

Новые упаковочные клетки на базе адаптированного варианта вируса саркомы Рауса

И. В. Кайда, С. М. Серов¹, А. М. Михайлик, П. Н. Болтовец,
В. И. Кашуба, А. В. Рындич

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

¹ Институт молекулярной биологии им. Энгельгардта РАН
117984, Москва, ул. Вавилова, 32

Созданы новые упаковочные клетки F18/pJD, содержащие вирус-помощник на базе трансформационно-дефектного мутанта адаптированного к уткам варианта пражского штамма вируса саркомы Рауса (td daPr-RSV-C), которые продуцируют репликативно-дефектный ретровирусный вектор с титром 10^6 КОЕ/мл. Делетирование цис-активных последовательностей ψ упаковочной области и обращенных повторов E, фланкирующих src, адаптированного варианта ретровируса при создании конструкции вируса-помощника позволило получить пул векторного вируса, свободный от последовательностей вируса-помощника.

Введение. Современные ретровирусные репликативно-дефектные системы для переноса генов должны иметь в своем составе упаковочные клетки, несущие интегрированный провирус вируса-помощника и продуцирующие репликативно-дефектный рекомбинантный ретровирусный вектор с высоким титром в отсутствие продукции вируса-помощника (см. обзор [1]).

Суммируя данные, полученные для птичьих ретровирусных репликативно-дефектных систем, можно выделить две группы экспериментальных проблем, на решение которых были направлены, в основном, предыдущие исследования [3—7]:

а) повышение продуктивности упаковочных клеток;

б) исключение продукции репликативно-компетентного вируса-помощника на упаковочных клетках.

Геном вируса-помощника модифицируют так, чтобы максимально понизить вероятность упаковки собственной РНК вируса-помощника на упаковочных клетках, делетируя цис-активные последовательности, вовлеченные в процесс упаковки вирио-

на. У вируса саркомы Рауса (RSV) к ним относят: ψ упаковочные последовательности 5'-некодирующей области ретровирусного генома [8]; обращенные повторы E, фланкирующие src [9]; последовательности коротких открытых рамок считывания в 5'-некодирующей области провируса перед началом gag [10]. Однако проблема заключается в том, что делетирование этих цис-активных последовательностей полностью не исключает упаковки собственных последовательностей ретровируса, а приводит лишь к снижению доли РНК вируса-помощника, включенной в состав вириона [11—13]. Поэтому помимо РНК репликативно-дефектного векторного вируса в продуцируемом на упаковочных клетках вирусном пуле, как правило, детектируются РНК дефектного по упаковочным последовательностям вируса-помощника в малом количестве копий и клеточная РНК [11, 14—17]. При совместной упаковке РНК вируса-помощника и векторного вируса в вирион на упаковочных клетках и последующей обратной транскрипции возможна рекомбинация между гомологичными последовательностями их геномов. В этом случае у вируса-помощника восстанавливается ψ упаковочная область и возобновляется способность к репликации. По мере пассирования такого смешанного пула на упаковочных

клетках происходит распространение вируса-помощника. Наличие репликативно-компетентного вируса-помощника в пуле репликативно-дефектного вектора опасно тем, что может провоцировать возникновение опухолей у трансгенных животных [18].

Вероятность гомологичной рекомбинации между последовательностями вируса-помощника и векторного вируса можно снизить, уменьшая протяженность участков гомологии между последовательностями вектора и вируса-помощника путем замены 3'LTR вируса-помощника polyA SV40 [4, 7] либо включая последовательности различных вирусов в состав вируса-помощника [7]. Скорость возобновления репликативно-компетентного вируса пытались снизить за счет экспрессии вирусных генов вируса-помощника в составе двух плазмид [3, 4, 6, 7, 15]. Наличие разных транскриптов *gag-pol*- и *env*-генов копирует естественный процесс сплайсинга первичного транскрипта ретровирусом, что провируса в клетке и, по мнению авторов, уменьшает вероятность взаимодействия гомологичных последовательностей вектора и «расчлененного» генома вируса-помощника. Такое глубокое модифицирование генома вируса-помощника привело к снижению уровня транскрипции вирусной РНК и экспрессии вирусных генов по сравнению с диким вирусом [4]; титр продуцируемого упаковочными клетками репликативно-дефектного вектора был на несколько порядков ниже титра дикого вируса [3, 4, 7, 15]. Существенный вклад в снижение уровня транскрипции модифицированного вируса-помощника может вносить делетирование 3'LTR, вовлеченного в регуляцию энхансерной активности 5'LTR [19], а также *цис*-активных последовательностей из 3'-некодирующей области, участвующих в специфическом взаимодействии с клеточными факторами [20].

Представляемые нами упаковочные клетки на основе перепелиных клеток QT6 содержат интегрированный вирус-помощник p td daPr-RSV-Ce⁻PS⁻Neo, созданный на основе трансформационно-дефектного мутанта адаптированного к уткам варианта пражского штамма вируса саркомы Рауса (td daPr-RSV-C) [2]. Новые упаковочные клетки должны продуцировать репликативно-дефектный ретровирусный вектор С-подгрупповой специфичности в количестве, сопоставимом с титром исходного адаптированного к уткам варианта Pr-RSV-C, в отсутствие продукции вируса-помощника. При создании конструкции вируса-помощника p td daPr-RSV-Ce⁻PS⁻Neo мы ограничились минимально необходимыми изменениями в геноме адаптированного генома ретровируса, предотвращающими

включение последовательностей вируса-помощника в состав псевдотипированного вириона на упаковочных клетках. Делетировали *цис*-активные последовательности ψ упаковочной области 5'-некодирующего района td daPr-RSV-C и короткие повторы (E), фланкирующие *src* [2]. Репликативно-дефектный вектор pJD214Hu несет ген гигромицинофосфотрансферазы под контролем промотора из 5'LTR вируса некроза селезенки (SNV) и не имеет участков гомологии с вирусом-помощником p td daPr-RSV-Ce⁻PS⁻Neo. Это снижает риск рекомбинаций между последовательностями репликативно-дефектного вектора и вируса-помощника на упаковочных клетках. Публикуемые данные свидетельствуют о том, что упаковочные клетки F18/pJD, содержащие интегрированный вирус-помощник p td daPr-RSV-Ce⁻PS⁻Neo, экспрессируют вирусные белки на уровне, характерном для исходного daPr-RSV-C, продуцируют репликативно-дефектный вектор pJD214Hu с титром 10⁶ КОЕ/мл, что аналогично продуктивности daPr-RSV-C. Наличие вируса-помощника в продуцируемом упаковочными клетками векторном пуле не детектируется методом дот-блот-гибридизации.

Материалы и методы. *Плазмиды.* p td daPr-RSV-Ce⁻PS⁻Neo содержит клонированный в составе pUC19 геном вируса-помощника [2, 21] (рис. 1, б);

pJD214Hu несет последовательности репликативно-дефектного вектора на основе SNV, клонированные в составе pBR322 (рис. 1, в).

Ферменты. В работе использованы эндонуклеазы рестрикции («Boehringer Mannheim», ФРГ), T4 ДНК-лигаза («Promega», США), фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *Escherichia coli* («Boehringer Mannheim»).

Клетки и среды. QT6 (клетки фибросаркомы перепелки, свободные от эндогенных ретровирусных последовательностей) [23] любезно предоставлены д-ром Г. Калоти (Институт Кюри, Франция) и д-ром Я. Гериком (Институт молекулярной генетики Чешской Академии Наук, Чехия). QT6-клетки культивировали на среде DMEM/F10 (1:1) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки («Биопол», Россия) и 1 % куриной сыворотки (Институт молекулярной генетики ЧАН). Гибридомные клетки линии HY.21.6 (E. Humfries), продуцирующие anti-p27gag антитела, получены от д-ра Я. Герика (Институт молекулярной генетики ЧАН), культивировали на среде DMEM/F10 (1:1) с добавлением 10 % телячьей сыворотки («Sigma», США).

Трансфекция. Плазмидную ДНК вируса-помощника вводили в QT6-клетки методом электропорации [22]. Плазмидную ДНК pJD214Hu век-

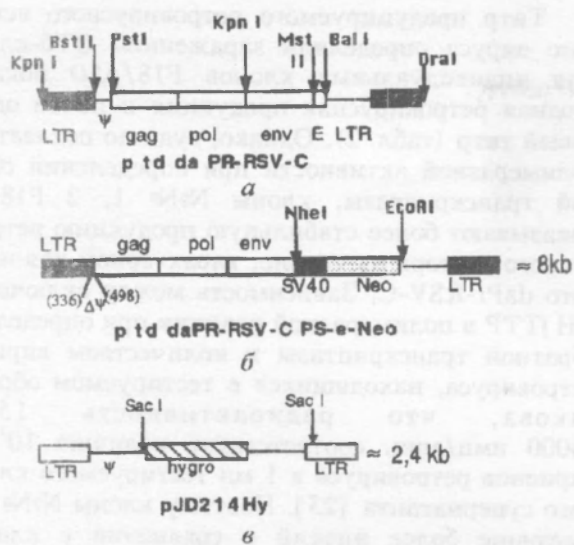


Рис. 1. Схематическое изображение базовых ретровирусных конструкций: а — провирус трансформационно-дефектного мутанта адаптированного к уткам варианта пражского штамма RSV (td daPr-RSV-C); б — вирус-помощник p td daPr-RSV-Ce⁻PS⁻Neo; в — репликативно-дефектный вектор pJD214Hy. Кодированные последовательности вирусных генов, а также концевых повторов (LTR) и промотора вируса SV40 обозначены прямоугольниками. Стрелками показаны сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции, использованных при создании ретровирусных конструкций

торного вируса вводили в упаковочные клетки с помощью липофектинового реагента DOTAP: 2 мкг плазмидной ДНК трансформировали 600—700 тыс. упаковочных клеток (монослой 50—60 %) на чашке диаметром 60 мм («Costar», США). Затем клетки селектировали на среде с добавлением гигромицина В («Boehringer Mannheim», ФРГ) (50 мкг/мл). Индивидуальные клоны отбирали и культивировали в течение 2—3 месяцев для определения титра продуцируемого репликативно-дефектного вектора.

Определение вирусных белков методом ELISA. Продукцию вирусных белков детектировали методом твердофазного иммуоферментного анализа с anti-p27gag антителами [24]. p27gag кодируется геном gag и является капсидным белком вириона. Anti-p27gag получали из гибридомы HY.21.6 [2].

Продукцию p27gag определяли в супернатантах и клеточных лизатах упаковочных клеток методом прямого ИФА [24] с anti-p27gag в количестве 0,8 мкг на лунку. Биотинилированные антитела кролика против IgG мыши («ДиаГен», Россия) и авидин-пероксидазу («Sigma», США) в разведении 1:500 и 1:1500 соответственно применяли для определения p27gag в лизатах упаковочных клеток.

Супернатанты упаковочных клонов тестировали мечеными пероксидазой конъюгированными антителами кроль—антимышь в разведении 1:800 [2].

Обратную транскриптазу определяли в течение 1 ч при температуре 42 °С в 25 мкл образца, содержащего 1 мкмоль водного раствора [³H]ТТР (5 · 10⁶ имп · мин⁻¹ · мл⁻¹) («Amersham», Англия); 5 мкг poly(rA) · pdT₁₂₋₁₈ («Promega», США); 10 mM трис-HCl, pH 7,4; 10 mM DTT (дитиотреитол); 5 mM MgCl₂; 0,05 %-й Triton X-100 («Merck», ФРГ); 15 мкл супернатанта упаковочного клона. [³H]ТТР, включенный в состав oligo(dT), отделяли от несвязавшегося [³H]ТТР нанесением на бумагу DE 81 («Whatman», США) и последующей стмывкой 5 %-м раствором гидрофосфата натрия [25].

Определение титра рекомбинантного ретровирусного вектора. Титр репликативно-дефектного векторного вируса pJD214Hy, несущего ген устойчивости к гигромицину В (HmB), определяли, инфицируя QT6-клетки серийными разведениями вирусных стоков, продуцируемыми упаковочными клетками (200 мкл разведенного стока на чашку Петри диаметром 6 мм), по методике, описанной в работе [26]. Селекцию зараженных клеток вели на среде с HmB (50 мкг/мл).

Стоки репликативно-дефектного векторного вируса pJD214Hy собирали каждые двое суток после добавления свежей среды, центрифугировали (1500 об/мин) в течение 5 мин для удаления дебриса, хранили при -70 °С.

Выделение вирусной РНК и дот-блот-гибридизация. Вирусную РНК репликативно-дефектного вектора pJD214Hy выделяли из 70 мл вирусного стока. Вирионы осаждали ультрацентрифугированием (35 000 об/мин, «Beckman» SW 40) при температуре 4 °С в течение 2 ч. Осадок растворяли в 200 мкл воды и выделяли РНК по методике [27]. Пробы вирусной векторной РНК и РНК Pr-RSV-C количестве 150, 80, 40 и 20 нг наносили на нейлоновую мембрану и гибридизовали с соответствующим зондом. Дот-блот-гибридизацию с плазмидными зондами осуществляли, как описано [3], используя нейлоновые фильтры Hybond («Amersham») для переноса РНК и [³²P] random priming kit для синтеза зондов с последовательностями плазмиды p td daPr-RSV-Ce⁻ и SacI-фрагментом (hygro) pJD214Hy (1 · 10⁶ имп · мин⁻¹ · мл⁻¹).

Для определения гомологии между последовательностями вируса-помощника td Pr-RSV-Ce⁻PS⁻Neo и репликативно-дефектного вектора pJD214Hy пользовались нуклеотидными последовательностями из Gene Bank и программой Genepro «Riverside Scientific» (США).

Результаты и обсуждение. Трансформацион-

но-дефектный мутант адаптированного варианта Pr-RSV-C (td da Pr-RSV-C) [28] использован как основа для создания вируса-помощника (рис. 1, а). Модифицирование исходного провируса td daPr-RSV-C при создании конструкции вируса-помощника td daPr-RSV-Ce⁻PS⁻Neo направлено на снижение вероятности включения собственной геномной РНК в состав ретровирусной частицы на упаковочных клетках. Делетирование сигналов упаковки ψ проводили, исключая *Bst*II-*Pst*I-фрагмент 5'-некодирующей области вируса-помощника [2]. E-элемент [29] делегировали, исключая *Mst*II-*Bal*I-фрагмент из исходного провируса td daPr-RSV-C (рис. 1, а), как описано ранее [2]. *Nhe*-*Eco*RI-фрагмент *pBR322SV40Neo* с последовательностями неомидинфосфотрансферазы под промотором вируса SV40 включили в состав вируса-помощника по *Sac*I [2]. Это позволяет вести селекцию упаковочных клонов в культуре клеток (рис. 1, в).

Экспрессию структурных генов ретровирусов *gag*, *pol*, *env* получили введением в культуру перепелиных клеток QT6 клонированного в составе бактериальной плазмиды *pUC19* провируса вируса-помощника р td daPr-RSV-Ce⁻PS⁻Neo, как описано ранее [2]. Интегрированный в геном QT6-клеток дефектный по упаковочным последовательностям провирус вируса-помощника должен продуцировать вирусные белки Gag, Pol, Env в отсутствие продукции полноценных вирусных частиц. 18 индивидуальных клонов упаковочных клеток тестировали на *p27gag* методом твердофазного иммуноферментного анализа — ELISA (табл. 1). *p27gag* обнаружили и в клеточном лизате, и в супернатанте упаковочных клонов. Данные табл. 1 свидетельствуют о том, что клоны упаковочных клеток F5, F9, F16, F18 способны продуцировать *p27gag* на уровне, сопоставимом с таковым у клеток, содержащих последовательности полного провируса daPr-RSV-C (QT6-daPR-RSV-C, табл. 1), и необходимым для упаковки репликативно-дефектного ретровирусного вектора.

Чтобы определить продуктивность упаковочных клеток, 10 упаковочных клонов трансформировали плазмидой *pJD214Hu* с последовательностями репликативно-дефектного вектора. Индивидуальные клоны клеток Fn/*pJD* культивировали в течение двух месяцев для определения ретровирусного вектора. О наличии ретровируса судили по присутствию обратной транскриптазы в супернатантах упаковочных клеток. Из 75 культивированных индивидуальных клонов только в пяти клонах F18/*pJD* выявлена стабильная ретровирусная продукция (табл. 2).

Титр продуцируемого ретровирусного векторного вируса определяли заражением QT6-клеток. Для индивидуальных клонов F18/*pJD* показана сходная ретровирусная продукция и почти одинаковый титр (табл. 2). Однако, судя по показателям полимеразной активности при определении обратной транскриптазы, клоны №№ 1, 2 F18/*pJD* показывают более стабильную продукцию ретровирусного вектора на уровне, характерном для исходного daPr-RSV-C. Зависимость между включением [³H]ТТФ в полимеразной реакции при определении обратной транскриптазы и количеством вирионов ретровируса, находящихся в тестируемом образце, такова, что радиоактивность 1500—16000 имп/мин. соответствует наличию 10⁵—10⁶ вирионов ретровируса в 1 мл тестируемого клеточного супернатанта [25]. Поэтому клоны №№ 3, 4, имеющие более низкий в сравнении с клонами №№ 1, 2 уровень радиоактивности при определении обратной транскриптазы, не показали значительной разницы в титре вируса, определенного вследствие заражения QT6 (табл. 2).

Продуктивность новых упаковочных клеток F18/*pJD* по сравнению с аналогичными (на основе QT6) упаковочными клетками QenvA, содержащими вирус-помощник на базе BH-RSV штамма RSV [3], выше в 10—100 раз и сопоставима с наиболее высокопродуктивными птичьими упаковочными клетками «Isolde» [4, 5], созданными на основе вируса птичьего лейкоза (ALV). Титр продуцируемого F18/*pJD* псевдотипированного *pJD214Hu* аналогичен титру daPr-RSV-C. Это свидетельствует о удачном сочетании типа клеток, последовательностей вируса-помощника и вектора, обеспечивающем высокую продуктивность системы.

В процессе культивирования упаковочных клеток, продуцирующих рекомбинантный репликативно-дефектный вектор, уже в течение первых двух-трех недель часто детектируется репликативно-компетентный вирус [15—17]. Он появляется в пуле продуцируемого векторного вируса в результате рекомбинаций с вирусом-помощником либо с эндогенными ретровирусными последовательностями [16, 17].

Чтобы предупредить рекомбинации, мы использовали в своей работе QT6-клетки, свободные от эндогенных ретровирусных последовательностей, а также репликативно-дефектный вектор, не имеющий участков гомологии с вирусом-помощником. Для детекции вируса-помощника в продуцируемом пуле ретровирусного вектора мы посчитали необходимым длительное (более трех месяцев) культивирование вектор-продуцирующих клеток для распространения чужеродного вируса.

Таблица 1
Продукция p27gag индивидуальными клонами упаковочных клеток

Клон	p27gag	
	в клеточном лизате (OD405)*	в клеточном супернатанте (OD405)*
F5	2,497	2,230
F9	2,507	—
F16	2,100	1,350
F18	3,050	1,520
F19	1,900	2,400
F20	1,508	2,250
F25	1,703	2,200
F26	1,823	2,300
F28	1,670	2,250
F34	1,413	1,600
QT6	1,480	1,100
QT6-daPr-RSV***	2,341	2,601
ЛСА**	0,172	0,132

Примечание. *Определяли методом ELISA; **ЛСА — лошадиный сывороточный альбумин, использованный как отрицательный контроль; ***QT6-daPr-RSV — QT6, трансформированные исходным daPr-RSV.

Таблица 2
Продукция ретровирусного вектора pJD214Hu индивидуальными клонами упаковочных клеток

Клон	Полимеразная активность супернатантов упаковочных клонов, радиоактивность, имп/мин									Титр векторного вируса на QT6, КОЕ/мл
	Номер пассажа									
	2-й	3-й	4-й	5-й	6-й	7-й	8-й	9-й	10-й	
F18/pJD										
1	920	420	1276	4000	2108	12970	10408	3088	3188	5,4 · 10 ⁶
2	—	—	2514	8392	2502	18886	27556	9090	2322	4,8 · 10 ⁶
3	1122	184	623	1696	968	986	—	856	370	4,9 · 10 ⁶
4	—	—	1055	4132	1005	910	—	996	445	4,4 · 10 ⁶
5	—	—	1908	5004	1678	4610	—	10440	695	5,1 · 10 ⁶
F5/pJD	164	—	—	—	—	—	—	—	—	—
F9/pJD	170	—	—	—	—	—	—	—	—	—
F16/pJD	166	—	—	—	—	—	—	—	—	—
F19/pJD	138	—	—	—	—	—	—	—	—	—
F20/pJD	114	—	—	—	—	—	—	—	—	—
F25/pJD	110	—	—	—	—	—	—	—	—	—
F26/pJD	126	—	—	—	—	—	—	—	—	—
F28/pJD	225	—	—	—	—	—	—	—	—	—
F34/pJD	238	—	—	—	—	—	—	—	—	—
QT6	18-	—	—	—	—	—	—	—	—	—
daPr-RSV-C	—	—	16090	—	—	—	—	—	—	1,1 · 10 ⁶ , БОЕ/мл*

Примечание. Полимеразная активность супернатантов упаковочных клонов выявлена по включению [³H]ТТР в реакции обратной транскрипции. Титр ретровирусного вектора pJD214Hu определяли, заражая клетки QT6 серийными разведениями супернатантов клонов упаковочных клеток F18/pJD. *БОЕ — бляшкообразующие единицы.

Последовательности вируса-помощника в пуле продуцируемого F18/pJD-клетками векторного вируса pJD214Hu определяли дот-блот-гибридизацией. РНК репликативно-дефектного вектора pJD214Hu, продуцируемого клонами №№ 1—5 упаковочных клеток F18/pJD, тестировали на наличие последовательности вируса-помощника гибридизацией с плазмидным зондом p td daPr-RSV-Ce⁻ (рис. 2, Б). Зонд, содержащий SacI-фрагмент pJD214Hu — последовательности гиргомидинфотрансферазы (huggo), использовали для определения последовательностей репликативно-дефектного вектора pJD214Hu в вирусной РНК (рис. 2, А). В образцах вирусной РНК из стоков, продуцируемых упаковочными клонами №№ 1—5 F18/pJD, зарегистрирован положительный сигнал в гибридизации с зондом huggo и не обнаружен сигнал в гибридизации с зондом, несущим последовательности вируса-помощника. Это свидетельствует о том, что пул продуцируемого клонами №№ 1—5 упаковочных клеток F18/pJD репликативно-дефектного вектора pJD214Hu не содержит последовательностей вируса-помощника. Условия реакции позволяют получить четкий положительный сигнал при связывании 10 нг РНК Pr-RSV-C с последовательностями вируса-помощника (рис. 2, Б). Отсутствие положительного сигнала в гибридизации 150 нг РНК вирусного вектора дает основание предположить, что возможное недетектируемое дот-блот-гибридизацией содержание в этих стоках РНК вируса-помощника составляет менее 10 нг. Это соответствует менее 6 % исходного пула ретровирусного вектора pJD214Hu. Аналогичные данные в гибридизации РНК ретровирусного вектора с последовательностями вируса-помощника, продуцируемого упаковочными клетками ψ2 на базе мышинного вируса лейкоза Молони (M-MuLV), получены в работе [30]. Показательно, что при создании конструкции вируса-помощника авторы использовали ту же стратегию минимального модифицирования генома M-MuLV и делетирования ψ упаковочной области.

Использованный нами подход, заключающийся в минимальном модифицировании генома адаптированного варианта ретровируса при создании конструкции вируса-помощника, оказался плодотворным. Упаковочные клетки F18/pJD продуцируют репликативно-дефектный ретровирусный вектор с высоким титром, не загрязненный последовательностями вируса дикого типа. Новые упаковочные клетки показали продукцию вирусных белков на уровне QT6, инфицированных daPr-RSV-C. Высокий уровень экспрессии вирусных генов упаковочными клетками свидетельствует о том, что делети-

рование *цис*-активных последовательностей ψ упаковочной области и коротких повторов E генома td daPr-RSV-C не оказало существенного влияния на транскрипцию вируса-помощника. Продуктивность упаковочных клеток F18/pJD, несущих вирус-помощник на базе RSV, в 10—100 раз выше по сравнению с C3, DSN и DAN [7], имеющими SNV-последовательности в качестве вируса-помощника, и одинакова с продуктивностью исходного daPr-RSV-C на QT6. Такие показатели описаны для наиболее широко используемых упаковочных клеток на основе M-MuLV [30] и вируса птичьего лейкоза (ALV) «Isolde» [5]. Упаковочная линия «Haydee» [6] продуцирует ретровирусный вектор C-подгрупповой специфичности с титром 10³ КОЕ/мл, что в 1000 раз уступает продуктивности нашей упаковочной линии F18/pJD.

Детальное изучение процесса сборки ретровирусной частицы показало, что геномная РНК вируса, имеющая определенную вторичную структуру в упаковочной области, включается в состав вириона в процессе взаимодействия с белком Gag [31]. Участие различных продуктов гена gag RSV в «узнавании» геномной РНК ретровируса было предметом пристального внимания исследователей. Подробный анализ роли отдельных участков белка Gag в процессе сборки вириона показал, что делетирование различных функциональных участков gag не приводит к значительному снижению уровня упаковки собственной РНК ретровируса [13, 14]. А наличие единичных незначущих точечных замен в gag ретровируса в сочетании с полной утратой ψ упаковочной области генома сопряжено с увеличением включения чужеродных последовательностей в состав ретровирусной частицы [11, 14]. Так, у варианта SE21Q1b RSV единичные незначущие точечные замены в gag, накопленные в процессе пассирования на перепелиных эмбриональных фибробластах, сочетаются с полным отсутствием последовательностей упаковочной области ψ. Показано, что чужеродная (клеточная) РНК включалась в состав ретровирусных частиц, продуцируемых этими природными упаковочными клетками, в гораздо большем количестве, чем собственная. РНК SE21Q1b детектировалась лишь в 1 % продуцируемого этими природными упаковочными клетками вируса [11]. Накопление незначущих точечных замен в gag адаптированного daPr-RSV-C происходило при пассировании его на утиных эмбриональных фибробластах [21]. При создании конструкции вируса-помощника p td daPr-RSV-Ce⁻ PS⁻Neo мы полностью делетировали *цис*-активные последовательности ψ упаковочной области и обращенные повторы E. Этого оказалось достаточно для предот-

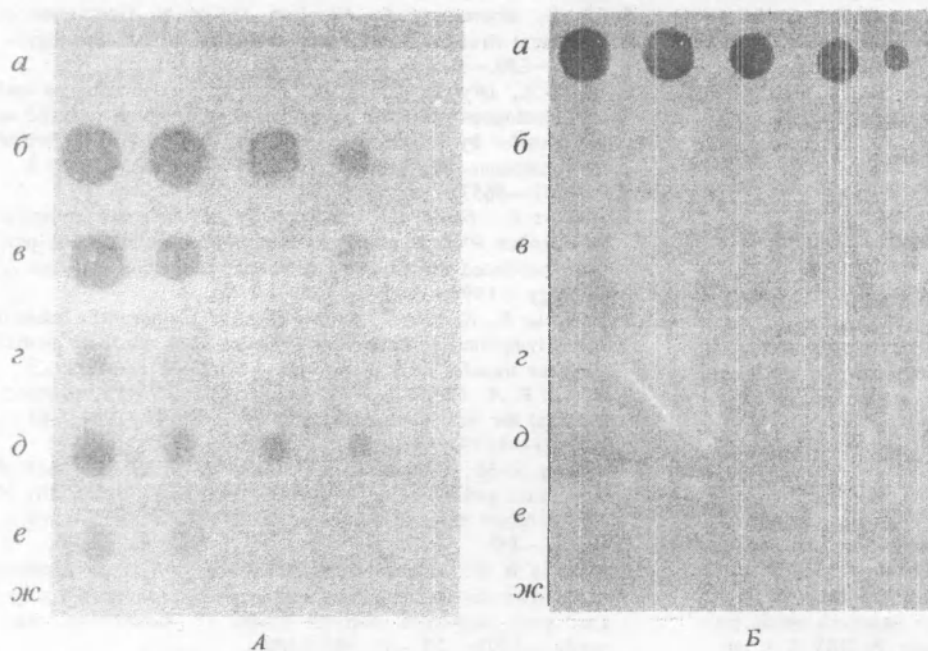


Рис. 2. Дот-блот-гибридизация вирусной РНК вектора *pJD214Hy*. РНК репликативно-дефектного вектора, который продуцируется индивидуальными клонами №№ 1—5 упаковочных клеток F18/*pJD* (б—е). Вирусную РНК пражского штамма вируса саркомы Рауса (Pr-RSV-C) использовали как позитивный контроль (а), клеточную РНК эмбрионального мозга человека (ж) использовали в качестве негативного контроля. Блот гибридовали с плазмидными зондами: А — *hygro-SacI*-фрагмент *pJD214Hy* с последовательностями тигромидинфосфотрансферазы; Б — *pr td daPr-RSV-Ce* — с последовательностями вируса-помощника

вращения включения РНК вируса-помощника в состав ретровирусной частицы на упаковочных клетках F18/*pJD*: дот-блот-гибридизация не выявила присутствия RSV-последовательностей в вирусных стоках репликативно-дефектного вектора *pJD214Hy* (рис. 2, Б). Упаковочные клетки на основе *daPr-RSV-C* — адаптированного варианта RSV наряду с SE21Q1b являют собой еще один пример того, что утрата упаковочной области ψ и накопление незначачих точечных замен в гене *gag* ретровируса, происходящее в процессе пассирования на клетках неспецифического хозяина, играют существенную роль в способности ретровируса включать чужеродную РНК в состав ретровирусной частицы.

Тот факт, что адаптированные варианты ретровирусов, дефектные по упаковочным последовательностям, включают собственную геномную РНК в состав вириона в ничтожно малом, недетектируемом количестве, открывает новые возможности для решения проблемы возобновления репликативно-компетентного вируса-помощника в ретровирусных репликативно-дефектных системах. Применение адаптированного варианта ретровируса в качестве основы для создания вируса-помощника в новых упаковочных клетках позволило ограничиться минимальными изменениями генома вируса дикого типа при создании конструкции вируса-помощника. Это обеспечило высокую продуктивность системы и дало возможность избежать возобновле-

ния репликативно-компетентного вируса-помощника.

Новые упаковочные клетки на базе адаптированного варианта Pr-RSV-C (F18/*pJD*) в состоянии продуцировать ретровирусный векторный вирус *pJD214Hy* C-подгрупповой специфичности с титром 10^6 КОЕ/мл. В процессе длительного пассирования этих упаковочных клеток не было выявлено последовательностей вируса-помощника в пуле продуцируемого векторного вируса. Репликативно-дефектный ретровирусный вектор *pJD214Hy*, «одетый» на упаковочных клетках F18/*pJD* в Е1v C-подгрупповой специфичности может быть использован для переноса генов как в культуре клеток, так и *in vivo*.

Авторы выражают глубокую благодарность А. Евсикову за помощь в оформлении иллюстративного материала статьи.

Г. В. Кайда, С. М. Серов, А. А. Михайлик, П. М. Болтовцев, В. И. Кашуба, А. В. Риндин

Нові пакувальні клітини на основі адаптованого варіанту вірусу саркоми Рауса

Резюме

Створено нові пакувальні клітини F18/*pJD*, які містять вірус-помічник на основі трансформаційно-дефектного мутанта адаптованого до качок варіанту пражського штаму вірусу саркоми Рауса (*td daPr-RSV-C*), що продукують репликативно-дефектний ретровірусний вектор з титром 10^6 КУО/мл. Дилетування *cis*-активних послідовностей ψ пакувальної об-

ласті та обернених повторів (E), фланкуючих src, адаптованого варіанту ретровірусу при створенні конструкції вірусопомічника дозволило отримати пул векторного вірусу без послідовностей вірусопомічника.

I. V. Kaida, S. M. Serov, A. A. Michailik, P. M. Boltovets,
V. I. Kashuba, A. V. Rynditch

New packaging cells based on the adapted variant of the Rous sarcoma virus

Summary

We have constructed a new transformation-defective mutant of duck-adapted variant of Rouse sarcoma virus Prague strain subgroup C (td daPr-RSV-C) — based packaging cell line F18/pJD which produces replication-defective vector with a titer 10^7 CFU/ml. Deletion of cis-acting sequences of ψ packaging region and E (direct repeat flanking src) in the adapted variant of retrovirus allowed us to obtain a pool of retrovirus vector without helper virus sequences.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Кайда И. В., Рындич А. В. Применение ретровирусных векторов для целенаправленного переноса генов у птиц // Биополимеры и клетка.—1997.—13, № 1.—С. 5—13.
2. Кайда И. В., Цыба Л. Б., Болтовец П. Н., Кашуба В. И. Создание системы для ретровирусного переноса генов посредством векторного вируса на основе Pr-RSV-C с расширенной хозяйской специфичностью // Там же.—№ 5.—С. 408—416.
3. Boerkoel C. F., Federspiel M., Salter D. W. et al. A new retroviral system based on the Bryan Strain of Rous Sarcoma Virus // J. Virol.—1993.—195.—P. 669—679.
4. Savatier P., Bagnis C., Thoraval P. et al. Generation of a helper cell line for packaging avian leucosis virus-based vectors // Ibid.—1989.—63.—P. 513—522.
5. Cosset F.-L., Legras C., Savatier P. et al. A new avian leucosis virus-based packaging cell line that uses two separate trans-complementin helper genomes // Ibid.—1990.—64.—P. 1070—1078.
6. Cosset F.-L., Ronfort C., Molina R.M. et al. Packaging cells for avian leucosis virus-based vectors with various host ranges // Ibid.—1991.—66.—P. 5671—5676.
7. Dougherty J., Wisniewski R., Yang S. et al. New retrovirus helper cell line with almost no nucleotide sequence homology to retrovirus vectors // Ibid.—1989.—63.—P. 3209—3212.
8. Katz R., Terry R., Skalka A. A conserved cis-acting sequence in the 5' leader of Avian Sarcoma Virus RNA is required for packaging // Ibid.—1986.—59.—P. 163—167.
9. Sorge J., Ricci W., Hugnes S. Cis-actin RNA packaging locus in the 115-nucleotide direct repeat of RSV virus // Ibid.—1983.—48.—P. 667—675.
10. Donze O., Spahr P.-F. Role of the open reading frames of RSV leader RNA in translation and genome packaging // EMBO J.—1992.—11.—P. 3747—3757.
11. Anderson D. J., Lee P., Levine K. L. et al. Molecular cloning and characterization of the RNA packaging defective retrovirus SE2101Q1b // J. Virol.—1992.—66.—P. 204—216.
12. Aronoff R., Linial M. Specificity of retroviral RNA packaging // Ibid.—1991.—65.—P. 71—80.
13. 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.
14. Sakalian M., Wills J. W., Vogt V. Efficiency and selectivity of RNA packaging by RSV gag deletion mutant // Ibid.—1994.—68.—P. 5969—5981.
15. Hu S., Bruszewski J., Nicolson M. et al. Generation of competent virus in the REV helper cell line C3 // Virology.—1987.—159.—P. 446—449.
16. Girod A., Drynda A., Cosset F.-L. et al. Homologous and nonhomologous retroviral recombinations are both involved in the transfer by infectious particles of defective ALV-derived transcomplementing genomes // J. Virol.—1996.—70, N 8.—P. 5651—5657.
17. Ronfort C., Girod F., Cosset F. et al. Defective retroviral endogenous RNA is efficiently transmitted by infectious particles produced on an avian retroviral packaging cell line // Virology.—1995.—207.—P. 271—275.
18. Donahue R., Keßler S., Bodine D. et al. Helper virus induced T cell lymphoma in nonhuman primates after retroviral mediated gene transfer // J. Exp. Med.—1992.—176.—P. 1125.
19. Norton P. A., Coffin J. M. Characterization of RSV sequences essential for viral gene expression // J. Virol.—1981.—61.—P. 1171—1179.
20. Molina R.-M., Chebloune Y., Verdier G. et al. Influence of expression and cis-acting sequences from ALVs on stability of (ALV)-based retrovirus vectors // Life Sci.—1995.—318.—P. 541—551.
21. Кашуба В. И., Кавсан В. М., Рындич А. В. и др. Полная нуклеотидная последовательность адаптированного к клеткам уток варианта вируса Рауса // Молекуляр. биология.—1993.—27.—С. 436—450.
22. Погребной П., Серов С., Кленчин В. и др. Экспрессия гена трансформирующего фактора роста типа L, перенесенного ретровирусным вектором в клетки А431 // Там же.—С. 833—838.
23. Moscovici C., Moscovici H., Jimenez M. et al. Continuous tissue culture cell lines derived from chemically induced tumors of Japanese guail // Cell.—1977.—11.—P. 95—103.
24. Clark D., Dougherty R. Detection of avian oncovirus group-specific antigens by the enzyme-linked immunosorbent assay // J. Gen. Virol.—1980.—47.—P. 283—291.
25. Tereba A., Murti K. A very sensitive biochemical assay for detecting and quantitating avian oncornaviruses // Virology.—1977.—P. 166—176.
26. Svoboda J., Hlozaneck I., Machala O. et al. Rescue of Rous sarcoma virus in mixed cultures of virogenic mammalian and chicken cells, treated and untreated with Sendai virus and detected by focus assay // J. Gen. Virol.—1968.—2.—P. 461.
27. Hajkova V., Kristek J., Geryk J. et al. Characterization of mutant of the Pr-RSV-C inducing fusiform transformation of avian fibroblasts in vitro // Fol. biol. (Praha).—1982.—28.—P. 160—176.
28. Кашуба В. И., Зубак С. В., Рындич А. В. и др. Структура нового трансформационно-дефектного мутанта вируса саркомы Рауса // Докл. Акад. Наук СССР.—1989.—304.—С. 206—208.
29. Kashuba V., Zubak S., Rynditch A. et al. The nucleotide sequence of the region of src gene deletion in transformation-defective RSV adapted to semi-permissive host cells // Nucl. Acids Res.—1989.—17.—P. 3294.
30. Mann R., Mulligan R., Baltimore D. Construction of retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus // Cell.—1983.—33.—P. 153—159.
31. Knight J., Zhi Hai Si, Stoltzfus M. A base-paired structure in the avian sarcoma virus 5' leader is required for efficient encapsidation of RNA // J. Virol.—1994.—68, N 7.—P. 4393—4402.

УДК 517.15:516.858

Поступила в редакцию 28.01.98