

крахмалов. Установлено положительное влияние кукурузных крахмалов с повышенным содержанием амилозы, выделенных из зерна линий-носителей мутантных генов структуры эндосперма *ae 1 su₂*, на процессы индукции каллуса, эмбриоидов и регенерации растений. Отобраны перспективные для дальнейших исследований препараты химически модифицированных крахмалов Д-5а і Д-5в.

Gelling capacity and morphogenetic effect in spring barley anther culture *in vitro* of natural and chemically modified starches was investigated. Positive influence of corn starches with high amilose content, obtained from seeds of corn lines, which were the carriers of natural mutations of endosperm structure genes *ae* and *su₂*, on the embryogenesis and green plant regeneration was revealed. Perspective for further investigations preparations of chemically modified starches D-5a and D-5b were selected.

ВАГИНА И.Н., АНОПРИЕНКО О.В., ЗАХАРУК Е.А., СТРОКОВСКАЯ Л.И.

*Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Украина; 03143 Киев, ул. Заболотного, 150; e-mail: ira_vag@ukr.net*

ПЕРЕНОС ГЕНА β -ИНТЕРФЕРОНА В КЛЕТКИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ РЕКОМБИНАНТНЫМ БАКУЛОВИРУСНЫМ ВЕКТОРОМ

Интерферон β (IFN- β) является одним из членов семейства полипотентных цитокинов — интерферонов, играющих важную роль в системе врожденного иммунитета. Интерфероны подавляют репликацию и распространение вирусных, бактериальных и паразитарных патогенов, модулируют иммунный ответ и оказывают антипролиферативное воздействие на некоторые типы клеток. В клинике интерфероны используют для лечения ряда вирусных инфекций, аутоиммунных заболеваний — рассеянного склероза и ревматоидного артрита, а также в противоопухолевой терапии. IFN- β усиливает апоптоз опухолевых клеток, осуществляет торможение ангиогенеза в опухолевых тканях, снижает частоту метастазирования [1]. При этом более чувствительными к IFN- β (по сравнению с IFN- α) являются клетки простаты, меланомы и некоторых других типов опухолей [2]. Однако, результаты многочисленных испытаний IFN- β в клинической практике показали, что он проявляет незначительную активность против опухолей человека, вероятно, вследствие невозможности достижения высокой концентрации интерферона в сыворотке крови пациентов из-за его токсичности, а также достаточно короткого периода “жизни” в организме [3].

Обеспечить высокую локальную продукцию цитокина можно с помощью стратегии, сочетающей клеточную и генную терапию — системы “клеточных векторов”. Предполагается, что такая система должна состоять из трех компонентов — модифицируемых *ex vivo* клеток, характеризующихся определенным тропизмом к месту терапии, рекомбинантного вектора и собственно гена, кодирующего терапевтический агент [3].

В качестве векторных клеток для задач противоопухолевой терапии используют как мезенхимальные стволовые клетки (МСК), так и зрелые фибробласты. Такие клетки должны осуществлять доставку терапевтического агента к опухоли и обеспечивать высокий уровень его экспрессии “на месте”. В настоящее время возрастает интерес к использованию фетальных фибробластов в процессах регенерации поврежденных тканей. Показано, что культивированные фетальные фибробласты влияют на заживление раневых поверхностей в результате их способности вырабатывать элементы межклеточного матрикса, секретировать факторы роста и другие митогены для паракринной регуляции [4].

Фетальные фибробласты обладают более широкими потенциями по сравнению с фибробластами взрослого организма, быстрее размножаются в культуре *in vitro* и возможно могут представлять альтернативный мезенхимальным стволовым клеткам (МСК), более доступный источник для получения “клеточных векторов”. В связи с этим необходимо было проверить возможность использования фетальных фибробластов мыши, трансдуцированных рекомбинантными бакуловирусами, содержащими ген мышинового β -*Ifn* в качестве “клеточных векторов”.

Бакуловирусы (вирусы насекомых) в качестве векторов для генной терапии имеют ряд преимуществ, включающих неспособность вирусов реплицироваться в клетках млекопитающих, широкий спектр трансдуцируемых типов клеток и тканей при отсутствии выраженной цитотоксичности, способность, благодаря структуре генома, включать большие (до 30 тыс. н.п.) фрагменты гетерологичной ДНК [5, 6, 7]. Целью нашей работы было проведение оценки эффективности трансдукции различных клеточных линий млекопитающих бакуловирусным вектором, несущим ген мышинового β интерферона.

Материалы и методы

Клеточные культуры. Монослойную культуру клеток насекомых Sf21 выращивали в среде TC-100 (Sigma) с добавлением 10% FBS при 28 °С. Инфицирование клеток бакуловирусами проводили согласно стандартным процедурам [8].

В работе использовали три линии клеток млекопитающих: НЕК293 (линия клеток эмбриональной почки человека), ММ4 (клеточная линия из меланомы В-16), а также первичные фибробласты мышей линии C57BL/6j, которые получали из мягких тканей 14-дневных эмбрионов методом ферментативной дезагрегации ткани (C57Fb). Все линии клеток культивировали в среде DMEM (Sigma) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки FBS (Sigma), 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина при 37 °С в CO₂-инкубаторе.

Рекомбинантные бакуловирусы и трансдукция клеток млекопитающих. Рекомбинантные бакуловирусы получали на основе вируса ядерного полиэдроа *Autographa californica* (AcMNPV) в экспрессионной системе Bac-to-Bac (Invitrogen). Был сконструирован рекомбинантный бакуловирус Ac-IFN-

GFP, содержащий два гена — репортерный *Gfp* под регуляцией промотора CMV и ген мышиноного β -*Irfn* под регуляцией кассеты CAG. Бакуловирус Ac-CMV-GFP с геном *Gfp* под промотором CMV использовали в качестве контрольного. Вирусы концентрировали центрифугированием при 100 000 г. Титр вирусных препаратов после амплификации и концентрирования составлял $2\text{--}4 \times 10^8$ БОЕ (бляшкообразующих единиц)/мл. Трансдукцию проводили в оптимизированных нами предварительно условиях [9]. Рекомбинантный бакуловирус добавляли в концентрации 200 moi (multiplicity of infection = количество БОЕ на клетку).

Проточная цитофлуориметрия. Эффективность трансдукции определяли по количеству клеток, экспрессирующих светящийся белок, с использованием цитофлуориметра Coulter Epics XL, предварительно анализируя препараты на флуоресцентном микроскопе (Микмед-2ЕС). Подготовку клеток осуществляли как описано ранее [9]. Статистическую обработку результатов трансдукции проводили в соответствии со стандартными методами [10] с презентацией данных в программе Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение

Рекомбинантный бакуловирус Ac-IFN-GFP, содержащий два гена — репортерный *Gfp* под регуляцией промотора CMV и ген мышиноного β -*Irfn* под регуляцией кассеты CAG, был сконструирован для изучения эффективности переноса гена β -интерферона в клетки млекопитающих, в том числе, и в клетки предполагаемых “клеточных векторов” — фетальных фибробластов мыши (C57Fb). Ранее проверялась эффективность работы обоих промоторов в составе бакуловирусов Ac-M-GFP (репортерный ген под регуляцией кассеты CAG) и Ac-CMV-GFP с геном *Gfp* под контролем CMV промотора. Было показано, что рекомбинантный бакуловирус Ac-M-GFP осуществляет более интенсивную и продолжительную экспрессию репортерного GFP [Аноприенко и др. в печати]. В связи с этим, в рекомбинантном бакуловирусе целевой ген мышиноного β -*Irfn* был встроен под регуляцию более сильного промотора. Вектор Ac-CMV-GFP в данном исследовании использовали в качестве контрольного. По литературным данным различные клеточные линии мышей характеризовались очень низкими эффективностью трансдукции и уровнем экспрессии репортерного гена под регуляцией CMV-промотора [11]. Решением этой проблемы мог быть подбор более сильной регуляторной кассеты, модификация поверхностных белков вируса и изменение условий трансдукции. Мы пошли по пути подбора более сильной регуляторной кассеты CAG и оптимизации условий трансдукции. Доза вируса 200 moi обеспечивала удовлетворительную эффективность трансдукции клеток C57Fb на уровне $69,6 \pm 3,8\%$ для вируса Ac-M-GFP и $52,9 \pm 4,2\%$ для Ac-CMV-GFP [Аноприенко и др. в печати]. Однако более высокая концентрация любого вируса (500 moi) хуже переносилась клетками мыши. Таким образом, трансдукцию БВ-вектором с геном β интерферона проводили дозой вируса 200 moi.

Эффективность трансдукции контрольным бакуловирусом Ac-CMV-GFP клеток HEK293, C57Fb и MM4 составляла соответственно $95,8 \pm 2,5\%$,

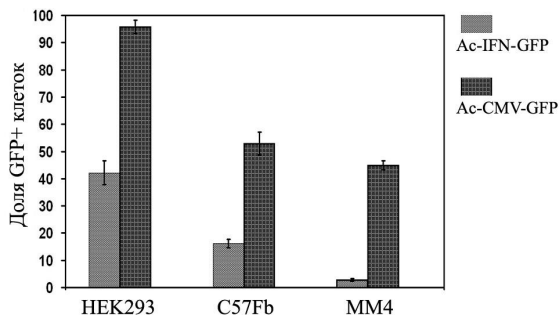


Рис. 1. Эффективность трансдукции клеточных линий HEK293, C57Fb и MM4 рекомбинантными бакуловирусными векторами Ac-CMV-GFP и Ac-IFN-GFP
Примечание: по оси ординат — доля флуоресцирующих (GFP+) клеток (%), по оси абсцисс — типы клеточных линий

52,9±4,2% и 44,9±1,6%. В то время как бакуловир Ac-IFN-GFP в той же дозе трансдуцировал клетки с эффективностью 42,2±4,4%, 16,2±1,6% и 2,8±0,5% соответственно (рис. 1.). Это свидетельствует о том, что эффективность трансдукции БВ-вектором с геном мышинного β -*Irfn* человеческих клеток (HEK293) уменьшилась в 2,3 раза, нормальных клеток мыши (C57Fb) в 3,2 раза и опухолевых клеток мыши (MM4) в 16 раз относительно контрольного вектора.

В качестве причины уменьшения эффективности трансдукции можно предположить активность самого интерферона. Возможно, даже небольшая начальная секреция цитокина приводит к блокированию либо проникновения вируса в клетку, либо экспрессии белков, в том числе и маркерного GFP. Эффективность трансдукции определялась по доле клеток, экспрессирующих репортерный GFP — косвенному показателю проникнувших в клетку активных вирусных частиц. Необходимо отметить, что максимальное количество клеток экспрессирующих Ac-IFN-GFP наблюдалось через 24 и 48 часов после трансдукции, значительное количество светящихся клеток сохранялось через 9 суток, однако экспрессия репортерного гена постепенно уменьшалась, сохраняясь в единичных трансдуцированных клетках на протяжении 20 суток.

Как один из основных противовирусных агентов IFN- β осуществляет подавление биосинтеза белка, по крайней мере, двумя независимыми путями — посредством 2'5'-олиго-аденил синтетазы (OAS) и протеиновой киназы PKR. Оба пути зависят от двуцепочечной РНК, за чувствительность к которой отвечают TLR-3 рецепторы. К удивлению исследователей недавно было установлено, что именно TLR-3, а по другим данным и TLR-9 рецепторы активируются в ответ на инкубацию клеток млекопитающих с бакуловиром [7]. β -интерферон характеризуется значительным плейотропизмом. По данным исследований с использованием микрочипов показано, что более

1000 генов могут изменять свою экспрессию в ответ на действие β -интерферона [12]. Сама процедура трансдукции диким бакуловирусом приводит к увеличению экспрессии некоторых цитокинов, таких как IL-1 β , IFN- α , IL-6 и, по некоторым данным, IFN- β , хотя уровень их секреции незначительный [7]. Воздействие бакуловирусных векторов на клетки млекопитающих, дополненное синтезом мультифункционального β -интерферона, может приводить к изменению профиля экспрессии генов в векторных клетках, что безусловно требует дополнительного изучения. Необходимо также дальнейшее проведение оптимизации конструкции бакуловирусных векторов для целей генной терапии. Так, для выключения экспрессии некоторых “ранних” бакуловирусных генов в клетках млекопитающих было предложено комплексное решение, заключающееся в инактивации универсального для многих вирусных генов транскриптора IE1 [5]. Таким образом, комплексная система “клеточных векторов” нуждается в тщательной оптимизации всех своих компонентов, усиливающих, либо ингибирующих свойства друг друга, от удачного сочетания которых будет зависеть успех их дальнейшего использования.

Литература

1. Zhang F, Lu W, Dong Zh. Tumor-infiltrating macrophages are involved in suppressing growth and metastasis of human prostate cancer cells by IFN- β gene therapy in nude mice // *Clinical Cancer Research*.— 2002.— V.8.— P. 2942–2951.
2. Chawla-Sarkar M., Leaman D.W., Borden E.C. Preferential induction of apoptosis by Interferon (IFN)- β compared with IFN- α : correlation with TRIL/Apo2L induction in melanoma cell lines // *Clinical Cancer Research*— 2001.— V.7.— P. 1821–1831.
3. Studeny M., Marini F.C., Dembinski J.L., Zompetta C., Cabreira-Hansen M., Beke B.N., Champlin R.E., Andreeff M. Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents // *J Natl Cancer Inst*.— 2004.— V.96.— P. 1593–603.
4. Попандопуло А.Г., Корчак О.М., Трунова О.А., Зубов Д.А., Разенкова И.А. К вопросу об обосновании применения культивированных фетальных фибробластов человека в комплексном лечении хронических мезенхимальных дефектов // *Архив клинической и экспериментальной медицины*.— 2004.— Т.13, №1.— С. 55–61.
5. Kenoutis C., Efroze R.C., Swevers L., Lavdas A.A., Gaitanou M., Matsas R., Iatrou K. Baculovirus-mediated gene delivery into Mammalian cells does not alter their transcriptional and differentiating potential but is accompanied by early viral gene expression // *J. Virol*.— 2006.— 80, N8.— P. 4135–4146.
6. Chuang CK, Wong TH, Hwang SM, et al. Baculovirus transduction of mesenchymal stem cells: *in vitro* responses and *in vivo* immune responses after cell transplantation // *Mol Ther*.— 2009.— V.17.— P. 889–896.
7. Chen GY, Shiah HC, Su HJ, et al. Baculovirus transduction of mesenchymal stem cells triggers the toll-like receptor 3 pathway // *J. Virol*.— 2009.— V.83.— P. 10548–10556.
8. King L.A., Possee R.D. The baculovirus expression system. A laboratory guide / London: Chapman and Hall, 1992.— P. 220.
9. Вагина И.Н., Аноприенко О.В., Захарук Е. А., Строковская Л.И., Соломоко А.П. Эффективность доставки генов бакуловирусами в клетки млекопитающих *in vitro* // *Biopolymers and cell*.— 2008.— Т.24, №6.— С. 508–512.

10. *Лакін Г.Ф.* Биометрия.— М.: Высш. шк., 1990.— 352 с.

11. *Hsu C.S., Ho Y.C., Wang K.C., Hu Y.C.* Investigation of optimal transduction conditions for baculovirus-mediated gene delivery into mammalian cells // *Biotechnol. Bioeng.*— 2004.— 88, N1.— P. 42–51.

12. *Hesse D, Sellebjerg F, Sorensen PS.* Absence of MxA induction by interferon beta in patients with MS reflects complete loss of bioactivity // *Neurology.*— 2009.— V.73.— P. 372–377.

Резюме

Сконструйован рекомбінантний бакуловірусний вектор Ac-IFN-GFP, що містить репортерний GFP під регуляцією промотора CMV і ген мишиного β -*Irfn* під регуляцією касети CAG. Показано значительное уменьшение эффективности трансдукции Ac-IFN-GFP по сравнению с контрольным вектором в клеточных линиях HEK293, MM4 и C57Fb.

Сконструйований рекомбінантний бакуловірусний вектор Ac-IFN-GFP, що містить репортерний GFP під регуляцією промотору CMV і ген мишачого β -*Irfn* під регуляцією касети CAG. Показано значне зменшення ефективності трансдукції Ac-IFN-GFP у порівнянні з контрольним вектором в клітинних лініях HEK293, MM4 и C57Fb.

Recombinant baculovirus vector Ac-IFN-GFP with GFP reporter gene under the CMV promoter and mouse β -*Irfn* gene controlled by CAG promoter cassette has been constructed. Significant decrease in transduction efficiency of Ac-IFN-GFP compared to control Ac-CMV-GFP in three cell lines HEK293, MM4 and C57Fb was demonstrated.

ВАСИЛЕНКО М.Ю., КУЧУК М.М., ОВЧАРЕНКО О.О., КУЧУК М.В.

*Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України,
Україна, 03680, Київ, вул. Заболотного, 148, e-mail: mxvasylenko@gmail.com*

ОТРИМАННЯ ТРАНСПЛАСТОМНИХ РОСЛИН *NICOTIANA BENTHAMIANA* ІЗ ГЕНАМИ МІКОБАКТЕРІЇ *(MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS)*

Рослини як об'єкт сучасних генно-інженерних досліджень все частіше привертають до себе увагу дослідників і стають дедалі більш поширеними в біотехнологічних розробках, конкуруючи з класичними об'єктами біотехнологій — бактеріями, дріжджами, культурами клітин тварин та людини. Спочатку за участю рослин розроблялись сучасні методи для вирішення традиційних селекційно-генетичних проблем підвищення продуктивності сільськогосподарських рослин та їх захисту від різноманітних біотичних та абіотичних стресових факторів. Проте зараз набуває популярності другий напрямок, названий “молекулярним виробництвом” (molecular farming), що спеціалізується на отриманні та використанні трансгенних рослин як біореакторів, що продукують цінні для промисловості та медицини органічні сполуки. За останні двадцять років велику кількість цінних білків було