

аллергическими заболеваниями выявлено статистически значимое увеличение частоты двойного “ненулевого” GSTT1/GSTM1 генотипа в комбинации с CYP2C9 генотипом 430C/C (OR = 1.51, p = 0.0335), генотипом 1075C/- (OR = 3.42, p = 0.0029) и генотипом 430C/C, 1075C/- (OR = 3.68, p = 0.0068), по сравнению с группой здоровых доноров.

Таким образом, изученные полиморфные варианты генов CYP1A1, CYP2C9, GSTT1, GSTM1 и NAT2 могут модулировать риск развития социально-значимых болезней легких у жителей Европейской части России, представителей этнически гомогенной популяции русских. Предполагается, что дальнейший анализ полиморфизма данных генов (после перепроверки выявленных закономерностей на больших выборках) поможет выработать критерии оценки риска развития данных мультифакториальных заболеваний и использовать их в качестве прогностического теста для оценки риска развития инфекционных и аллергических болезней легких у русских, жителей Европейской части России.

Работа выполнена при поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (грант № 08-04-12225-офи).

1. М. И. Пелерман, В. А. Корякин Фтизиатрия // М.: Медицина, 1996 г.
2. www.epidemiolog.ru
3. Н. А. Генне, Н. Г. Колосова Современная стратегия лечения детей с бронхиальной астмой // Пульмонология. – 2006. – № 3. – С. 113-118.
4. Л. М. Огородова, Ф. И. Петровский Аллергический ринит и сопутствующая бронхиальная астма. Механизмы взаимосвязи и подходы к фармакотерапии // Пульмонология. – 2006. – № 3. – С. 100-106.
5. С. М. Greenwood, Т. М. Fujiwara, L. J. Boothroyd, M. A. Miller, D. Frappier, E. A. Fanning, E. Schurr, K. Morgan Linkage of tuberculosis to chromosome 2q35 loci, including NRAMP1, in a large aboriginal Canadian family // Am. J. Hum. Genet. – 2000. – V. 67(2). – P. 405-416.
6. А. Г. Чучалин Генетические аспекты бронхиальной астмы // Пульмонология. – 1999. – № 4. – С. 6-10.
7. В. С. Баранов, Е. В. Баранова, Т. Э. Иващенко, М. В. Асеев Геном человека и гены “предрасположенности” (Введение в предиктивную медицину) // СПб.: Интермедика, 2000.

ЛЕНТИВИРУСНЫЕ ВЕКТОРЫ

КАК ЭФФЕКТИВНЫЙ ИНСТРУМЕНТ ДОСТАВКИ ГЕНОВ В КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА

В.В. Гринеv¹, Д.В. Посредник¹, И.Н. Северин², С.М. Космачева², М.П. Потапнев²

¹ - Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

² - ГУ «РНПЦ гематологии и трансфузиологии», Минск, Беларусь

grinev_vv@mail.ru

Многочисленные исследования последних лет, проведенные в ряде лабораторий мира, показывают, что рекомбинантные лентивирусы способны трансдуцировать с высокой частотой широкий спектр клеток, причем как делящихся, так и покоящихся [1]. Кроме того, вектора на основе лентивирусов обеспечивают стабильную интеграцию переносимой конструкции в хромосомальную ДНК, они не иммуногенны, не цитотоксичны и безопасны в плане контаминации вирусом дикого типа [2, 3]. Наличие таких свойств у лентивирусных векторов предполагает, что они могут быть эффективным способом доставки генов в такие типы клеток человека, как лейкозные клетки и мезенхимальные стволовые клетки. Первый из указанных типов клеток невосприимчив или слабо восприимчив к традиционным не-вирусным и вирусным методам переноса генов [4], а второй тип клеток является одним из наиболее привлекательных вариантов клеток-мишеней для клеточной регенерационной медицины и генной терапии *ex vivo* [5, 6]. В связи со всем выше сказанным, в предлагаемой работе мы задались целью определить эффективность переноса *in vitro* репортерных и терапевтических генов в лейкозные клетки человека, а также мезенхимальные стволовые клетки костномозгового происхождения с помощью моно- и бицистронных лентивирусных векторов доставки.

Для получения рекомбинантных псевдотипированных лентивирусов мы использовали трехкомпонентную систему второго поколения, разработанную группой D. Trono [7], а в качестве вирус-продуцирующих клеток нами были выбраны клетки линии 293Т эмбриональной почки человека. Трехкомпонентная система включала один из лентивирусных векторов доставки и два вспомогательных плазмидных вектора: пакующий вектор pCMV_dR8.91 и вектор pMD2.G, кодирующий гликопротеин VSV-G вирусной оболочки. Все три вектора временно ко-трансфецировали в клетки линии 293Т с помощью стандартного метода кальций-фосфатной ко-преципитации, что позволяло нам запустить процесс продукции вирусов. Лентивирусные частицы собирали спустя 72 часа после полного завершения процедуры ко-трансфекции и либо сразу же использовали для трансдукции, либо концентрировали путем ультрацентрифугирования, либо замораживали и хранили при -85°C .

Лентивирусную трансдукцию проводили либо путем стандартной ночной инкубации последних с вирус-содержащим супернатантом в присутствии 8 мкг/мл полибрина, либо путем ночной инкубации, следующей за этапом спинокуляции. В некоторых случаях проводили суперинфекцию (три последовательных раунда трансдукции) клеток-мишеней, что повышало частоту переноса и уровень экспрессии репортерных или терапевтических генов.

Нами обнаружено, что моноцистронные лентивирусные вектора доставки позволяют не только с высокой частотой переносить гены в лейкозные или стволовые клетки человека, но и достигать высокого и стабильного уровня экспрессии репортерных или терапевтических генов в модифицированных клетках. Так, согласно данным проточной цитометрии, с помощью разработанного нами вектора pHR-shAML1/ETO, кодирующего анти-aml1/eto короткие шпилечные РНК, удается модифицировать более 98% клеток линий Kasumi-1 (рис. 1А) или SKNO-1 острого миелоидного лейкоза и клеток линии SEM острого В-лимфобластного лейкоза человека. При этом уровень экспрессии репортерного белка eGFP превышает 7 тыс. условных единиц флуоресценции, а коротких шпилечных РНК – более 4 пМоль на 1 мкг общей клеточной РНК.

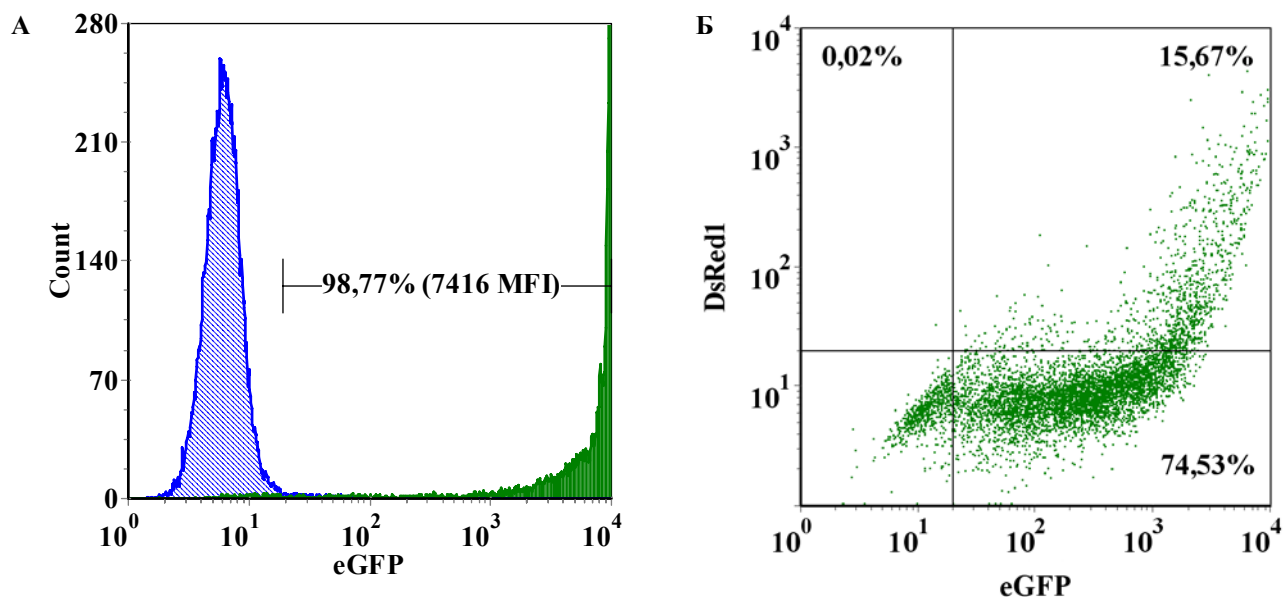


Рис. 1. Репрезентативные данные проточной цитометрии, отражающие эффективность трансдукции различных типов клеток человека с помощью лентивирусных векторов доставки. А) Клетки линии Kasumi-1, трансдуцированные вектором pHR-shAML1/ETO. На рисунке показан процент положительных по репортерному белку eGFP клеток, прошедших трансдукцию (в скобках указана средняя интенсивность флуоресценции клеток). Б) Мезенхимальные стволовые клетки костномозгового происхождения, трансдуцированные вектором pHR-CMV-DRep (контрольный аналог вектора pHR-CMV-DRep/amiAML1-ETO). Процент положительных по репортерным белкам DsRed1 и/или eGFP показан в квадрантах.

Следует отметить, что эффективность трансдукции изучаемых нами клеток с помощью бицистронных лентивирусных векторов доставки несколько ниже, чем с помощью моноцистронных, однако даже в этом случае она очень высока, хотя и зависит от типа клеток-мишеней и коррелирует со скоростью их пролиферации. В целом, при использовании разработанного нами бицистронного вектора pHRCMV-DRep/amiAML1-ETO, кодирующего два репортерных белка (зеленый флуоресцирующий белок eGFP и красный флуоресцирующий белок DsRed1) и искусственные анти-aml1/eto микроРНК, минимальная эффективность трансдукции была отмечена для клеток линии Kasumi-1 (частота встречаемости клеток, положительных по белкам-репортерам, достигала 93,9%), максимальная – для клеток линии SKNO-1 (частота встречаемости клеток, положительных по белкам-репортерам, достигала 99,7%).

Аналогичные результаты были получены нами и при проведении генетической модификации мезенхимальных стволовых клеток костномозгового происхождения: моноцистронные векторы позволяли модифицировать в среднем (в зависимости от донора) 94%, а бицистронные – в среднем 61,8% клеток. При этом процедура инфекции не оказывала токсического действия на стволовые клетки, а экспрессия репортерных белков в модифицированных клетках была стабильной на протяжении не менее одного месяца.

Аналогичные результаты были получены нами и при проведении генетической модификации мезенхимальных стволовых клеток костномозгового происхождения: моноцистронные векторы позволяли модифицировать в среднем (в зависимости от донора) 94%, а бицистронные – в среднем 61,8% клеток. При этом процедура инфекции не оказывала токсического действия на стволовые клетки, а экспрессия репортерных белков в модифицированных клетках была стабильной на протяжении не менее одного месяца.

Таким образом, полученные нами данные указывают на перспективность использования лентивирусных векторов доставки для проведения генетической модификации как лейкозных клеток, так и нормальных мезенхимальных стволовых клеток человека, в функциональных исследованиях и экспериментальной генной терапии *ex vivo*.

Данная работа является составной частью проекта № 01/06-ФН, выполняемого в рамках ГПОФНИ “Современные технологии в медицине”, а также проекта INTAS Ref. Nr. 05-109-4921, получившего финансовую поддержку со стороны фонда ИНТАС. Авторы выражают признательность D. Trono за предоставленные вектор упаковки pCMV_dR8.91 и вектор оболочки pMD2.G и M. Schertt за базовый лентивирусный вектор доставки pHRSINcPPT-SIEW.

1. J. Cronin, X.-Y. Zhang, J. Reiser Altering the tropism of lentiviral vectors through pseudotyping // *Curr. Gene Ther.* – 2005. – V. 5, № 4. – P. 387-398.
2. C. Delenda Lentiviral vectors: optimization of packaging, transduction and gene expression // *J. Gene Med.* – 2004. – V. 6. – P. S125-S138.
3. B. Mangeat, D. Trono Lentiviral vectors and antiretroviral intrinsic immunity // *Human Gene Ther.* – 2005. – V. 16. – P. 913-920.
4. *Transfection Guide* // USA: Promega Corporation. – 1999. – P.15-26.
5. C. Conrad, R. Gupta, H. Mohan et al. Genetically engineered stem cells for therapeutic gene delivery // *Curr. Gene Ther.* – 2007. – V. 4. – P. 249-260.
6. V.M. Segers, R.T. Lee Stem-cell therapy for cardiac disease // *Nature.* – 2008. – V. 451. – P. 937-942.
7. L. Naldini, U. Blömer, P. Gallay, D. Ory, R. Mulligan, F.H. Gage, I.M. Verma, D. Trono *In vivo* gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector // *Science.* – 1996. – V. 272, № 5259. – P. 263-267.