

Применение ретровирусных векторов для целенаправленного переноса генов у птиц

И. В. Кайда, А. В. Рындич

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
252143, Киев, ул. Академика Заболотного, 150

Ретровирусные векторы успешно используются для переноса клонированных генов в птичьи геномы путем инфицирования их эмбрионов. Эффективность такого переноса составляет 0,01–0,2 % для эмбрионов и 1–8 % для взрослых животных. Рассматриваются способы увеличения эффективности экспрессии трансгена за счет усиления тканеспецифической транскрипции и включения тканеспецифических промоторов в состав ретровирусного вектора, а также транспортировки гена в специфические клетки-мишени посредством псевдотипированного вектора или вектора с модифицированной оболочкой.

Ретровирусы представляют собой РНК-вирусы, имеющие в цикле репликации стадию ДНК, интегрированной в хозяйскую хромосому как провирус. Геном большинства репликативно-компетентных ретровирусов содержит три кодирующих района, выполняющих *транс*-функцию [1]: *gag* — определяет внутреннюю структуру вируса, процессирующиеся белки сердцевины вириона; *pol* — кодирует обратную транскриптазу, обеспечивающую синтез вирусной ДНК; *env* — кодирует гликопротеины оболочки вириона, ответственные за проникновение в клетку и отделение от нее (рис. 1, а).

Жизненный цикл ретровируса начинается, когда при инфекции вирус адсорбируется на мембране клетки, взаимодействует с поверхностными рецепторами клетки, узнающими гликопротеины оболочки вириона, затем происходит обратная транскрипция вирусной РНК с образованием ДНК, которая в дальнейшем специфически интегрируется в хозяйский геном и включает в себя следующие *цис*-активные последовательности (рис. 1, а): РВ-элемент — праймер-связывающий сайт; R — терминальный повтор в длинных концевых повторах (LTR); *rpt* — полипуриновый тракт; *att* — терминальный сайт прикрепления, участвующий в процессе интеграции вирусной ДНК в хозяйскую хромосому. Провирусный промотор, находящийся в пределах 3'-уникального участка (U3) 5'LTR, уп-

равляет транскрипцией, и все вирусные транскрипты иницируются в первом нуклеотиде R-региона. U3 область содержит последовательности энхансера — усилителя транскрипции. Полноразмерный транскрипт может быть упакован в вирусную частицу или использован для трансляции в белок *Gag-Pol* или после сплайсинга — в *Env*-белок. Для вырезания (сплайсинга) части транскрипта, соответствующей генам *gag* и *pol*, в провирусе имеются две сигнальные последовательности — *sa*, *sd*. Генная РНК упаковывается вирусными белками при участии *цис*-активных упаковочных последовательностей (Ψ), находящихся между уникальным U5-участком и началом *gag* [2–9].

Процесс упаковки РНК в вирионы пока еще до конца не изучен. Согласно современным представлениям, в сборке ретровирусной частицы участвует белковый продукт гена *gag* и две копии РНК вирусного генома. В процессе упаковки происходит созревание предшественника *Gag* полипротеина в несколько зрелых вирусных белков, из которых формируется высококонденсированная оболочка вириона. РНК геном ретровирусов содержит Ψ -упаковочные последовательности в 5'-нетранслируемой области с собственной вторичной структурой [7]. Предполагают, что в результате белково-нуклеинового узнавания происходит взаимодействие *Gag*-белка с молекулой РНК, имеющей определенную вторичную структуру в Ψ -упаковочной области, после чего такая РНК упаковывается в вирион

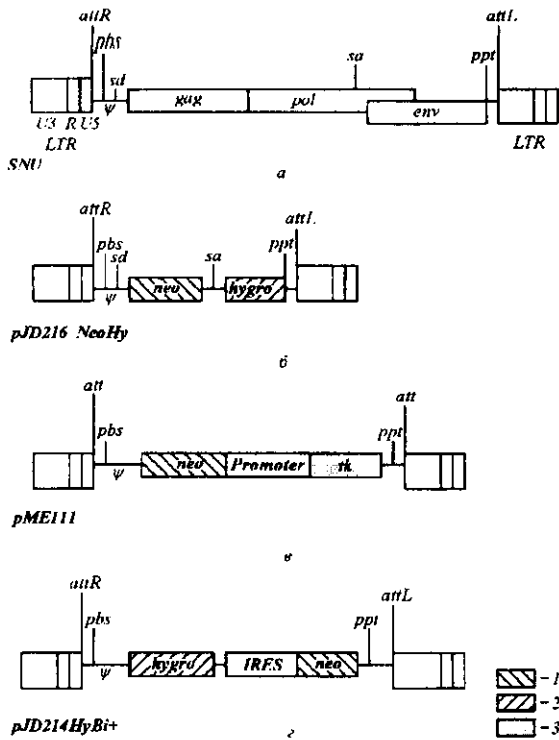


Рис. 1. Строение SNV (вирус некроза селезенки) и ретровирусных векторов, созданных на его основе: а — строение ретровируса на примере SNV [5]; б — сплайсирующийся вектор *pJD216 NeoHy* [5]; в — вектор с внутренним промотором *pME111* [16]; г — бицистронный вектор с IRES-последовательностями *pJD214HyBi+* [5]; *gag, pol, env* — гены, кодирующие вирусные белки; *LTR* — длинные концевые повторы; *U3* — уникальный участок *LTR*; *R* — терминальный повтор; *attR-attL* — терминальный сайт прикрепления (правый и левый); *pbs* — праймер-связывающий сайт; *sd* — донорный и *sa* — акцепторный сайты сплайсинга; *ppt* — полипуриновый тракт; Ψ — сигналы упаковки; 1 — ген неоминцинофотрансферазы; 2 — ген гироминцинофотрансферазы; 3 — тимидинкиназный ген HSV; Promoter — внутренний промотор; IRES — внутренний рибосомный повторяющийся сайт

[2, 10]. Делетирование Ψ-упаковочных последовательностей и точечные мутации в *gag*-гене нарушают процесс узнавания *Gag*-белком специфической вирусной РНК. В этом случае происходит сборка вириона нормальной структуры, в который упаковывается клеточная РНК или РНК другого вируса, имеющего сигналы упаковки и находящегося в клетке наряду с дефектным по упаковочным последовательностям вирусом [2, 10].

Делетирование кодирующих участков вирусных геномов, часто происходящее в вирусной популяции в природе, не вредит способности вируса упаковываться, обратнотранскрибироваться и интегрироваться в хозяйский геном. Поэтому возможно вместо вирусных кодирующих последовательностей, используя генно-инженерные манипуляции,

вставлять гены интересующих нас белков. Такой рекомбинантный вирус способен инфицировать клетки-мишени, интегрироваться и экспрессировать вставленные гены под контролем промотора из 5'-LTR [11] (рис. 1, б). Однако вследствие отсутствия тех или иных генов или участков генов, кодирующих собственные белки, такой вирус не способен реплицироваться. Для этого ему нужен вирус-помощник, имеющий кодирующую область и предоставляющий собственные вирусные белки для упаковки РНК рекомбинантного вектора (рис. 2), несущего интересующие нас гены. Рекомбинантный вирус, в котором вместо кодирующей области вставлены гены нужных нам белков, способный эффективно инфицировать клетки в культуре, в эмбрионе, во взрослом животном, — называют вектором [12]. Клетки, несущие в себе рекомбинантный провирус вируса-помощника, в который внесены делеции, исключающие упаковку собственной РНК вируса-помощника, но не нарушающие синтеза вирусных белков, называются упаковочными клетками [12].

В репликативно-дефектном векторе кодирующая область заменена на «транспортируемую» ДНК, маркерные гены и гены устойчивости к антибиотикам для селекции в культуре клеток. В качестве «транспортируемой» ДНК используют как небольшие фрагменты генома (ген α-актина скелетных мышц курицы [13, 14]), так и кДНК последовательности [15, 16]. Преимуществом последних является их небольшой размер, способность транскрибироваться с промотора в 5'-LTR

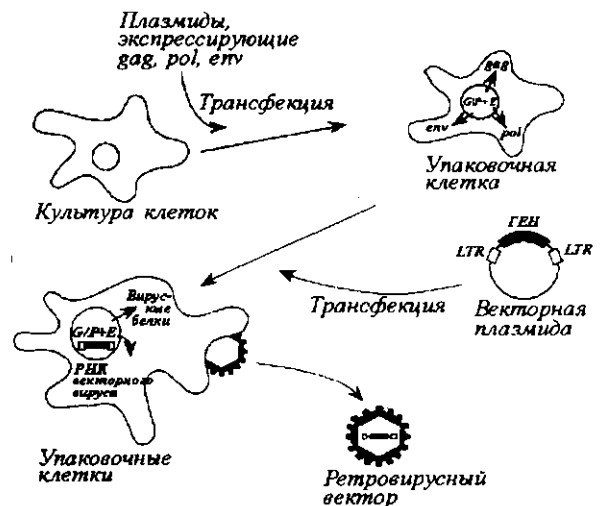


Рис. 2. Этапы продукции ретровирусного вектора в упаковочных клетках

ретровирусного вектора, тогда как геномным фрагментам часто необходим внутренний промотор, а также то, что кДНК не сплайсируются. Размеры клонированных в составе ретровирусного вектора последовательностей варьируют от 2 до 10 тыс. п. н. Ретровирусный вектор может иметь один [17] или два вставленных гена [18], транскрибирующихся с промотора из 5'-LTR и эффективно сплайсирующихся. Такие векторы называют сплайсирующимися (рис. 1, б) [17—22].

Недостатком ретровирусных векторов такого типа является то, что при экспрессии двух вставленных генов, направляемой LTR, один из генов нередко экспрессируется нестабильно [23, 24]. Чтобы усилить транскрипцию второго гена, его помещают под собственным внутренним промотором. В качестве внутреннего промотора чаще всего используют Simian virus 40 (SV40) и тимидинкиназный промотор вируса герпеса (HSV) [16, 25—28]. Вектор этого типа M 111 (рис. 1, в) на базе вируса ретикулоэндотелиоза (REV) показал экспрессию белка немицинофосфотрансферазы II (neo), кодирующегося геном, внесенным в клетки куриного эмбриона указанным вектором, в 16 раз превышающую экспрессию этого белка в контрольных, не имеющих вектора, эмбрионах [25]. Однако уровень экспрессии гена, находящегося под внутренним промотором, в некоторых случаях бывает значительно ниже, чем таковой 5'-контролируемой экспрессии [25—27]. Подобная супрессия имеет эпигенетический характер и не до конца изученный механизм. При селекции гена, имеющего 5'-контролируемую транскрипцию, наблюдают супрессию гена, находящегося под контролем внутреннего промотора, и наоборот, при селекции гена, транскрибирующегося с внутреннего промотора, снижается уровень экспрессии гена, находящегося под контролем промотора из 5'-LTR. Таким образом, совместная стабильная экспрессия обоих генов сплайсирующегося вектора даже при наличии внутреннего промотора весьма проблематична [5].

Новый подход к экспрессии нескольких генов в составе ретровирусного вектора позаимствован у пикорнавирусов (цит. по [5]). Пикорнавирусы экспрессируют отдельные белки с полицистронной мРНК. 5'-конец этой РНК заканчивается рUpU вместо типично эукариотического m⁷HGpppN-кэпа, транскрипт содержит длинный 5'-нетранслируемый район (UTRs) и повторяющиеся AUG-кодоны. UTRs представляют собой *цис*-активные последовательности, содействующие кэп-независимой трансляции, инициирующейся с внутреннего иницирующегося кодона. Они названы внутренними рибосомными повторяющимися сайтами — IRESs.

Последние клонированы из пикорнавирусов и используются в ретровирусных векторах для трансляции LTR-контролируемой полицистронной РНК. Активность созданного на базе вируса саркомы Рауса (RSV) вектора с IRES-последовательностями LTR-*lacZ*-EMSV-IRES-*v-src*-LTR проверяли, инфицируя куриные эмбрионы. Уже через 3—6 дней регистрировали экспрессию бактериального гена β-галактозидазы (*lacZ*). Таким образом была получена быстрая продукция белков *in vivo* посредством вектора с IRES-последовательностями [29]. Бицистронный ретровирусный вектор создан также на базе вируса птичьего эритробластога (AEV) [23]. Уровень экспрессии *v-erbA*, *v-myb*, клонированных в составе IRES-вектора *in vivo* (в цыплятах), был более высоким, чем таковой экспрессии этих онкогенов, клонированных в составе сплайсирующегося вектора.

Дицистронный вектор на базе вируса некроза селезенки (SNV) *pJD214 HyB^l* (рис. 1, г) имеет два селективных маркерных гена *neo* и *hygro* (ген гигромицинофосфотрансферазы) между последовательностями SNV LTR, оба гена показывают одинаковый уровень экспрессии в клетке, что невозможно получить для сплайсирующегося вектора и вектора с внутренним промотором (цит. по [5]).

На мышинных моделях показана возможность инсерционного мутагенеза в хозяйском геноме в результате интеграции провируса. Это чревато возобновлением трансформирующей активности у векторного вируса и распространением его в тканях животного. На примере формирования новых штаммов птичьих ретровирусов было показано, что при пассировании вируса в культуре клеток возобновление трансформирующей активности вируса трансдукцией клеточного онкогена может произойти даже в том случае, когда вирус не содержит последовательностей вирусных онкогенов [30, 31]. Чтобы предотвратить этот процесс, в 3'-LTR векторной ДНК инактивируют промоторно-энхансерную область посредством делетирования или направленного мутагенеза. В процессе обратной транскрипции в упаковочных клетках U3-область 5'-LTR восстанавливается за счет дефектного U3 3'-LTR. Полученный таким образом вектор имеет видоизмененные LTR, которые уже не могут вызывать инсерционный мутагенез. Вставленные гены экспрессируются только с внутреннего промотора, а транскрипты не могут паковаться вообще. Такие векторы созданы на базе вируса птичьего лейкоза (ALV) и SNV [32—34].

Создание векторов сложной конструкции, имеющих в своем составе несколько внутренних промоторов, может приводить к нестабильной транс-

крипции этого вектора в культуре клеток. Это может быть связано с тем, что ретровирусы птиц принадлежат к GC-богатому классу вирусов [35], и эффективная транскрипция, а также стабильность интеграции провируса зависят от встраивания их в GC-богатые участки клеточного генома [36, 37]. Кроме того, ретровирусный геном гомогенен по GC-составу, поэтому для эффективной транскрипции создаваемой векторной конструкции необходимо, чтобы GC-состав вектора отвечал таковому вставленного гена.

Приоритетным направлением решения проблемы высокоспецифического переноса генов является создание векторов, имеющих высокую специфичность узнавания рецепторов, характерных для данных клеток-мишеней. Этого можно достичь, присоединяя к вирусному *Env*-белку особый лиганд, повышающий сродство к данному типу рецепторов [38—41]). Авторы [41] описали биологические свойства ALV подгруппы А мутантного протеина оболочки, в который вставили небольшой пептид FLA 16, являющийся лигандом для клеточных рецепторов интегринавого семейства. Как было показано,

вирусные частицы, имеющие видоизмененные оболочки с FLA 16, специфически используют интегриновые рецепторы для инициации инфекции клеток млекопитающих. Последовательности, определяющие хозяйскую специфичность ALV, находятся в центральной части *env* — варибельные участки *hr1-hr2*. Для создания плазмид с химерным *env* участки *hr1-hr2* частично заменили на фрагмент, кодирующий FLA 16-лиганд. Гораздо труднее оказалось доказать прохождение инфекции через интегриновые рецепторы, поскольку эффективность инфекции через такие рецепторы вирусом с химерной оболочкой очень мала: на три — четыре порядка ниже относительно рецепторов подгруппы А.

Изменить хозяйскую специфичность вектора можно также посредством сборки псевдотипичного вируса, РНК геном которого «одет» в оболочку другого вируса с помощью упаковочных клеток (см. рис. 2). Для этого используют упаковочные клеточные линии с различной подгрупповой специфичностью. В работе [42] получены векторы на основе ALV, имеющие *env*-ген А, В, С, Е-подгрупповой специфичности. Для этого в упаковочных плаزمидях *env*-ген был заменен на *env*-ген соответствующих подгрупп ALV: А — из Раус-ассоциированного вируса, тип 1 (RAV-1) (рис. 3, б), В — из Раус-ассоциированного вируса, тип 2 (RAV-2), С — из Пражского штамма RSV (PR-RSV-C), Е — из Раус-ассоциированного вируса, тип 0 (RAV-0). В ходе интерференционного теста подгрупповой векторный вирус демонстрировал устойчивость к суперинфекции вирусом той же подгруппы и инфицировал клетки соответствующего типа.

Была показана также тканеспецифическая экспрессия векторов подгрупп А и В в курином эмбрионе: А-подгруппа инфицировала покровные ткани и сердечную мышцу, В-подгруппа инфицировала только сердечную ткань. Инфекционность этих векторов проверяли на различных птичьих клетках — перепелиных, куриных, утиных. Упаковочные клетки А-, В-, Е-подгрупповой специфичности показали титр 10^4 — 10^5 *lacZ* колониеобразующих единиц в 1 мл культуральной среды (CFU/ml), а упаковочные клетки С-подгрупповой специфичности — в 50—100 раз меньший титр [42].

Ранние упаковочные клеточные линии представляли собой провирус вируса-помощника, в котором делетировали упаковочный сигнал. Однако рекомбинации между гомологичными последовательностями вектора и упаковочного генома как в процессе обратной транскрипции, так и при совместной упаковке последовательностей вектора и упаковочного мутанта в вирион [12] приводят к восстановлению репликативной компетентности

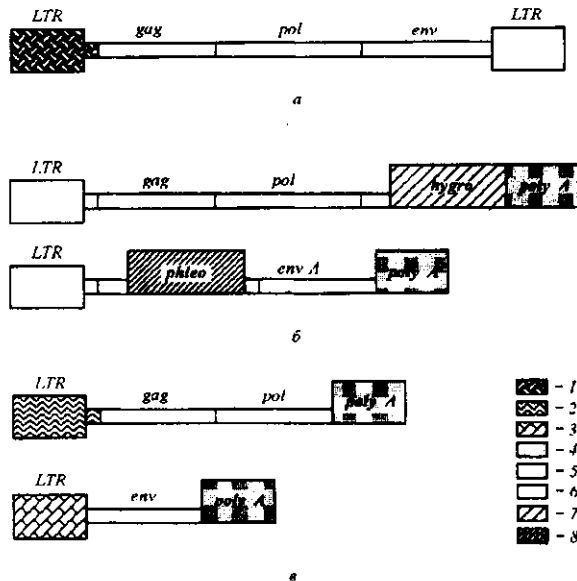


Рис. 3. Структура провирусов вирусов-помощников, использованных для создания птичьих упаковочных клеточных линий (пояснения в тексте, табл. 1): а — Q4dh; б — Isolde; в — DSN. *gag*, *pol*, *env* — гены, кодирующие вирусные белки; LTR — длинные концевые повторы; 1 — последовательности AEV; 2 — последовательности CMV (цитомегаловируса); 3 — последовательности RSV; 4 — сигналы полиадеплирования SV40; 5 — последовательности SNV; 6 — последовательности RAV-1; 7 — ген гирумцинофосфотрансферазы; 8 — ген флеомцинофосфотрансферазы

Таблица 1
Ретровирусные упаковочные клеточные линии птиц

Клеточная линия	Подгрупповая специфичность	Максимальный титр	Селективный ген	Литературный источник
Q4dh	A	3 ± 10^6	hph*	[44]
C3	A	10^6	neo**	[49]
DSN	A	10^6	neo	[50]
Isolde	A	10^7	phleo***	[42]
Senta	E	10^5	phleo	[18]
Haydee	—	10^3	hph	[42]

* Гигромицинфосфотрансфераза; ** неомицинфосфотрансфераза; *** флеомицинфосфотрансфераза.

вируса-помощника. Так, упаковочная линия Q4dh была создана на базе RAV-1, экспрессирующегося в перепелиных клетках QT6, продуцировала вектор в количестве $2 \cdot 10^5$ CFU/ml [44], а также репликативно-компетентный вирус в количестве 1—3 вириона в 1 мл [45]. Наличие репликативно-компетентного вируса в векторном пуле увеличивает вероятность рекомбинаций и возможность неконтролируемого распространения вируса.

Поэтому при создании клеточных линий Isolde (рис. 3, б), Haydee, Senta [42, 46—48] в геноме RAV-1 произвели следующие изменения: Ψ-упаковочный сигнал делетировали, 3'-LTR заменили на сигналы полиадеплирования; *gag-pol*- и *env*-гены экспрессируются в различных плаزمидях. Таким образом, для восстановления репликативной компетентности вируса-помощника необходим не один раунд рекомбинации с последовательностями ретровирусного вектора, как в случае Q4dh упаковочной клеточной линии, а три раунда рекомбинации, что маловероятно. Haydee — клеточная линия, экспрессирующая *gag-pol*-гены в отсутствие репликативно-компетентного вируса (продуктивность 10^3 CFU/ml). Упаковочная линия, продуцирующая *gag-pol*-гены и *env*-ген A-подгрупповой специфичности, названа Isolde и продуцирует векторный вирус в количестве 10^6 CFU/ml. Senta экспрессирует гены *gag-pol* и *env* E-подгруппы, продуктивность 10^4 CFU/ml (табл. 1).

Каждая упаковочная линия продуцирует данный *Env*-белок определенной специфичности и является устойчивой к инфекции вирусом, «одетым» в эту оболочку [47]. Повторные раунды инфекции и амплификация продуцируемого ретровирусного вектора затруднены из-за блокирования клеточных рецепторов, перегруженных *Env*-белком. Повтор-

ные раунды инфекции возможны через другие клеточные рецепторы, доступные для псевдочастиц, «одетых» в оболочку другой подгруппы. На мышинных моделях показано, что совместное культивирование упаковочных линий, продуцирующих *Env*-белок различной специфичности, повышает титр продуцируемого вектора в 10—100 раз [43], однако наряду с этим наблюдается появление репликативно-компетентного вируса.

Совместное культивирование упаковочных клеточных линий с различной хозяйской специфичностью Isolde (A), Senta (E) позволило повысить титр продуцируемого вектора в 10 раз в присутствии репликативно-компетентного вируса, появление которого является результатом рекомбинации между кодирующими последовательностями вируса-помощника, экспрессирующегося в упаковочных клетках, и *цис*-активными последовательностями ретровирусного вектора [47].

Чтобы уменьшить вероятность рекомбинаций между последовательностями вектора и вируса-помощника, в C3-упаковочной клеточной линии, созданной на базе SNV, помимо делетирования Ψ-упаковочных последовательностей, *gag-pol*-гены и *env*-ген экспрессируют в различных плазмидях [49]. Титр продуцируемого клетками вектора составил около 10^5 инфекционных частиц в 1 мл, репликативно-компетентный вирус детектировался при длительном пассировании в культуре.

DSN-упаковочная линия [50] создавалась с учетом недостатков, выявленных в линии C3. Клетки DSN (рис. 3, в) содержат *gag-pol*-гены SNV, экспрессирующиеся с 5'-LTR цитомегаловируса, 3'-LTR заменен на сигналы полиадеплирования SV40; *env*-ген SNV экспрессируется в другой конструкции, содержащей 5'-LTR RSV и сигналы полиадеплирования SV40 вместо 3'-LTR. Использование последовательностей различных вирусов для создания конструкции вируса-помощника позволило решить проблему гомологической рекомбинации с последовательностями вектора — вирус-помощник не детектировался, продуктивность линии $7 \cdot 10^5$ инфекционных частиц в 1 мл.

До сих пор речь шла о том, что для размножения репликативно-дефектного вектора необходимы особым образом созданные и отобранные упаковочные клетки. Существует альтернативный подход, заключающийся в котрансфекции клеток двумя плазмидями: первая представляет собой геном репликативно-дефектного вектора, а вторая несет геном вируса-помощника и экспрессирует вирусные *gag*-, *pol*-, *env*-последовательности. Это приводит к стабильной интеграции в хромосому и долговременной экспрессии генов репликативно-дефект-

ного вектора [20]. Указанный подход использовали для получения векторов на базе RSV [20, 21, 51], ALV [20]. В обоих случаях зарегистрирован достаточно высокий уровень продукции вектора (около 10^4 CFU/ml). Для ALV-экспрессирующих клеток показано отсутствие репликативно-компетентного вируса [20].

Существующий уровень развития биотехнологии позволяет решить проблемы, связанные с созданием ретровирусного вектора, прогнозированием его транскрипции и экспрессии клонированных в его составе генов *in vitro* — в культуре клеток. Это помогло исследовать механизмы упаковки вирусной РНК в вирионы [1, 10, 45], процессы восстановления трансформирующей активности у трансформационно-дефектных ретровирусов [52], мобилизации клеточных протоонкогенов, а также генетической дивергенции в ходе вирусной репликации и многие другие проблемы, связанные с ретровирусной репликацией [5].

Сейчас на повестке дня стоят вопросы, связанные с эффективной экспрессией ретровирусных систем *in vivo*. Проблема состоит в том, что высокий уровень экспрессии генов ретровирусного вектора в культуре клеток, регистрируемый в течение длительного времени (от нескольких месяцев до года и более), еще не является гарантией эффективной экспрессии их в тканях эмбриона и взрослого животного [5]. Это связано с наличием иных по сравнению с культурой клеток механизмов регуляции ретровирусной экспрессии *in vivo* [53].

Для большинства мышинных лейкозных вирусов Молони показано, что экспрессия вирусных транскриптов блокируется торможением LTR-направленной транскрипции в мышинном зародыше, инфицированном вектором на ранних стадиях эмбриогенеза [53]. Объясняют это наличием специфических эмбриональных факторов, ингибирующих 5'-зависимую транскрипцию, а также отсутствием специфических активных факторов, стимулирующих транскрипцию на определенных стадиях эмбриогенеза [53]. Косвенным подтверждением этого являются данные, полученные для векторов, созданных на базе RSV, RAV-1, RAV-2: экспрессия *lacZ* маркерного гена обусловлена стадией развития куриного эмбриона [17, 21, 24, 25, 53, 54]. Для SNV-репликативно-дефектного вектора показано [54], что экспрессия *lacZ*-гена зависит от того, на какой стадии развития куриного эмбриона проводили инфекцию векторным вирусом: в инфицированном в первый день после оплодотворения (E0-E1) наблюдали окрашенные фокусы в производных эктодермы — покровных тканях и нервной ткани; инфицированные на стадии E2 показывали *lacZ*-эк-

Таблица 2
Эффективность экспрессии птичьих ретровирусных векторных систем

Вирус	Репликативно-компетентная система	Уровень экспрессии, %	Репликативно-дефектная система	Уровень экспрессии, %
RSV	CAT-экспрессия в RCANBP/ask CAT/F в цыплятах [14]	70	Экспрессия RD LAC1 в курином эмбрионе [17]	0,25
RAV	Экспрессия <i>alv6</i> в курином эмбрионе [52, 57]	0,1	Экспрессия NLA-NLB в курином эмбрионе [53]	0,06
REV	—	—	Активность NPTII в ME 111 (относительно контроля) [25]	1,6
SNV	—	—	Производство белка cGH в SW 272 [16, 56] (в 100 раз больше контроля)	200 нг/мл

П р и м е ч а н и е. Уровень экспрессии = (количество фокусов/инфекционная доза вируса) · 100 %.

прессию преимущественно в сердечной мышце и покровных тканях; окрашенные фокусы регистрировали в эмбриональных тканях сердца, печени, желудка и покровных тканях, не наблюдали *lacZ*-экспрессии в эмбрионах, инфицированных после E11 [54]. Тканеспецифическая экспрессия ретровирусных векторов позволяет использовать их как маркеры в исследовании эмбриогенеза ([17], подробно см. обзор [55]).

Существуют данные, свидетельствующие в пользу предположения о том, что тканеспецифичность экспрессии гена, клонированного в составе ретровирусного вектора, зависит от природы LTR [24]: векторы, содержащие LTR RAV-2 экспрессируются более всего в клетках нервной трубки [53], RAV-1 — в клетках эмбрионального сердца [53], RSV — в клетках нервной ткани [21] и эндотелии [22]. Тканеспецифическая экспрессия ретровирусных векторов позволяет использовать их как маркеры в исследовании эмбриогенеза (подробно см. обзор [55]).

Из описанных в табл. 2 ретровирусных систем стабильная экспрессия в культуре клеток, тканях эмбриона и тканях взрослых животных описана для векторов ME111, SW272. Так, репликативно-дефектный вектор ME111 переносит функциональный LTR-зависимый ген неомицинофосфотрансферазы II в клетки куриного эмбриона. Этот ген

детектируется в тканях потомков первого и второго поколений [25]. Аналогичный уровень экспрессии и наследуемости гена куриного гормона роста, клонированного в составе SW272, описан в работах [15, 16].

Однако повышение эффективности экспрессии *in vivo* генов, внесенных ретровирусным вектором, остается задачей первостепенной важности, поскольку известные ретровирусные системы показывают эффективность экспрессии до 10 % в культуре клеток, 0,06—0,2 % в курином эмбрионе и 2—8 % во взрослом животном. В то время как аденовирусные векторные системы в состоянии давать 30—60 % экспрессии *in vivo* [58]. Одно из направлений решения этой проблемы — создание ретровирусных векторов с внутренним тканеспецифическим промотором, обеспечивающим устойчивую транскрипцию в определенной ткани эмбриона и взрослого животного [14].

Репликативно-компетентный вектор RCANBP/*α*сат CAT/F [13, 14], созданный с этой целью на базе полного провируса RSV, в котором вместо *src*-гена вставлен ген CAT (хлорамфениколацетилтрансферазный) под контролем тканеспецифического промотора α -актина скелетных мышц курицы. Вектор показал высокую экспрессию CAT-гена в мышечных тканях цыплят (70 %) по сравнению с 0—8 % экспрессией этого гена в других тканях [14]. Если авторам удастся показать стабильную экспрессию CAT-гена во взрослых животных и наследуемость тканеспецифической экспрессии, то можно будет говорить о том, что тканеспецифические промоторы способны обеспечить устойчивую экспрессию векторных генов у трансгенных птиц.

Репликативно-компетентные системы позволяют эффективно вводить клонированные гены в куриные эмбрионы: репликативно-компетентный вектор хорошо распространяется в различных тканях развивающегося эмбриона; встроившись при инфекции в геном животного, передается потомкам 2—3-го поколения трансгенных животных. Для наработки репликативно-компетентного вектора не нужны упаковочные клетки, что значительно удешевляет эксперимент и сокращает время получения трансгенного животного.

Главным недостатком репликативно-компетентных систем является наличие репликативно-компетентного вируса в организме животного, что может привести в конечном итоге к развитию опухоли. При длительном пассировании векторного вируса в организме трансгенного животного возникает опасность возобновления трансформирующей способности у векторного вируса из-за включения

последовательностей клеточных протоонкогенов в геном ретровируса [30, 31].

Один из подходов к решению этой проблемы — использование эндогенных вирусов птиц в качестве векторов. Эндогенные ретровирусные последовательности — это последовательности ретровирусных провирусов, которые спонтанно интегрировались в клетки эмбриона в процессе эволюции и экспрессируются под контролем хозяйских факторов. Куры, имеющие в своем геноме как полный, так и частично делетированный провирус эндогенного вируса, являются генетически устойчивыми к инфекции лейкозными вирусами. Это явление названо интерференцией: клетки, несущие в своем геноме интегрированный ретровирус, экспрессируют оболочечный гликопротеин, кодирующийся провирусным геном *env*, и устойчивы к инфекции ретровирусом этой же подгруппы (имеющим такой же белок вирусной оболочки) вследствие ингибирования адсорбции вируса на поверхности рецептора и сложности проникновения его в клетку.

Данное явление использовали для получения линии кур, устойчивых к инфекции вирусом ALV A-подгрупповой специфичности [52, 57, 59]. Для этого в клетки куриного зародыша линейных кур, свободных от эндогенных последовательностей (0 линия), вносили ген A-подгрупповой специфичности, инфицируя эмбрион вирусами RAV-1, RAV-0. Лучшие результаты оказались при использовании RAV-0-вируса в качестве вектора. В первом поколении получены животные, несущие 1—10 копий провируса RAV-0 в своем геноме. Второе поколение получили при скрещивании мозаичных кур первого поколения с 0-линией. Яйца животных этого поколения повторно инфицировали RAV-0-вирусом и получили животных, несущих 10—30 копий провируса в своем геноме. Поскольку авторы решали задачу выведения линии кур, устойчивой к инфекции вирусом птичьего лейкоза, то более всего их интересовала экспрессия *env*-гена у трансгенных животных, которую определяли интерференционным тестом. Оказалось, что наивысший уровень продукции *Env*-белка дают куры линии *alv6*, несущие дефектный по *gag*-гену провирус и не продуцирующие вируса [57, 59]. Показана стабильная устойчивость кур этой линии к инфекции лейкозными вирусами. При инфицировании таких кур RSV не образуются опухоли [52, 57, 59].

Для создания животных, устойчивых к инфекции ALV и образованию опухолей, позднее использовали репликативно-дефектный вектор *pNE-A*, несущий *neo*-ген под контролем LTR птичьего эритробластога и *env*-ген ALV A-подгрупповой специфичности [60]. Цыплята, инфицированные этим

вектором, продуцировали антитела к ALV и были устойчивы к образованию опухолей. Такой подход интересен с точки зрения получения животных, стабильно продуцирующих антитела, что необходимо как для биотехнологии, так и в производстве вакцин.

I. В. Кайда, А. В. Риндич

Застосування ретровірусних векторів для цілеспрямованого переносу генів у птахів

Резюме

Ретровірусні вектори успішно використовують для переносу клонуваних генів у пташиний геном шляхом інфікування ембріонів. Ефективність такого переносу складає 0,01–0,2 % для ембріонів і 2–8 % для дорослих тварин. Розглядаються способи підвищення ефективності експресії трансгена за рахунок підсилення тканинспецифічної транскрипції та включення тканинспецифічних промоторів до складу ретровірусного вектора, а також транспортування гена у специфічні клітини-мішені за допомогою псевдотипованого вектора.

I. V. Kaida, A. V. Rynditch

Usage of retrovirus vectors for gene transfer into birds

Summary

Retroviral vectors are used for the transfer of new genes into the birds genome by infecting their embryos. However, the efficiency of such transfer is relatively not very high (0.01–0.2 % for embryos). The efficiency can be increased by including the tissue specific promoters into retroviral vectors. The matching GC-content of the vector and transporting gene should be taken into consideration as such matching might influence the transcription of integrated transporting gene. Another way of increasing the efficiency is connected with gene transportation into the specific target cells with pseudotyping vectors with modified envelope corresponding only to the certain type of cell receptors.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Coffin J. M. Structure of the retroviral genome // The molecular biology of RNA tumor virus // Eds R. Weiss et al.—New York: Cold Spring Harbor Lab., 1985.—P.261–368.
- Anderson D. J., Lee P., Levine K. L. et al. Molecular cloning and characterization of the RNA packaging defective retrovirus SE 210 1 Q16 // J. Virol.—1992.—66.—P. 204–216.
- Aronoff R., Linial M. Specificity of retroviral RNA packaging // Ibid.—1991.—65.—P. 71–80.
- Aronoff R., Hajjar A. M., Linial M. Avian retroviral RNA encapsidation: reexamination of functional 5' RNA sequences and the role of nucleocapsid Cys-His motifs // Ibid.—1993.—67.—P. 178–188.
- Boris-Lavrie K. A., Temin H. M. Recent advances in retrovirus vector technology // Curr. Opin. Genet. and Develop.—1993.—3.—P.102–109.
- Katz R., Terry R., Skalka A. A conserved cis-acting sequence in the 5' leader of Avian Sarcoma Virus RNA is required for packaging // J. Virol.—1986.—59, N 1.—P. 163–167.
- Knigt J., Zhi Hai Si, Stoltzfus M. A base-paired structure in the avian sarcoma virus 5' leader is required for efficient encapsidation of RNA // Ibid.—1994.—68, N 7.—P. 4493.
- Pugatsch T., Stacey D. Identification of sequence likely to be required for avian retroviral packaging // Virology.—1983.—128.—P. 505–511.
- Sorge J., Ricci W., Hughes S. H. Cis-acting RNA packaging locus in the 115-nucleotide direct repeat of RSV virus // J. Virol.—1983.—48, N 3.—P. 667–675.
- Sakalian M., Wills J. W., Vogt V. Efficiency and selectivity of RNA packaging by RSV gag deletion mutant // Ibid.—1994.—68, N 9.—P. 3388–3394.
- Прасолов В. С. Ретровірусні вектори — ефективна система переносу і експресії чужеродних генів в клітках млекопитаючих // Молекуляр. біологія.—1989.—23.—С. 348–355.
- Miller A. D. Retrovirus packaging cells // Human Gene Therapy.—1990.—1.—P. 5–14.
- Petropoulos C. G., Rosenberg M. R., Jenkins N. A. et al. The chicken skeletal muscle α -actin promoter is tissue specific in transgenic mice // Mol. and Cell. Biol.—1989.—9.—P. 3785–3792.
- Petropoulos C. J., Payne W., Salter D. V., Hughes S. H. Using appropriate *in vivo* expression of a muscle-specific promoter by using avian retroviral vectors for gene transfer // J. Virol.—1992.—66.—P. 3391–3397.
- Bosselman R. A., Hsu R.-Y., Boggs T. et al. Germeline transmission exogenous genes in the chicken // Science.—1990.—243.—P. 533–535.
- Bosselman R. A., Hsu R.-Y., Boggs T. et al. Replication-defective vectors of reticuloendoteliosis virus transduce exogenous genes into somatic stem cells of the unincubated chicken embryo // J. Virol.—1989.—63.—P. 2680–2689.
- Reddy S. T., Stoker A. W., Bissel M. J. Expression of RSV-derived retroviral vectors in the avian blastoderm: potential as stable genetic markers // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1991.—88.—P. 10505–10509.
- Cosset F.-L., Legras C., Thomas J.-L. et al. Improvement of Avian Leukosis Virus (ALV) — based retrovirus vectors by using different cis-acting sequences from ALVs // J. Virol.—1994.—65.—P. 3388–3394.
- Benchaibi M., Mallet F., Thoraval P. et al. Avian retroviral vectors derived from avian defective leukemia virus: role of the translational context of the inserted gene on efficiency of the vectors // Virology.—1989.—169.—P. 15–26.
- Flamant F., Samarut J. Virofection: A one-step procedure for using replication-defective retrovirus vectors // Ibid.—1995.—211.—P. 234–240.
- Galileo D. S., Gray G. E., Owens G. C. et al. Neurons and glia arise from a common progenitor in chicken optic tectum demonstration with two retroviruses and cell type-specific antibodies // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1990.—87.—P. 458–462.
- Storker A., Hatier C., Bissel M. J. The embryonic environment strongly attenuates v-src oncogenesis in mesenchymal and epithelial tissues, but not in endothelia // J. Cell. Biol.—1990.—111.—P. 217–228.
- Casini T., Graf T. Bicistronic retroviral vector reveals capacity of v-erbA to induce erythroleukemia and to co-operate with v-myc // Oncogene.—1995.—11.—P. 1019–1026.
- Molina R. M., Chebloune Y., Verdier G., Legras C. Influence of expression and cis-acting sequences from avian leukosis viruses (ALVs) on stability of (ALV)-based retrovirus vectors // Life Sci.—1995.—318.—P. 541–551.
- Briskin M. J., Hsu R.-Y., Boggs T. et al. Heritable retroviral transgenes are highly expressed in chickens // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1991.—88.—P. 1736–1740.
- Emerman M., Temin H. M. Genes with promoters in retrovirus vectors can be independently suppressed by epigenetic mechanism // Cell.—1984.—39.—P. 459–467.

27. Emerman M., Temin H. Quantitative analysis of gene suppression in integrated retrovirus vectors // *Mol. and Cell. Biol.*—1986.—6.—P. 792—800.
28. Southern P. J., Berg P. Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV 40 early region promoter // *J. Mol. and Appl. Genet.*—1982.—982, N 1.—P. 327—341.
29. Ghats J. R., Sanes J. R., Majors J. E. The encephalocardiatis virus internal ribosome entry site allows efficient coexpression of two genes from a recombinant provirus in cultural cell and in embryo // *Mol. and Cell. Biol.*—1991.—11.—P. 5848—5859.
30. Dezelee P., Barnier J., Geryk J. et al. New case of *c-src* gene transduction; the generation of virus PR 2257 // *Folia Biol.*—1994.—40.—P. 211—223.
31. Felder M.-P., Euchene A., Laygier D. et al. Steps and mechanisms of oncogene transduction by retroviruses // *Ibid.*—P. 225—235.
32. Dougerty J., Temin H. A promoterless retroviral vector indicates that there are sequences in U3 required for 3' RNA processing // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1987.—84.—P. 1197—1201.
33. Flamand F., Aubert D., Legrand C. et al. Importance of 3' non-coding sequences for efficient retrovirus-mediated gene transfer in avian cells revealed by self-inactivating vectors // *J. Gen. Virol.*—1993.—74.—P. 39—46.
34. Soriano P., Friedrich G., Lawinger P. Promoter interactions in retrovirus vectors introduced into fibroblasts and embryonic stem cells // *J. Virol.*—1991.—65.—P. 2314—2319.
35. Zoubak S., Rynditch A., Bernardi G. Compositional bimodality and evolution of retroviral genomes // *Gene.*—1992.—119.—P. 207—213
36. Rynditch A., Kadi F., Geryk J. et al. The isopicnic, compartmentalised integration of RSV sequences // *Ibid.*—1991.—106.—P. 165—172.
37. Rynditch A., Zoubak S., Bernardi G. Targeted integration of viral sequences into human genome // *Int. Symp. on Human Gene Therapy.*—Inuyama—Nagoya, 1995.
38. Kashara N., Dozy A. M., Kan Y. W. Tissue-specific targeting of retroviral vectors through ligand-receptor interactions // *Science.*—1994.—266.—P. 1373—1375.
39. Neda H., Wu C., Wu G. Y. Chemical modification of an ecotropic murine leukemia virus results in redirections of its target cell specificity // *J. Biol. Chem.*—1991.—266.—P. 14143—14146.
40. Somia N., Zoppe M., Verma I. M. Generation of targeted retroviral vectors for using single-chain variable fragment: an approach to *in vivo* gene delivery // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1995.—92.—P. 7570—7574.
41. Valsesia-Wittmann S., Drynda A., Deleage G. et al. Modifications in the binding domain of avian retrovirus envelope protein to redirect the host range of retroviral vectors // *J. Virol.*—1994.—68.—P. 4609—4619
42. Cosset F.-L., Ronfort C., Molina R.M. et al. Packaging cells for avian leukosis virus-based vectors with various host ranges // *Ibid.*—1991.—66.—P. 5671—5676.
43. Lynch C., Miller A. D. Production of high-titer helper virus-free retroviral vectors by cocultivation of packaging cells with different host ranges // *Ibid.*—P. 3887—3890.
44. Stoker A., Bissell M. Development of avian sarcoma and leukosis virus-based vector-packaging cell lines // *Ibid.*—1988.—62.—P. 1008—1015.
45. Mitrani E., Coffing J., Boedtker M., Doty P. Rous Sarcoma Virus is integrated but not expressed in chicken early embryonic cells // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1987.—84.—P. 2781—2784.
46. Cosset F.-L., Legras C., Savatier P. et al. A new avian leukosis virus-based packaging cell line that uses two separate trans-complement in helper genomes // *J. Virol.*—1990.—64.—P. 1070—1078.
47. Cosset F.-L., Girod A., Flamant F. et al. Use of helper cells with two host ranges to generate high-titer retroviral vectors // *Virology.*—1993.—N 193.—P. 385—395.
48. Savatier P., Bagnis C., Thoraval P. et al. Generation of a helper cell line for packaging avian leukosis virus-based vectors // *J. Virol.*—1989.—63.—P. 513—522.
49. Hu S., Bruszewski J., Nicolson M. Generation of competent virus in the REV helper cell line C3 // *Virology.*—1987.—159.—P. 446—449.
50. Dougherty J., Wisniewski R., Yang S. et al. New retrovirus helper cell line with almost no nucleotide sequence homology to retrovirus vectors // *J. Virol.*—1989.—63.—P. 3209—3212.
51. Bishop J. M. // *Ibid.*—1980.—36.—P. 50—61.
52. Crittenden L. B., Salter D. W. Gene insertion; current progress and long-term goals // *Avian Diseases.*—1986.—30, N 1.—P. 43—46.
53. Thomas J. L., Afanasieff M., Cosset F.-L. et al. *In situ* expression of helper-free avian leukosis virus (ALV)-based retrovirus vectors in early chick embryos // *Int. J. Develop. Biol.*—1992.—N 36.—P. 215—227
54. Hlozaneck I., Luton D., Dieterienlievre F., Jaffredo T. Heart targeting of retroviral expression in avian embryos: a species-independent phenomenon // *Roux Arch. Dev. Biol.*—1995.—204.—P. 212—218.
55. Lemischka J. R. Retroviral lineage studies: some principals and applications // *Curr. Opin. Genet. and Develop.*—1993.—3.—P. 155—118.
56. Souza L. M., Boone T. C., Murdock A. Application of recombinant DNA technologies to studies on chicken growth hormone // *J. Exp. Zool.*—1984.—232.—P. 465—473.
57. Crittenden L. B., Salter D. V., Federspiel M. J. Segregation viral phenotype, and proviral structure of 23 avian leukosis virus inserts in the germ line of chickens // *Theor. and Appl. Genet.*—1989.—77.—P. 505—515.
58. Yeh P., Dedieu J.-F., Orsini C. et al. Improving adenovirus-mediated gene transfer // *Int. Symp. on Human Gene Therapy* Inuyama—Nagoya, 1995.
59. Salter D. V., Crittenden L. B. Artificial insertion of a dominant gene for resistance to avian leukosis virus into germ line of the chicken // *Theor. and Appl. Genet.*—1989.—77.—P. 457—461.
60. Chebloune Y., Rulka J., Cosset F.-L. et al. Immune response and resistance to RSV challenge of chickens immunized with cell-associated glycoproteins provided with a recombinant ALV // *J. Virol.*—1991.—65.—P. 5374—5380.

УДК 517. 15:516.858
Поступила в редакцию 22.07.96