

**ПЕРЕНОС ГЕНА НАТИВНОГО ИНСУЛИНА ЧЕЛОВЕКА
В МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ
С ПОМОЩЬЮ ЛЕНТИВИРУСНОЙ ТРАНСДУКЦИИ *IN VITRO*
Т.В. Романовская, И.Н. Северин*, С.М. Космачева*, М.П. Потапнев*, В.В. Гринев**

Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

**ГУ «Республиканский научно-практический центр гематологии и трансфузиологии»,
Минск, Республика Беларусь*

Введение

Около 2% населения Республики Беларусь страдают сахарным диабетом, причем около 10% из них составляют пациенты с инсулин-зависимой формой заболевания. В настоящее время ключевым способом контроля уровня глюкозы у таких пациентов является заместительная инсулинотерапия. Однако такой метод лечения сопряжен с рядом проблем, в частности, необходимостью регулярного введения препарата и невозможностью осуществления физиологического контроля уровня инсулина в крови [1, 2]. Одним из перспективных подходов для лечения ряда заболеваний, включая и сахарный диабет, является использование стволовых клеток человека в сочетании с генноинженерными методами [3, 4]. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) красного костного мозга человека представляют собой достаточно легко получаемый и культивируемый в условиях лаборатории тип клеток. Они могут быть подвергнуты генетической модификации и последующей аутологичной трансплантации в организм пациента [5]. В случае сахарного диабета трансплантируемые стволовые клетки должны нести активно работающий ген инсулина, беря на себя, таким образом, роль заместителей островковых клеток поджелудочной железы [6].

Целью настоящей работы являлась разработка и испытание лентивирусного вектора доставки, который позволял бы проводить трансдукцию МСК красного костного мозга человека с помощью рекомбинантных лентивирусных частиц, получая при этом сурогатные инсулин-продуцирующие клетки. Выбор лентивирусной трансдукции как способа доставки гена инсулина в МСК красного костного мозга человека был обусловлен несколькими преимуществами, которыми обладают лентивирусные векторы по сравнению с другими методами доставки (невирусными и вирусными) генов в стволовые клетки человека [7–10]: 1) лентивирусные векторы обеспечивают высокую частоту трансдукции, что обусловлено их способностью модифицировать как делящиеся, так и неделящиеся клетки; 2) лентивирусные векторы, в отличие от аденовирусных векторов или челночных плазмидных векторов, обеспечивают стабильную интеграцию трансгена в хромосомальную ДНК; 3) для лентивирусных векторов, по сравнению с ретровирусными векторами, менее характерно эпигенетическое подавление экспрессии трансгена, что, в совокупности с их предыдущей особенностью, обеспечивает стабильную и длительную экспрессию переносимого гена в клетках-мишенях; 4) лентивирусные векторные системы второго и третьего поколений включают целый комплекс модификаций и улучшений, гарантирующих их безопасность (в плане рекомбинации и появления вируса дикого типа).

Методы исследования

В работе были использованы клетки линии НЕК 293Т эмбриональной почки человека как продуценты рекомбинантных лентивирусных частиц. Клетки инкубировали при температуре +37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂ в полной среде D-MEM (Sigma-Aldrich Co., США), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Sigma-Aldrich Co., США), 1,5 г/л бикарбоната натрия, 4 ммоль/л L-глутамина (Invitrogen, США), 4,5 г/л глюкозы, 100 мкг/мл стрептомицина и 100 ед./мл пенициллина. Пересев клеток осуществляли каждые 2–3 дня по достижении культурой 70–80% конfluence. При этом клетки снимали с

пластика 0,25%-ным раствором трипсина-ЭДТА (Invitrogen, США) и рекультивировали в концентрации $0,5-1 \times 10^5$ кл/мл во флаконах T25 или 100-мм культуральных чашках Петри.

Получение и культивирование МСК красного костного мозга человека осуществляли в соответствии с методикой, описанной в [11].

Ткань поджелудочной железы человека была использована как источник РНК для получения комплементарной ДНК (кДНК) гена инсулина. Гомогенизацию ткани поджелудочной железы осуществляли путем обработки ее раствором коллагеназы Ia в концентрации 5 мг/мл при температуре $+37^\circ\text{C}$ на протяжении 40 мин при периодическом встряхивании. Далее проводили фракционирование полученного материала путем центрифугирования в 11% растворе фиколла при ускорении 800 g в течение 10 мин. Верхнюю фракцию, обогащенную островковыми клетками, отбирали и использовали для выделения РНК.

Выделение тотальной клеточной РНК осуществляли с использованием реагента TRIzol[®] (Invitrogen, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Синтез кДНК на выделенной тотальной клеточной РНК проводили в реакции обратной транскрипции с использованием реагентов фирмы Fermentas (UAB Fermentas, Литва) и рандомных гексамеров (ПРАЙМТЕХ, Беларусь).

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) ставили по стандартной методике с использованием реагентов фирмы Fermentas (UAB Fermentas, Литва). Для амплификации кДНК гена инсулина брали два праймера PPI_F 5'-AGGCGCGCCCTCCAGGACAGGCTG-3' и PPI_R 5'-TGGATCCATCTCTCTCGGTGCAGGA-3' (ПРАЙМТЕХ, Беларусь). Амплификация шла при следующих условиях: $+94^\circ\text{C}$ – 3 мин (1 цикл); $+94^\circ\text{C}$ – 30 сек, $+60^\circ\text{C}$ – 30 сек, $+72^\circ\text{C}$ – 40 сек (30 циклов); $+72^\circ\text{C}$ – 5 мин (1 цикл).

Трансформацию бактерий *E. coli* XL-1 blue плазмидной ДНК проводили согласно стандартной схеме [12]. Выделение плазмидной ДНК осуществляли по стандартной методике щелочного лизиса [12].

Рестрикцию плазмидной ДНК и лигирование фрагментов осуществляли с использованием реагентов фирмы Fermentas (UAB Fermentas, Литва). Электрофоретический анализ ДНК осуществляли методами, приведенными в руководстве Т. Маниатис и соавт [12]. Агарозные гели готовили на основе ТАЕ-буфера с бромистым этидием. Размер фрагментов ДНК устанавливали на основании их электрофоретической подвижности в агарозном геле.

Секвенирование проводили с использованием набора реагентов CycleReaderTM Auto DNA Sequencing Kit фирмы Fermentas (UAB Fermentas, Литва) в точном соответствии с рекомендациями производителя.

Рекомбинантные лентивирусные частицы получали путем котрансфекции клеток линии НЕК 293Т лентивирусным вектором доставки и парой вспомогательных векторов pCMV_dR8.91 и pMD2.G. Котрансфекция осуществлялась в соответствии с протоколом [13]. Определение титра полученных рекомбинантных лентивирусных частиц и трансдукция МСК красного костного мозга человека осуществлялись согласно описанным методикам [9, 13].

Количественную ПЦР (ПЦР в реальном времени) ставили с использованием набора реагентов MaximaTM SYBR[®] Green qPCR Master Mix фирмы Fermentas (UAB Fermentas, Литва) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Учет полученных данных проводили на оборудовании Chromo4 фирмы BioRad (США), следуя рекомендациям производителя. Данные выражали в процентах относительно уровня экспрессии референс-гена. В качестве референс-гена был взят ген «домашнего хозяйства» *gapdh*, кДНК которого амплифицировалась с помощью праймеров GAPDH_F 5'-GCTGAGTACGTCGTGGAGTC-3' и GAPDH_R 5'-TCTCATGGTTACACCCCA-3' (ПРАЙМТЕХ, Беларусь). Для количественного определения РНК-транскриптов гена инсулина использовали праймеры INS_F 5'-GGGAACGAGGCTTCTTCTA-3' и INS_R 5'-GTTCCACAATGCCACGCT-3' (ПРАЙМТЕХ, Беларусь).

Результаты и обсуждение

Как уже было сказано выше, конечной целью проводимой работы являлось создание лентивирусного вектора доставки кДНК гена инсулина для проведения эффективной и стабильной генетической модификации МСК красного костного мозга человека *in vitro*. Для достижения поставленной цели необходимо было 1) синтезировать и клонировать последовательность ДНК, соответствующую кДНК гена инсулина человека, 2) создать лентивирусный вектор доставки, несущий кДНК гена инсулина человека под контролем конститутивного промотора, 3) трансдуцировать МСК красного костного мозга человека рекомбинантными лентивирусами, полученными на основе разработанного вектора и 4) оценить эффективность трансдукции, уровень экспрессии, а также стабильность экспрессии трансгена в генетически модифицированных МСК красного костного мозга человека.

Согласно результатам компиляции, проведенной геномным браузером UCSC Genome Browser, ген, обеспечивающий синтез инсулина человека, представлен тремя экзонами, разделенными двумя интронами, первый из которых находится в 5'-нетранслируемой области, второй же – в белок-кодирующей области гена. Открытая рамка считывания гена кодирует препроинсулин и включает в себя область, кодирующую лидерный пептид, В-цепь, А-цепь и линкерный С-пептид. Лидерный пептид препроинсулина обеспечивает попадание молекулы в эндоплазматическую сеть и далее в аппарат Гольджи для дальнейшего созревания, при котором из проинсулина вырезается С-пептид, в результате чего формируется молекула функционально активного инсулина. Мы разработали праймеры, которые позволили бы амплифицировать всю кДНК гена, включая его 5'-нетранслируемую область, а также часть 3'-нетранслируемой области, за исключением сайта полиаденилирования. Такая кДНК была получена с помощью ПЦР на матрице тотальной РНК, выделенной из клеток поджелудочной железы (см. главу «Методы исследования»).

Полученные продукты амплификации были клонированы в составе Т-вектора pTZ57R/T и секвенированы. Вариант рекомбинантного плазмидного вектора, содержащий правильную нуклеотидную последовательность в прямой ориентации, был назван нами pTZ57R/T-hPPI.

В дальнейшем кДНК гена инсулина была переклонирована из плазмидного вектора pTZ57R/T-hPPI в лентивирусный вектор доставки pHR-SINcPPT-SIEW по сайтам распознавания для рестриктаз *AscI* и *BamHI*. В лентивирусном векторе доставки pHR-SINcPPT-SIEW сайты для этих рестриктаз уникальны и располагаются в полилинкере вектора между внутренним промотором P_{SFFV} от вируса Френда и участком внутренней посадки рибосомы IRES от вируса энцефаломиокардита (рисунок 1). Клонирование по этим сайтам кДНК гена инсулина позволило нам создать новый бицистронный лентивирусный вектор доставки, одновременно кодирующий целевой белок препроинсулин и репортерный белок eGFP. Итоговый лентивирусный вектор доставки был назван нами pHR-hPPI.

Следующий этап работы предусматривал получение рекомбинантных лентивирусов и собственно трансдукцию МСК красного костного мозга человека. Структурная организация запаковываемой в вирион части разработанного нами вектора pHR-hPPI представлена на рисунке 2. Эта область вектора фланкирована немодифицированным 5'-LTR и самоинактивирующимся (SIN) (с deletированным U3 регионом) 3'-LTR от вируса иммунодефицита человека и содержит последовательности ψ (сигнал упаковки), GaG SL4 (первые 350 пар оснований гена gag, рамка считывания которого закрыта синтетическим стоп-кодоном), RRE (элемент, ответственный за связывание с белком Rev) и cPPT (центральный полипуриновый тракт, участвующий в сборке преинтеграционного комплекса вируса и его переносе из цитоплазмы инфицированной клетки в ядро). Кроме того, данная область содержит бицистронную экспрессионную кассету, включающую конститутивный тканенеспецифический промотор P_{SFFV} от вируса Френда, открытую рамку считывания гена инсулина, трансляция которой контролируется последовательностью Козака, открытую рамку считывания для зеленого флуоресцирующего белка eGFP, трансляция которой контролируется последовательностью IRES, и РНК-стабилизирующий элемент WPRE.

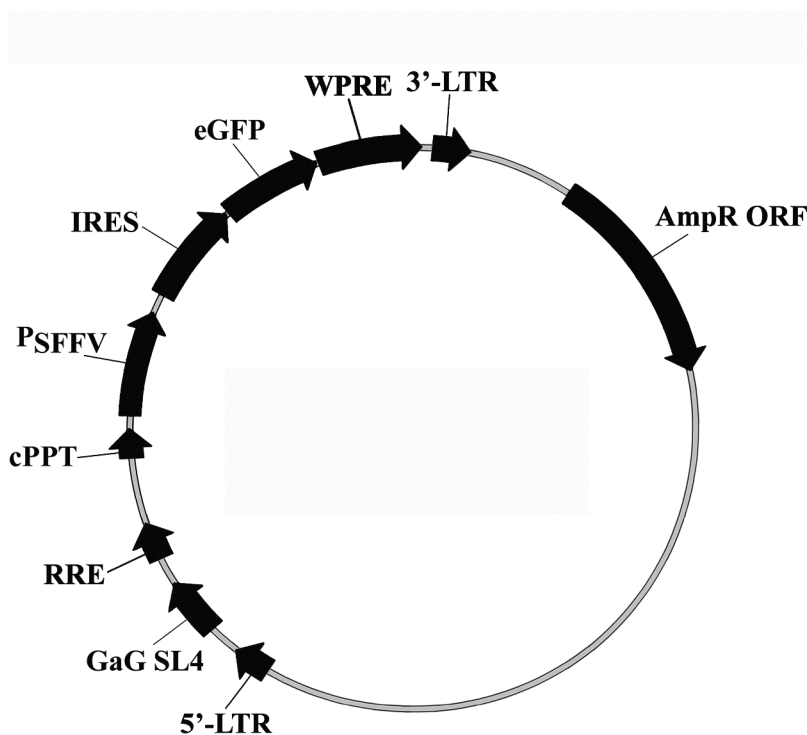


Рисунок 1 – карта вектора pHR-SINcPPT-SIEW

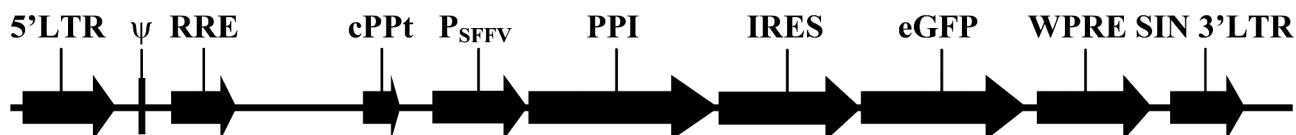


Рисунок 2 – Структура запаковываемой в лентивирусные частицы области лентивирусного вектора доставки pHR-hPPI

Оценка функциональности созданного нами вектора являлась завершающим этапом работы. МСК красного костного мозга человека трансдуцировали, как описано в главе «Методы исследования», при 40–50% конfluентности культуры и множественности инфекции (МИ) 5, 10 и/или 20. Пересев клеток и оценка их жизнеспособности, а также определение процентного содержания клеток, положительных по репортерному белку eGFP, проводились на 3, 10, 17 и 24 сутки после завершения процедуры трансдукции. Эффективность трансдукции, оцениваемая методом проточной цитофлуориметрии, для разных вариантов опыта представлена в таблице 1. Поскольку даже при МИ 5 эффективность трансдукции на 3 сутки превышала 80%, то для всех дальнейших исследований был выбран именно этот вариант МИ. Было обнаружено, что трансдуцированные МСК красного костного мозга человека успешно растут и пролиферируют на протяжении всего периода культивирования (данные не представлены). Кроме того, было установлено, что процентное содержание клеток, продуцирующих репортерный белок eGFP, существенно не меняется на протяжении 24 суток, что говорит о стабильности наследования переносимых генетических конструкций (см. таблицу 1).

Для того, чтобы количественно оценить содержание РНК гена инсулина в трансдуцированных МСК красного костного мозга человека проводилось выделение тотальной РНК клеток с последующим синтезом кДНК и ее анализом методом ПЦР в реальном времени. Результаты количественного анализа приведены в таблице 2. Видно, что в трансдуцированных клетках содержание РНК инсулина существенно выше по сравнению с нетрансдуцированными контрольными клетками. В то же время, при анализе РНК,

выделенной из островковых клеток поджелудочной железы, содержание РНК гена инсулина примерно в 80 раз превышало содержание РНК гена *gapdh* (данные не показаны).

Таблица 1 – Анализ эффективности трансдукции МСК красного костного мозга человека рекомбинантными лентивирусами и стабильности наследования трансгенов

Время после трансдукции, суток	МИ	Доля клеток, продуцирующих eGFP, %
3	5	87,4
	10	89,9
	20	90,0
10	5	81,0
17	5	84,9
24	5	82,8

Таблица 2 – Содержание РНК гена препроинсулина в МСК красного костного мозга человека

Время после трансдукции, суток	Анализируемые клетки	Уровень РНК гена инсулина, в % относительно уровня РНК гена <i>gapdh</i>
10	Трансдуцированные	7,2
	Нетрансдуцированные	0,3
24	Трансдуцированные	9,4
	Нетрансдуцированные	0,2

Таким образом, разработанный нами лентивирусный вектор доставки позволяет получать рекомбинантные лентивирусные частицы, с высокой эффективностью обеспечивающие перенос бицистронной экспрессионной кассеты в МСК красного костного мозга человека. Данная бицистронная кассета включает в себя ген инсулина, а также репортерный ген eGFP, экспрессия которых обеспечивается конститутивным промотором. Экспрессия трансгенов в генетически модифицированных МСК красного костного мозга человека стабильно сохраняется на протяжении 24 суток, что подтверждается как при анализе клеток методом проточной цитофлуориметрии (свечение зеленого флуоресцирующего белка), так и на уровне РНК транскриптов гена инсулина при анализе методом количественной ПЦР.

Список литературы

1. Turkoski, B.B. Diabetes and diabetes medications / B.B. Turkoski // Orthop. Nurs. – 2006. – Vol. 25, № 3. – P. 227–231.
2. Wallymahmed, M. Insulin therapy in the management of type 1 and type 2 diabetes / M. Wallymahmed // Nurs. Stand. – 2006. – Vol. 21, № 6. – P. 50–56.
3. Giannoukakis, N. Gene therapy for type 1 diabetes: a proposal to move to the next level / N. Giannoukakis, M. Trucco // Curr. Opin. Mol. Ther. – 2005. – Vol. 7, № 5. – P. 467–475.
4. Lee, D.D. Cellular therapies for type 1 diabetes / D.D. Lee, E. Grossman, A.S. Chong // Horm. Metab. Res. – 2008. – Vol. 40, № 2. – P. 147–154.
5. Porada, C.D. Adult mesenchymal stem cells: a pluripotent population with multiple applications / C.D. Porada, E.D. Zanjani, G. Almeida-Porad // Stem. Cell Res. Ther. – 2006. – Vol. 1, № 3. – P. 365–369.
6. Liu, M. Mesenchymal stem cells: Biology and clinical potential in type 1 diabetes therapy / M. Liu, Z.H. Han // J. Cellul. Molecul. Medicine. – 2008. – Vol. 12, issue 4. – P. 1155–1164.
7. Lentiviral manipulation of gene expression in human adult and embryonic stem cells / M.O. Clements [et al.] // Tissu. Engin. – 2006. – Vol. 12, № 7. – P. 1–11.
8. Generation of tissue-specific cells from MSC does not require fusion or donor-to-host mitochondrial/membrane transfer / E.J. Colletti [et al.] // Stem Cell Res. – 2009. – Vol. 2, issue 2. – P. 125–138.

9. Efficient lentiviral transduction and improved engraftment of human bone marrow mesenchymal cells / A.V. Damme [et al.] // Stem Cell. – 2006. – Vol. 24. – P. 896-907.
10. Zhang, X.-Y. Transduction of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells by using lentivirus vectors pseudotyped with modified RD114 envelope glycoproteins / X.-Y. Zhang, V.F. La Russa, J. Reiser // J. Virol. – 2004. – Vol. 78, № 3. – P. 1219–1229.
11. Boyum, A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation and sedimentation at 1 g /A. Boyum // Scand. J. Clin. Lab. Invest. – 1968. – Vol. 21, № 97. – P. 82–92.
12. Маниатис, Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук. – М.: Мир, 1984. – 480 с.
13. Cockrell, A.S. Gene delivery by lentivirus vectors. / A.S. Cockrell, T. Kafri // Mol. Biotechnol. – 2007. – Vol. 36, № 3. – P. 184–204.

LENTIVIRAL VECTOR-BASED *IN VITRO* TRANSFER OF NATIVE HUMAN INSULINE GENE INTO MESENCHYMAL STEM CELLS

T.V. Romanouskaya, I.N. Sevyaryn*, S.M. Kosmacheva*, .M.P Potapnev*, V.V. Grinev

Belarusian State University, Minsk, Belarus

**Belarusian Research and Practical Center for Haematology and Transfusiology, Minsk, Belarus*

An actual problem nowadays is increasing frequency of diabetes mellitus. The technology of stem cells as well as genetic engineering methods being combined open new perspectives for therapy of this disease. We have developed of the bicistronic lentiviral transfer vector pHR-hPPI carrying human insulin gene and enhanced green fluorescent protein eGFP reporter gene under control of constitutive promoter. Recombinant pHR-hPPI-based lentiviruses were used for transduction of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. More than 80% of transduced cells with eGFP expression were observed at the third day post-transduction, and the percent of eGFP-positive cells didn't substantially change over the next 3 weeks. The quantitative PCR analysis showed that insulin gene transcripts number was 20–50 times more in transduced cells comparing to nontransduced cells, but still 80 times less comparing to pancreatic islet cells.