

Anna Habryka.

Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Gliwicach

Zakład Biologii Nowotworów

Klonowanie fragmentu genu *HSPA2*. Wprowadzenie do klonowania.

Białka szoku cieplnego, HSP (ang. *Heat shock proteins*) są grupą białek, których ekspresja wzrasta, gdy komórki są narażone na działanie czynników stresowych takich jak podwyższona temperatura, toksyny, promieniowanie UV, głodzenie czy hipoksja. Niektóre spośród białek szoku cieplnego są produkowane w komórce konstytutywnie. HSP są to białka opiekuńcze odpowiedzialne za prawidłowe fałdowanie innych białek, ich oligomeryzację, translokację oraz degradację. Funkcje HSP u wszystkich organizmów żywych są podobne. Ze względu na masę cząsteczkową białka HSP dzieli się rodziny takie jak: HSP27, HSP60, HSP70, HSP90, HSP100.

Będący przedmiotem planowanych badań ludzki gen *HSPA2* jest unikalnym przedstawicielem rodziny genów stresu *HSP70*. Gen ten jest homologiem genów *Hst70* szczura i *Hsp70-2* myszy najsilniej aktywnych podczas spermatogenezy. U gryzoni produkt białkowy tego genu jest odpowiedzialny za dysocjację kompleksu synaptonemalnego, postęp mejozy oraz płodność samców. Ludzki gen *HSPA2* charakteryzuje się komórkowo- i narządowo swoistym profilem ekspresji. Poza komórkami spermatogenicznymi jego wysoką ekspresję wykazano w niektórych typach komórek somatycznych (np. niektóre nabłonki). Gen ten ulega również aktywacji w niektórych typach nowotworów.

Podstawowym celem pracy jest zbadanie mechanizmu regulującego transkrypcję genu *HSPA2* w wybranych typach komórek nowotworowych i prawidłowych. Mechanizmy te zostały dotychczas bardzo słabo scharakteryzowane. Zadania badawcze obejmują wykonanie funkcjonalnej analizy regionu regulatorowego genu *HSPA2*, wskazanie sekwencji DNA, z którymi oddziałują czynniki transkrypcyjne oraz zbadanie warunków, w których ekspresja genu jest aktywowana.

Pierwszym etapem prac jest sklonowanie fragmentu promotora genu *HSPA2* o długości ok. 2000 pz i wprowadzenie go do wektora reporterowego pGL3 Basic (Promega) zawierającego gen wskaźnikowy lucyferazę oraz gen oporności na ampicylinę.

Pierwszym etapem klonowania jest otrzymanie fragmentu DNA promotora genu *HSPA2* metodą amplifikacji PCR na matrycy genomowego DNA. Następnie namnożony fragment promotora oraz wektor reporterowy pGL3 Basic są przygotowywane do ligacji poprzez trawienie odpowiednimi enzymami restrykcyjnymi. Po reakcji ligacji oba fragmenty DNA tworzą nowe koliste cząsteczki DNA, które są wprowadzane do bakterii, w nich namnażane i selekcyonowane na odpowiednich podłożach hodowlanych. Ostatnim etapem jest izolacja plazmidów z kolonii bakteryjnych oraz identyfikacja klonów zawierających prawidłowo wprowadzony pożądany fragment DNA (we właściwej orientacji). Ostatecznie prawidłowość klonowania potwierdzana jest poprzez sprawdzenie sekwencji nukleotydowej otrzymanego plazmidu metodą sekwencjonowania.

Otrzymany plazmid będzie wykorzystany w kolejnym etapie badań jako matryca do otrzymania serii plazmidów zawierających wybrane fragmenty promotora *HSPA2*.