц, содержащих исследуемый полиморфизм, использовали напрямую без очистки в PEXТ-реакции. PEXТ-реакция проводилась одновременно с двумя праймерами комплементарных мутантному и нормальному варианту аллели. Общий объём смеси – 20 мкл. Состав: 1x буфер SNPdetect (Евроген, Россия), 2,5 μМ AGC, 2,5 μМ Bio-dUTP (Биосан, Россия), по 1 пикомолю праймеров: добавить PEXТ N — 5'-FAM-CCATTAACCGCCAGATTTGAATCGCG-3', PEXТ M — 5'-(A)27-CCATTAACCGCCAGATTTGAATCGCC-3', 2 единицы активности полимеразы SNPdetect (Евроген, Россия) и 0,5 мкл матрицы. Программа амплификатора: 95°C - 5 мин; 3 цикла (95°C – 15 сек, 60°C – 15 сек, 72°C – 15 сек); 95°C - 5 мин.

Б) Биолюминесцентный анализ продуктов PEXТ

На поверхность лунки стрипового планшета (Costar, США) сорбировали стрептавидин, путём внесения 75 мкл раствора с концентрацией 10 мкг/мл в PBS буфере в каждую лунку. Инкубировали со встряхиванием (350 об/мин) 1 час при 37°C и промывали промывочным буфером 4 раза. Затем в лунки добавляли гибридизационный буфер (таблица 3) объёмом 47 мкл, после чего вносили по 3 мкл PEХТ-продукта. Контрольные лунки содержали 50 мкл гибридизационного буфера без PEХТ-продуктов. Инкубировали со встряхиванием при комнатной температуре в течение 30 минут.

После промывки планшета в лунки добавили по 50 мкл раствора конъюгатов цветных обелинов с анти-FAM антителами и олиготимидилатом. Инкубировали со встряхиванием при комнатной температуре в течении 30 минут, промывали как описано ранее. Биолюминесценцию сформированных на поверхности комплексов измеряли с помощью планшетного люминометра Mithras LB 940 Multimode Reader (Berthold, Германия), снабженного высокоскоростным автоматическим инжектором, сразу после впрыскивания 70 мкл кальциевого буфера. Разделение полученных сигналов во времени осуществляли при помощи широкополосных оптических фильтров ФС (ЛенЗОС, Россия) для фиолетового сигнала и ЖС17 (ЛенЗОС, Россия) для зелёного. Фиолетовый сигнал регистрировали в течение первой секунды анализа, зелёный в течение трёх следующих секунд. Определение генотипа проводили по значению дискриминационного фактора (Д), который определяется как отношение зелёного сигнала (регистрирует наличие нормального аллеля) к фиолетовому (регистрирует наличие мутантного аллеля).

## 2.3 Получение компонентов необходимых для разработки аналитической системы по выявлению сурвивина

### 2.3.1 Получение генетической конструкции, кодирующей гибридный белок сурвивин-обелин

ДНК-вставку, содержащую ген сурвивина получали ПЦР синтезом, где в качестве матрицы использовали плазмиду pMAL-c5X-сурвивин.

Праймеры содержали сайты рестрикции NcoI (ведущий 5'-GCACCATGGGGTGCACCGACCCCTCCG-3') и XhoI (обратный GCACTCGAGGTCCATCGCTGCCAGCTG). Амплификацию проводили с использованием PfuSE ДНК полимеразы (СибЭнзим, Россия) в условиях: предварительная денатурация – 1 мин при 95°C; 25 циклов – 20 с при 95°C, 30 с при 66°C, 1 мин при 72°C; заключительная стадия – 7 мин при 72°C.

Продукт амплификации расщепляли ферментами рестрикции Bsp19I (СибЭнзим, Россия) и XhoI (NEB, США) согласно рекомендациям производителя, в течение 2 ч при 37°C.

ДНК-вставку, кодирующую ген апообелина и получали ПЦР синтезом, где в качестве матрицы использовали плазмиду pET22b-Mia-OL. Праймеры: кодирующий линкер ENLYFQGT и содержащий сайт рестрикции XhoI (ведущий 5'-CAGCTCGAGGAAAACCTGTATTTTCAGGGTACCGCTTCAAAATACG-3') и BamHI (обратный TTCGGATCCTTAGGGAACTCCGTTGCCAT).

Амплификацию проводили с использованием PfuSE ДНК полимеразы (СибЭнзим, Россия) в условиях: предварительная денатурация – 1 мин при 95°C; 25 циклов – 20 с при 95°C, 30 с при 60°C, 1 мин при 72°C; заключительная стадия – 7 мин при 72°C. Продукт амплификации расщепляли ферментами рестрикции XhoI (NEB, США) и BamHI (СибЭнзим, Россия) согласно рекомендациям производителя, в течение 2 ч при 37°C.

ДНК векторной плазмиды pET19b (Novagene, США) обработали ферментами рестрикции Bsp19I и BamHI аналогично, после чего дефосфорилировали с помощью щелочной фосфатазы CIP (NEB, США). ПЦР-фрагмент и линейаризованный вектор очищали электрофоретически и проводили лигирование. Полученной лигазной смесью трансформировали клетки *E. coli* XL1Blue. Клоны, содержащие вставку нужного размера, отбирали с помощью ПЦР. Последовательность полученной ДНК pET19b-Surv-O1 подтверждали секвенированием (ЦКП «Геномика» СО РАН (Новосибирск, Россия).

### **2.3.2 Трансформация компетентных клеток *E. coli* XL1-Blue плазмидной ДНК и ПЦР-скрининг колоний**

К суспензии компетентных клеток *E. coli* XL1-Blue (45 мкл) добавили 5 мкл раствора смеси плазмид, инкубировали при 0°C в течение 30 мин, затем прогревали (42°C, 45 сек) и снова переносили на лед. Далее в пробирку добавляли 450 мкл среды SOC (таблица 3), инкубировали 1 час при 37°C, высевали на LB-агар (таблица 3), содержащий ампициллин (200 мкг/мл), и растили при 37°C.

Выросшие колонии отбирали и ресуспендировали в 20 мкл стерильной воды, одновременно пересевая в новую чашку, после чего инкубировали 10 мин при 95°C и центрифугировали (2 мин). Анализ размера вставок проводили ПЦР-скринингом, используя 8 мкл клеточной смеси, Taq ДНК-полимеразу, стандартные T7 праймеры. Условия ПЦР: 95°C в течение 1 мин; 20 циклов (95°C – 20 с, 56°C – 30 с, 72°C – 1 мин); 72°C в течение 7 мин. Концентрацию и молекулярный вес ПЦР-продуктов определяли электрофоретически в 1% агарозном геле вместе с 1 kb ДНК-маркером молекулярного веса.

### **2.3.3 Выделение плазмидной ДНК**

Колонии штамма *E. coli* XL1-Blue отдельно друг от друга засеивали в 10 мл LB среды с ампициллином в концентрации 200 мг/л, инкубацию осуществляли в течение суток при 37°C. Биомассу центрифугировали 10 мин при 8000 g, надосадочную жидкость удаляли. Набором GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, США) из клеток выделяли плазмидную ДНК, в соответствии с протоколом производителя. Методом агарозного геле-электрофореза в 1% геле определяли концентрацию ДНК, в качестве стандарта использовали 1kb ДНК-маркер молекулярного веса. Также концентрацию ДНК определяли спектрофотометрически на приборе NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, США).

Полученные нуклеотидные последовательности проверяли секвенированием в ЦКП «Геномика» СО РАН (Новосибирск, Россия).

### **2.3.4 Трансформация компетентных клеток *E. coli* BL21-CodonPlus плазмидной ДНК**

К суспензии компетентных клеток *E. coli* BL21(DE3) Codon Plus (RIPL) для (45 мкл) добавили 1 мкл раствора соответствующей плазмидной ДНК и инкубировали при 0°C в течение 30 мин. Затем суспензию прогревали при 42°C на водяной бане WB-4MS («Biosan», Латвия) в течение 30 сек и снова переносили на лед. Далее клетки обрабатывали, как описано выше для штамма XL1-Blue.

### **2.3.5 Культивирование рекомбинантных клеток *E. coli***

Рекомбинантные клетки RIPL трансформированные плазмидой pET19b – Surv и pET19b-Surv-O1 в 200 мл LB-среды, содержащей ампициллин (200 мг/л), культивировали с активным перемешиванием при 37°C до плотности равной

0,6 при длине волны 590 нм (ОП<sub>590</sub>). Индукцию синтеза белков проводили добавлением ИРТГ (1 мМ), культивировали еще в течение 3-х часов, а после осаждали клетки центрифугированием (4000 g, 20 мин, 4°C).

Плазмида pET19b-Surv, несущая ген сурвивина, сконструирована сотрудником лаборатории билюминесцентных и экологической технологий ИБФ СО РАН к.б.н. Башмаковой Е.Е.

### **2.3.6 Экстракция и очистка рекомбинантных белков**

После центрифугирования супернатант отбрасывали, а полученную клеточную массу ресуспендировали в пятикратном (к весу) объеме буфера Т (таблица 3) и разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора УЗДН-2Т («Академприбор», Украина) 8 раз по 20 сек на льду.

Полученную смесь центрифугировали (3500g, 15 мин, 4°C) и осадок промывали, ресуспендируя последовательно буфером Т, содержащим: 0,9% NaCl; 0,1% Тритон Х-100; 5 мМ CaCl<sub>2</sub>. Полученный в результате осадок ресуспендировали в 5 кратном объеме 6М мочевины, содержащей 20 мМ Tris-HCl pH 7,0 и 5 мМ CaCl<sub>2</sub>, и оставили растворяться в течении 12 часов.

Растворённые тельца включения ещё раз центрифугировали (6000 g, 10 мин, 4°C) и нанесли на колонку DEAE-Sepharose (5 мл), уравновешенную буфером А и хроматографировали с помощью системы BioLogic LP (Bio-Rad). Белки с колонки элюировали плавным градиентом буфера В (0-90%) (таблица 3). Фракцию, содержащую наибольшее количество целевого белка отобрали. После этого этапа дальнейшая обработка для сурвивина и гибридного белка сурвивин-обелин была разной:

- 1) Для сурвивина: фракцию, содержащую наибольшее количество сурвивина, сконцентрировали в несколько раз центрифугированием (4000 g, 15 мин., 4°C) на ячейках Amicon Ultra-4 10K Centrifugal Filter Devices (Merck, Германия). Для определения концентрации из фракции отобрали аликвоту (500

мкл) в которой удаляли мочевины с помощью гель-фильтрации на колонке HiTrap Desalting Columns, уравновешенной буфером T (таблица 3) на хроматографической системе АКТА purifier (GE Healthcare, Великобритания). Концентрацию белка измеряли спектрофотометрически по методу Лоури с использованием набора DC Protein Assay (Bio-Rad, США), полученное значение корректировали с учётом разведения при обессоливании

2) Для гибрида сурвивин-обелин: активность полученных фракций измеряли на кюветном люминометре (модель БЛМ 8802, СКБ Наука, Красноярск). Измерения проводили в 0,1 М Tris-HCl pH 8,8, содержащем 10 мМ ЭДТА, сразу после добавления кальциевого буфера. Концентрацию белка определяли описанным ранее способом. Оставшуюся часть фракции активировали целентеразином.

### **2.3.7 Активация обелинового домена гибридного белка целентеразином**

Активацию проводили 1,2-кратным молярным избытком целентеразина в десятикратном объеме буфера TE (таблица 3), содержащем 10 мМ ДТТ, при 4°C в течение суток.

Активированные фотопротеины отделяли от незаряженных апобелков с помощью ионообменной хроматографии с использованием колонки Mono Q HP (5 мл) на хроматографической системе АКТА purifier (GE Healthcare, Великобритания). Элюцию белков с колонки проводили градиентом NaCl (0-1М) в буфере TE по следующей программе: 0-55 мл – буфер TE (нанесение образца и элюирование примесей слабо ионного характера), 55-75 мл – градиент 1М NaCl в буфере TE от 0 до 100% (элюция белка), 75-80 мл – 1М NaCl в буфере TE и 80-85 мл (очистка колонки).

### **2.3.8 Химический синтез конъюгата AbSurv-Обелин**

Антитела к сурвивину (Abscam) модифицировали 70-кратным молярным избытком SMCC, растворенном в диметилсульфоксиде (2 ч при комнатной температуре в 50 mM VICINE pH 8,5; 5mM ЭДТА).

Избытки всех реагентов отделяли гель-фильтрацией на колонке HiTrap Desalting Columns (GE Healthcare, Великобритания), уравновешенной буфером TE.

SMCC-активированный иммуноглобулин и заряженный обелин смешивали в молярном соотношении 1:20 и инкубировали при 4°C в течение ночи. Полученный конъюгат выделяли гель-фильтрацией на колонке Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare, Великобритания), уравновешенной буфером TE с добавлением 150 mM NaCl.

### **2.4 Электрофорез белковых молекул в полиакриламидном геле**

Белковый электрофорез проводили в 12,5% полиакриламидном геле (ПААГ), содержащем 0,1% SDS, по методу Лэммли [44] с использованием камеры (Corning, США) в буфере TGB (таблица 3) и с постоянной подачей тока 15 mA. Денатурированные образцы готовили с использованием лизирующего буфера (0,1 M Tris, pH 7,0, 3% SDS, 10% глицерол, 0,05% бромфеноловый синий), кипятили в течение 5 мин и наносили на гель.

Для окрашивания гелей использовали раствор Coomassie G-250 (Bio-Rad, США) в смеси 7,5% уксусной кислоты в 50% этаноле с последующей промывкой дистиллированной водой. Съемку гелей при естественном освещении осуществляли в камере AlphaImager (AlphaInnotech, США).

## **2.5 Сравнительный биолюминесцентный твердофазный анализ рекомбинантных сурвивинов**

В лунки стрипового планшета (Costar, США) вносили по 50 мкл последовательных разведений сурвивина (от 2,3 нг/мл до 150 нг/мл) в двух повторах. Параллельно в лунки вносили коммерческий фьюз сурвивина с кальмодулином аналогичным образом. В контрольную лунку вносили 50 мкл буфера Т. Инкубировали при 37°C в течении 1 часа со встряхиванием (350 об/мин), и промывали 5 раз промывочным буфером (таблица 3). Для забивки свободной поверхности в лунки вносили по 150 мкл 1% раствора БСА в буфере PBS 7,5. Инкубацию и промывку проводили так же, как и после предыдущего шага. После в лунки внесли по 50 мкл раствора антител к сурвивину с концентрацией 1 мкг/мл. Проинкубировали как описано выше и промыли. В качестве метки использовали proZZ-обелин, добавив его в каждую лунку 0,1 мкг/мл по 50 мкл.

Биолюминесценцию сформированных на поверхности комплексов измеряли с помощью планшетного люминометра Mithras LB 940 Multimode Reader (Berthold, Германия), снабженного высокоскоростным автоматическим инжектором, сразу после впрыскивания 60 мкл кальциевого буфера. Время экспозиции 5 секунд. В результатах учитывали полученное усреднённое значение биолюминесцентного сигнала (2 повтора).

## **2.6 Модельный биолюминесцентный твердофазный анализ конкурентного и «сэндвич» формата**

### **А) Конкурентный вариант анализа**

В лунки стрипового планшета (Costar, США) вносили по 100 мкл раствора антител к сурвивину (Novus) в буфере PBS 7,5 с концентрацией 0,5 мкг/мл. Сорбция проводилась в течение суток при 4°C без встряхивания. После сорбции планшет 4 раза промыли промывочным буфером.

Для забивки свободной поверхности в лунки вносили по 150 мкл 1% раствора БСА в буфере PBS 7,5. Инкубацию и промывку проводили так же, как и после предыдущего шага. Далее в лунки планшета вносили смесь, состоящую из растворов сурвивина в буфере, контрольной моче и сыворотке разных концентраций и гибридного белка сурвивин-обелин в одинаковой концентрации. При этом конечная концентрация сурвивина была в диапазоне от 54 нг/мл до 0,2 нг/мл, а конечная концентрация гибридного белка во всех лунках составляла 1 нг/мл. После инкубировали при комнатной температуре 1 час, со встряхиванием (400 об/мин). Промыли как описано ранее.

Биолюминесценцию сформированных на поверхности комплексов измеряли как описано ранее. Впрыск кальциевого буфера по 100 мкл. Время экспозиции 5 секунд. В результатах учитывали полученное усреднённое значение биолюминесцентного сигнала (3 повтора), деленное на усредненный сигнал от нулевых лунок, содержащих вместо сурвивина равный объем буфера.

#### Б) Сэндвич формат анализа

В лунки стрипового планшета (Costar, США) вносили по 100 мкл раствора антител к сурвивину (CloudClone) в буфере PBS 7,5 с концентрацией 3 мкг/мл. Сорбция проводилась в течение суток при 4°C без встряхивания. После сорбции планшет 4 раза промыли промывочным буфером.

Для забивки свободной поверхности в лунки вносили по 150 мкл 1% раствора БСА в буфере PBS 7,5. Инкубацию и промывку проводили так же, как и после предыдущего шага. Далее в лунки планшета вносили растворы разных концентраций сурвивина в контрольной моче (Вектор) по 100 мкл. Диапазон концентраций составлял от 7,5 нг/мл до 0,2 нг/мл. После инкубировали при комнатной температуре 2 часа, со встряхиванием (400 об/мин). Промыли как описано ранее. Затем внесли раствор конъюгата AbSurv-обелин с активностью 1 mU/5 мкл по 100 мкл. Инкубировали 1 час при комнатной температуре, промыли как описано ранее.

Биолюминесценцию сформированных на поверхности комплексов измеряли как описано ранее для конкурентного формата анализа. В результатах учитывали полученное усреднённое значение биолюминесцентного сигнала (3 повтора) с вычетом усредненного сигнала от нулевых лунок, содержащих раствор контрольной мочи без сурвивина.

## **2.7 Статистическая обработка результатов**

Данные обрабатывали с использованием программного пакета Microsoft Excel для Windows 10 и статистического программного обеспечения MedCalc (MedCalc Software Ltd, Бельгия). Для сравнения количественных данных использовался U-тест Манна-Уитни. Критерий  $\chi^2$  Пирсона использовался для сравнения частот вариантов генов среди экспериментальной и контрольной групп. При расчетах учитывался уровень значимости  $p < 0,05$ . Степень взаимосвязи между носительством аллелей полиморфизма и риском возникновения РМП оценивалась по отношению шансов (ОШ) с 95%-ным доверительным интервалом (ДИ), при этом значения уровня значимости  $p < 0,05$  считались значимыми.

### **3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

С 43 по 83 страницы изъяты в связи с авторскими правами

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Доля рака мочевого пузыря (РМП) составляет 3-5% всех злокачественных новообразований и около 40% от опухолевых заболеваний мочеполовой системы [63]. Стандартные методы диагностики РМП – дорогие и инвазивные, с низкой чувствительностью для опухолей на ранних стадиях. В связи с этим требуется разработка новых методов скрининга РМП, лишённых данных недостатков. Принимая во внимание сложность и неоднозначность процессов онкогенеза, можно предположить, что наиболее успешным будет интегративный подход, сочетающий клинико-морфологические и молекулярно-генетические параметры. Поэтому поиск чувствительных онкомаркеров в настоящее время является актуальной задачей современной биотехнологии и биомедицины.

Сурвивин является перспективным онкомаркером, а полиморфизмы его гена могут использоваться в качестве генетических предикторов возникновения и течения рака мочевого пузыря.

Данная работа посвящена оценке значимости онкомаркера сурвивина для диагностики рака мочевого пузыря. В результате проведенного исследования были получены следующие результаты:

1. Установлены оптимальные условия проведения ПЦР для синтеза целевых матриц, содержащих исследуемый полиморфизм. Оптимизированы условия биолюминесцентного анализа по его выявлению.
2. Проанализирован 361 клинический образец ДНК, определён генотип 260 пациентов с диагнозом РМП и 121 здоровых добровольцев. Статистический анализ полученных результатов выявил, что генотип СС реже встречается среди больных мышечно-инвазивным раком мочевого пузыря: риск развития данного заболевания у носителей генотипа СС снижен в 3 раза (ОШ (95%ДИ): 3.15 (1.14-8.74),  $p < 0,03$ );

3. Предложен дизайн билюминесцентного иммуноанализа в конкурентном и «сэндвич» формате для выявления онкомаркера сурвивина. Получены все необходимые составляющие аналитической системы: рекомбинантный сурвивин, гибридный белок сурвивин-обелин, химический конъюгат антитела к сурвивину и обелина. Определены условия проведения анализа;
4. На модельных образцах показано, что с помощью билюминесцентного иммуноанализа возможно выявление сурвивина в диапазоне концентраций от 0,2 до 54 нг/мл. Анализ клинических образцов мочи без предварительной пробоподготовки конкурентным вариантом метода показывает ложноположительные результаты из-за неспецифичной («чужой») конкуренции элементов мочи. Билюминесцентный анализ сэндвич типа не обладает достаточной чувствительностью;
5. Определена концентрация сурвивина в клинических образцах мочи (44 образца) колориметрическим иммуноанализом с помощью коммерчески доступного набора (RnD Systems Survivin ELISA Kit). Из 32 образцов с подтверждённым диагнозом рак мочевого пузыря, у 22 образцов значение сурвивина превысило пороговый (>10 пг/мл). Чувствительность сурвивина как онкомаркера составила 69%.

Из полученных результатов были сделаны следующие выводы:

1. Результаты генотипирования полиморфизма в промоторной области гена сурвивина -31G/C (rs9904341) в клинических образцах ДНК свидетельствуют о предикторной значимости этого полиморфизма: генотип СС обладает протекторным эффектом в отношении мышечно-инвазивного рака мочевого пузыря (МИРМП).
2. Выявленные повышенные концентрации сурвивина в моче пациентов, страдающих РМП указывают на возможность использования этого показателя при диагностике и мониторинге заболевания, а также на необходимость разработки отечественной высокочувствительной

аналитической системы для его выявления.

Выражаю глубокую благодарность своему научному руководителю доктору биологических наук Франк Людмиле Алексеевне и своему консультанту кандидату биологических наук Башмаковой Евгении Евгеньевне, а также моим коллегам из лаборатории биолюминесцентных и экологических технологий ИБФ СО РАН за помощь в постановке и проведении экспериментов, интерес к работе и обсуждение полученных результатов.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

РМП – рак мочевого пузыря

НМИРМП – неинвазивно-мышечный рак мочевого пузыря

МИРМП – инвазивно-мышечный рак мочевого пузыря

IAP – группа белков-ингибиторов апоптоза

BIR – бакуловирусный IAP повтор (BIR)

INCENP – inner centromere protein, внутренний белок центромеры

CPC – chromosomal passenger complex, комплекс белков-хромосомных пассажиров

HVXIP – hepatitis B X-interacting protein

XIAP – X-linked inhibitor of apoptosis protein

VEGF – vascular endothelial growth factor, ростовой фактор эндотелия сосудов

SDM – site directed mutagenesis, сайт-направленный мутагенез

LB-среда (Lysogeny broth)

SOC-среда (Super Optimal broth with Catabolic repressor)

ИПТГ – изопропил-  $\beta$ -D-тиогалактопиранозид

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

OL – обелин

БСА – бычий сывороточный альбумин

ДТТ – дитиотреитол

SNP – однонуклеотидный полиморфизм

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РЕХТ – реакция удлинения праймера

dNTP – дезоксинуклеозидтрифосфат

Bio-dUTP – 5-[N-(N-биотинил-  $\epsilon$ -аминокапроил)-3-аминоаллил]-2'-дезоксиредин-5'-трифосфат

п.о. – пара нуклеотидных оснований

kb – килобаз

ab - антитело

FAМ – 6-карбоксифлуоресцеин

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

МАВ – малеиминовая кислота

ИФА – иммуноферментный анализ

pZZ-OL – гибридный белок обелина и домена В из белка А золотистого стафилококка

SH-OL – вариант обелина с уникальным остатком цистеина (А6С)

Surv - сурвивин

Surv-OL – гибридный белок сурвивин-обелин

ОШ – отношение шансов

ДИ – доверительный интервал

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Каприна А.Д, Старинский В.В, Петрова В.Г. Злокачественные новообразования в России в 2017 году // М.: МНИОИ им. П.А. Герцена, 2018, 250 С.
2. Shariat S.F [et al.] Urine detection of survivin is a sensitive marker for the noninvasive diagnosis of bladder cancer // J Urol – 2004, № 171(2 pt 1), P. 626-630
3. Xuefeng Li, Yaming Wang, Jianjun Xu [et al.] Sandwich ELISA for detecting urinary Survivin in bladder cancer // Chinese Journal of Cancer Research – 2013, № 25(4), P.375-381
4. Sharma S. (2009). Tumor markers in clinical practice: General principles and guidelines. Indian journal of medical and paediatric oncology // Official journal of Indian Society of Medical & Paediatric Oncology – 2009; 30(1), P. 1–8.
5. Wang X, Huang L, Xu Y [et al.] Association between survivin -31G > C promoter polymorphism and cancer risk: a meta-analysis // Eur J Hum Genet – 2012 №20(7), P.790-5.
6. Laurent Chantalat, Dimitrios A. Skoufias [et al.] Crystal Structure of Human Survivin Reveals a Bow Tie–Shaped Dimer with Two Unusual  $\alpha$ -Helical Extensions // Molecular Cell – 2000, № 6(1), P. 183-189
7. V. Margulis, Y. Lotan [et al.] Survivin: a promising biomarker for detection and prognosis of bladder cancer // World J Urol – 2008, № 26(1), P.59-65
8. Alain C. Mita, Monica M. Mita [et al.] Survivin: Key Regulator of Mitosis and Apoptosis and Novel Target for Cancer Therapeutics // Clin Cancer Res – 2008, № 14(16), P. 5000-5005
9. Mar Carmena, Michael Wheelock [et al.] The Chromosomal Passenger Complex (CPC): From Easy Rider to the Godfather of Mitosis // Molecular Cell Biology – 2012, № 13(12), P.789-803
10. Praveen Kumar Jaiswal, Apul Goel [et al.] Survivin: A molecular biomarker in cancer // The Indian Journal of Medical Research – 2015, № 141(4), P. 389–397

11. Jennifer D. Sharp, Derek A [et al.] Bladder cancer detection with urinary survivin, an inhibitor of apoptosis // *Frontier in bioscience* – 2002, № 7, P. 36-41
12. S. Ziaee, S. Moula [et al.] Diagnosis of Bladder Cancer by Urine Survivin, an Inhibitor of Apoptosis // *Urology Journal* – 2006, № 3(3), P. 150-153
13. Srivastava AK, Singh PK, Srivastava K [et al.] Diagnostic role of survivin in urinary bladder cancer // *Asian Pac J Cancer Prev* – 2013, № 14(1), P.81-85
14. Johnen G, Gawrych K, Bontrup H [et al.] Performance of survivin mRNA as a biomarker for bladder cancer in the prospective study UroScreen // *PLoS One* – 2012; №7(4)
15. Horstmann M, Bontrup H, Hennenlotter J [et al.] Clinical experience with survivin as a biomarker for urothelial bladder cancer // *World J Urol* – 2010; №28(3), P.399-404
16. Li X, Wang Y, Xu J, Zhang Q. Sandwich ELISA for detecting urinary Survivin in bladder cancer // *Chin J Cancer Res* – 2013; №25(4), P.375-381
17. Sharp JD, Hausladen DA, Maher MG [et al.] Bladder cancer detection with urinary survivin, an inhibitor of apoptosis // *Front Biosci* – 2002; №7, P.36-41
18. Ku, J.H., Godoy, G., Amiel, G.E. and Lerner, S.P. Urine survivin as a diagnostic biomarker for bladder cancer: a systematic review // *BJU International* – 2012; №110(5), P.630-636
19. Frank L.A., Krasitskaya V.V. Application of Enzyme Bioluminescence for Medical Diagnostics // *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* – 2014, №144, P. 175-197
20. Frank L.A. Ca<sup>2+</sup>-Regulated Photoproteins: Effective Immunoassay Reporters // *Sensors* – 2010, №10, P. 11287–11300
21. Frank L.A. Creation of Artificial Luciferases to Expand their Analytical Potential // *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* – 2015, №18, P. 919-929
22. Novus Biotechnologicals: Human Survivin ELISA Kit (Colorimetric) URL: [https://www.novusbio.com/products/survivin-elisa-kit\\_ka0441](https://www.novusbio.com/products/survivin-elisa-kit_ka0441) (дата обращения: 27.05.2022)

23. Cloud-Clone corp: ELISA Kit for Survivin (Surv) URL: <http://www.cloud-clone.com/products/SEC045Hu.html> (дата обращения: 27.05.2022).
24. FineTest: Human Surv(Survivin) ELISA Kit URL: <https://www.fine-test.com/product/eh0277/> (дата обращения: 27.05.2022).
25. Abcam: Human Survivin ELISA Kit (ab183361) URL: <https://www.abcam.com/human-survivin-elisa-kit-ab183361.html> (дата обращения: 27.05.2022).
26. Bratthauer GL. The avidin-biotin complex (ABC) method and other avidin-biotin binding methods // Immunocytochemical Methods and Protocols – 2010, № 588, P. 257-270
27. ThermoFisher Scientific: Survivin Human ProcartaPlex™ Simplex Kit URL: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/EPX01A-12158-901?SID=srch-srp-EPX01A-12158-901#/EPX01A-12158-901?SID=srch-srp-EPX01A-12158-901> (дата обращения: 27.05.2022).
28. Srinivasan S, Clements JA, Batra J. Single nucleotide polymorphisms in clinics: Fantasy or reality for cancer? // Crit Rev Clin Lab Sci – 2016, №53(1), P.29-39.
29. Ding C. 'Other' applications of single nucleotide polymorphisms // Trends Biotechnol – 2007, №25(7), P.279-83.
30. Stepanova M, Tiazhelova T, Skoblov M [et al.] Potential regulatory SNPs in promoters of human genes: a systematic approach // Mol Cell Probes – 2006, №20(6), P.348-58.
31. Hoffmann SC, Stanley EM, Darrin Cox E [et al] Association of cytokine polymorphic inheritance and in vitro cytokine production in anti-CD3/CD28-stimulated peripheral blood lymphocytes. // Transplantation – 2001, №72(8), P.1444-50.
32. Kawata N, Tsuchiya N, Horikawa Y [et al.] Two survivin polymorphisms are cooperatively associated with bladder cancer susceptibility // Int J Cancer – 2011, № (8), P.1872-80.

33. Qin Q, Zhang C, Zhu H [et al.] Association between survivin -31G>C polymorphism and cancer risk: meta-analysis of 29 studies // *J Cancer Res Clin Oncol.* – 2014, №140(2), P.179-88.
34. Mazoochi T, Karimian M, Ehteram H [et al.] Survivin c.-31G>C (rs9904341) gene transversion and urinary system cancers risk: a systematic review and a meta-analysis // *Per Med.* – 2019, №16(1), P.67-78.
35. Huang Z.M., Chiang Y.T., Tung M.C. [et al.] Survivin promoter rs9904341 polymorphism is associated with tumor stage and grade in patients with bladder cancer // *Adv Biosci Biotechnol* – 2013 Jan. №4(01), P.1-5
36. Lin Y.C., Hour T.C., Tsai Y.C. [et al.] Preliminary evidence of polymorphisms of cell cycle regulatory genes and their roles in urinary tract urothelial cancer susceptibility and prognosis in a Taiwan population // *Urol Oncol.* – 2017; №35(9)
37. Bogdanovic L., Lazic M., Bogdanovic J. [et al.] Polymorphisms of survivin – 31 G/C gene are associated with risk of urothelial carcinoma in Serbian population // *J Buon.* – 2017; №22(1), P.270–277.
38. Litos IK, Ioannou PC, Christopoulos TK [et al.] Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by primer extension reaction in a dry-reagent dipstick format // *Anal Chem.* – 2007, №79(2), P.395-402.
39. Башмакова, Е. Е. Выявление однонуклеотидных полиморфизмов на основе производных  $\text{Ca}^{2+}$ -регулируемого фотопротейна обелина.. Дисс. канд-та биол. наук: 03.01.06 – Красноярск, 2017. – 98 с.
40. В.В. Красицкая, Т.Н. Субботина, И.А. Ольховский [и др.] Определение мутации Лейдена методом ферментативного удлинения аллель-специфичного праймера с двойной биолюминесцентной детекцией (PED-Биолум) // *Клиническая Лабораторная Диагностика* –2013, № 12, С.26, 39-41.
41. Frank LA, Bashmakova EE, Krasitskaya VV [et al.] Genetically Modified Coelenterazine-Dependent Luciferases as Reporters for In Vitro Assay // *Journal of Siberian Federal University. Biology* – 2017, №10(2) P. 199-210

42. Башмакова Е.Е., Красицкая В.В., Юшкова А.Д. [et al.] К вопросу о генетической предрасположенности к развитию хронической нейросенсорной тугоухости. Вестник оториноларингологии – 202, №86(1) – С.15-19.
43. Bashmakova EE, Krasitskaya VV, Bondar AA [et al.] Bioluminescent SNP genotyping technique: Development and application for detection of melanocortin 1 receptor gene polymorphisms // Talanta – 2018, №189, P.111-115.
44. Laemli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4 // Nature – 1970, № 227, P. 680–685.
45. Башмакова Е. Е., Красицкая В. В., Бондарь А.А. [и др.] Выявление однонуклеотидных полиморфизмов (R160W, R151C, D294H) в гене рецептора меланокортина 1 (MC1R) билюминесцентным анализом // Молекулярная биология. – 2015. – Т. 49, N. 6. – С. 953–958.
46. Немцова М.В., Кушлинский Н.Е. Молекулярный патогенез рака мочевого пузыря // Альманах клинической медицины. – 2015; №41, С.79-88
47. Antonacopoulou A.G., Floratou K., Bravou V. [et al.] The survivin -31 snp in human colorectal cancer correlates with survivin splice variant expression and improved overall survival // Anal. Cell Pathol. (Amst). – 2010; №33(5), P.177–189
48. Krieg A., Mahotka C., Krieg T [et al.] Expression of different survivin variants in gastric carcinomas: first clues to a role of survivin-2B in tumour progression // Br. J. Cancer. – 2002; №86(5), P.737–743
49. Caldas H., Honsey L.E., Altura R.A. Survivin 2 $\alpha$ : a novel survivin splice variant expressed in human malignancies // Mol. Cancer. – 2005; №4(11)
50. Pavlidou A., Kroupis C., Dimas K. Association of survivin splice variants with prognosis and treatment of breast cancer // World J. Clin. Oncol. – 2014; №5(5), P.883–894. doi
51. Andric M., Nikolic N., Boskovic M [et al.] Survivin gene promoter polymorphism -31G/C as a risk factor for keratocystic odontogenic tumor development // Eur. J. Oral Sci. – 2012; №120(1), P.9–13

52. Jang J.S., Kim K.M., Kang K.H [et al.] Polymorphisms in the survivin gene and the risk of lung cancer // *Lung Cancer*. – 2008; №60(1), P.31–39
53. Suga K., Yamamoto T., Yamada Y [et al.] Correlation between transcriptional expression of survivin isoforms and clinicopathological findings in human colorectal carcinomas // *Oncol. Rep.* – 2005; №13, P.891–897
54. Koike H., Sekine Y., Kamiya M. [et al.] Gene expression of survivin and its spliced isoforms associated with proliferation and aggressive phenotypes of prostate cancer // *Urology*. – 2008; №72(6), P.1229–1233
55. Zhang M., Yang J., Li F. Transcriptional and post-transcriptional controls of survivin in cancer cells: novel approaches for cancer treatment // *J. Exp. Clin. Cancer Res.* – 2006; №25(3), P.391–402
56. Bashmakova E.E., Krasitskaya V.V., Kudryavtsev A.N. [et al.] Hybrid Minimal Core Streptavidin–Obelin as a Versatile Reporter for Bioluminescence-based Bioassay // *Photochemistry and Photobiology* – 2017, №93, P. 548–552.
57. Frank L.A., Illarionova V.A., Vysotski E.S. Use of proZZ-obelin fusion protein in bioluminescent immunoassay // *Biochemical and Biophysical Research Communications* – 1996, №219, P. 475-479
58. Франк, Л.А. Рекомбинатный фотопротейн обелин гидроидного полипа *Obelia longissima*: выделение и использование в иммуноферментном анализе. Дис. канд-та биол. наук: 03.00.02 – Красноярск, 1997. – 200 с.
59. Франк, Л. А., Петунин А.И., Высоцкий Е.С. Синтез конъюгатов  $Ca^{2+}$ -регулируемого фотопротейна обелина с иммуноглобулинами и их использование в качестве меток в иммуноанализе // *Биоорганическая химия*. – 2004. – Т. 30, N. 4. – С. 364-368.
60. Башмакова, Е. Е. Выявление однонуклеотидных полиморфизмов на основе производных  $Ca^{2+}$ -регулируемого фотопротейна обелина.. Дисс. канд-та биол. наук: 03.01.06 – Красноярск, 2017. – 98 с.

61. R&D Systems: Quantikine® Colorimetric Sandwich ELISA Kit Assay Principle  
URL: <https://www.rndsystems.com/products/quantikine-colorimetric-sandwich-elisa-assay-principle> (дата обращения 27.05.2022)
62. Ren YQ, Zhang HY, Su T [et al.] Clinical significance of serum survivin in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma // Eur Rev Med Pharmacol Sci. – 2014; №18(20), P.3063-3068
63. Аксель Е.М., Матвеев В.Б. Статистика злокачественных новообразований мочевых и мужских половых органов в России и странах бывшего СССР // Онкоурология. – 2019; №15(2), С.15–24

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение  
высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ

Руководитель магистерской программы

 Т. Г. Волова

«24» июня 2022 г.

## МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

на тему: «Онкомаркер сурвивин при диагностике рака мочевого пузыря»

**Направление** 06.04.01 Биология

**Магистерская программа** 06.04.01.01 – Микробиология и биотехнология

Научный руководитель	 16.06.2022	профессор, д.б.н.	Л.А. Франк
	подпись, дата	должность, ученая степень	
Выпускник	 16.06.2022		Н.С. Панамарёв
	подпись, дата		
Рецензент	 16.06.2022	к.б.н.	Л.П. Буракова
	подпись, дата	ученая степень	
Консультант	 16.06.2022	к.б.н.	Е.Е. Башмакова
	подпись, дата	ученая степень	

Красноярск 2022