

ПРИМЕНЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ГИСТОНОвого БЕЛКА H1.3 ДЛЯ ИНГИБИРОВАНИЯ АДЕНОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

В.В. Соловьева, А.А. Ризванов

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Россия, Казань, Россия

Application of recombinant histone protein H1.3 for inhibition of adenoviral infection

V.V. Solovyeva, A.A. Rizvanov

Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia

В настоящее время ведется активный поиск новых препаратов для излечения от аденовирусных инфекций. В нашей работе были исследованы противовирусные свойства рекомбинантного гистона H1.3 в культуре клеток *in vitro* и впервые показано, что рекомбинантный гистон H1.3 значительно снижает эффективность аденовирусной трансдукции. Также рекомбинантный гистон H1.3 оказывает ингибирующее действие на формирование бляшек на монослое клеток HEK-293A, инфицированных аденовирусом серотипа 5, что указывает на противовирусные свойства гистона H1.3 по отношению к аденовирусам.

Ключевые слова: рекомбинантный гистон H1.3, трансдукция, рекомбинантные аденовирусы, цитотоксичность, аденовирусная инфекция.

Аденовирусы вызывают различные заболевания у человека, в том числе инфекции дыхательных путей и желудочно-кишечного тракта. Особенно опасны аденовирусные инфекции для пациентов с ослабленным иммунитетом. Излечение от аденовирусных инфекций осложняется тем, что заболевание может быть вызвано различными серотипами аденовируса [1]. В настоящее время одними из основных препаратов для лечения аденовирусных инфекций являются цидофовир и рибавирин [2]. Клинические исследования показали эффективность цидофовира при лечении острого аденовирусного кератоконъюнктивита [3] и других аденовирусных инфекций [4]. Недостатками использования цидофовира являются его высокая токсичность и наличие тяжелых побочных эффектов в отношении центральной нервной системы и сетчатки глаз [5]. Применение рибавирина ограничивается его низкой эффективностью, что может объясняться селективным действием рибавирина только на определенные серотипы аденовирусов [6–7].

Одним из новых направлений исследований в данной области является использование нейтрализующих антител к разным серотипам аденовирусов [8], которые инактивируют инфекционный и (или) репликативный потенциал аденовируса. Также потенциальными агентами в терапии аденовирусных инфекций можно рассматривать биспецифичные конъюгаты антител, которые имеют специфичность к нескольким поверхностным компонентам вируса [9]. Недостатками использования нейтрализующих антител является их специфичность к определенному серотипу аденовируса.

В настоящее время ведется активный поиск новых препаратов для терапии аденовирусной инфекции. По литературным данным гистоновые белки обладают естественной способностью связываться с ДНК, что делает их потенциальными векторами для биобезопасной и эффективной доставки нуклеиновых кислот в клетки [10]. Гистоны обладают широкой функциональностью [11, 12]: они могут действо-

There is an ongoing search for new drugs for the treatment of adenovirus infections. In our work the antiviral properties of the recombinant histone H1.3 in *in vitro* cell culture was investigated and for the first time we demonstrated that recombinant histone H1.3 significantly reduces the efficiency of adenoviral transduction. Also, recombinant histone H1.3 exerts an inhibitory effect on plaque formation on HEK-293A cells monolayer, infected with adenovirus serotype 5, which confirms antiviral properties of histone H1.3 towards adenoviruses.

Key words: recombinant histone H1.3, transduction, recombinant adenoviruses, cytotoxicity, adenovirus infection.

вать в качестве гормонов и регулирующих факторов, а также выполнять защитные функции [13].

Гистоны применяют в некоторых терапевтических подходах. Было показано, что гистон H1 может быть использован для диагностики, профилактики и лечения язвенного колита и его клинических подтипов [14]. Также гистоны могут выполнять антибактериальную функцию [15]. Кроме того, гистоны используют для предотвращения агрегации тромбоцитов и в терапии тромбоцитопении [16].

В нашей работе были исследованы противовирусные свойства рекомбинантного гистона H1.3 в культуре клеток *in vitro* на модели рекомбинантного репликационно-дефектного аденовируса серотипа 5, экспрессирующего улучшенный зеленый флуоресцентный белок (англ. Enhanced green fluorescent protein) EGFP.

Материал и методы

Культуры клеток. Все работы с культурами клеток проводили в стерильном ламинарном боксе с соблюдением общепринятых правил работы в лаборатории II класса биобезопасности. Эмбриональные клетки почки человека HEK-293A (Invitrogen, США) и клетки HeLa (номер ATCC: CCL-2) культивировали в среде Игла, модифицированной по методу Дульбекко (Sigma-Aldrich, США), с содержанием 10% сыворотки крови плодов коровы (Sigma-Aldrich, США), 2 mM L-глутамин и 1x смеси антибиотиков пенициллина и стрептомицина (Sigma-Aldrich, США). Клетки инкубировали при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Пересев клеток проводили при плотности клеточного монослоя 90% с применением 0,25% раствора трипсина-ЭДТА (Sigma-Aldrich, США).

Приготовление раствора рекомбинантного гистона H1.3. Навеску рекомбинантного гистона H1.3 «Онкогист» (ИБХ РАН, Россия) растворяли в стерильной воде MilliQ до концентрации 50 мкг/мл. Рабочий раствор гистона H1.3 хранили при +4°C не более 2 дней.

Определение цитотоксичности гистона H1.3. Клетки HeLa высевали на 24-луночные культуральные планшеты в количестве 2×10^4 кл./лунку и культивировали в течение 48 ч при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂. После инкубации культуральную среду меняли на новую (500 мкл) с содержанием гистона H1.3 в конечных концентрациях 50, 250 и 500 мкг/мл. Жизнеспособность клеток HeLa, оценивали через 48 ч инкубации с помощью окраски раствором акридинового оранжевого/бромистого этидия (BD Biosciences, США) согласно инструкции фирмы-производителя [17]. Флуоресцентный анализ проводили с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа AxioObserver.Z1 (Carl Zeiss, Германия) с использованием программного обеспечения AxioVision Rel. 4.8: живые клетки флуоресцируют в зеленом спектре (495 нм), мертвые – в красном (545 нм).

Получение рекомбинантного аденовируса. Влияние гистона H1.3 на аденовирусную трансдукцию (инфекцию) исследовали на модели рекомбинантного репликационно дефектного аденовируса серотипа 5, экспрессирующего ген улучшенного зеленого флуоресцентного белка EGFP (Ad5-EGFP). Рекомбинантный аденовирус Ad5-EGFP получали субклонированием гена *egfp* из вектора pDOND221 (ID №25899, AddGene, США) в вектор pAd/CMV/V5-DEST (Invitrogen, США) по технологии Gateway® с последующей продукцией рекомбинантного аденовируса пакующей культурой клеток HEK-293A и определением вирусного титра, как описано в протоколе ViraPower™ Adenoviral Expression System (Invitrogen, США).

Трансдукция культур клеток рекомбинантным аденовирусом. Клетки HeLa культивировали в 24-луночной планшете до плотности клеточного монослоя 50%, после чего инфицировали рекомбинантным аденовирусом Ad5-EGFP с множественностью инфекции 0,1 (англ. Multiplicity of infection, MOI 0,1). Для этого к клеткам HeLa добавляли рекомбинантный аденовирус, или смесь аденовируса с гистоном H1.3, или смесь аденовируса с протамином сульфата. Гистон H1.3 использовали в конечной концентрации 250 мкг/мл. Протамин сульфат (Invitrogen, США) добавляли в лунку в конечной концентрации 10 мкг/мл. Клетки инкубировали в течение 48 ч при 37°C, во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Инфицирование клеток определяли по экспрессии и флуоресценции EGFP на проточном цитометре Guava easyCyte 8HT Flow Cytometry System (Millipore, Германия) согласно инструкциям производителя. Эксперимент проводили в трех повторностях.

Для определения влияния рекомбинантного гистона H1.3 на способность аденовирусных частиц к образованию бляшек, использовали культуру клеток HEK-239A, поддерживающую репликацию рекомбинантного аденовируса. Клетки HEK-293A культивировали в 6-луночной культуральной планшете до плотности монослоя 80–90%. К рекомбинантному аденовирусу Ad5-EGFP в серийных разведениях (10⁻⁵, 10⁻⁶ и 10⁻⁷) добавляли гистон H1.3 до конечной концентрации 250 мкг/мл и инкубировали смесь в течение 1 ч при комнатной температуре. После инкубации смесь добавляли к клеткам HEK-293A и инкубировали в течение ночи при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂. После инкубации культуральную среду меняли на среду, содержащую 0,8% агарозы (2 мл на лунку) и инкубировали

в течение 48 ч при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂, после чего добавляли еще 1 мл среды, содержащей 0,8% агарозы. Через 5–7 дней в лунки добавляли 300 мкл раствора Crystal Violet (Invitrogen) в концентрации 100 мкг/мкл, инкубировали в течение 1 ч при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂, после чего лунки промывали дважды раствором DPBS и подсчитывали количество бляшек в каждом разведении. В качестве контроля использовали рекомбинантный аденовирус Ad5-EGFP без добавления гистона H1.3.

Результаты и обсуждение

Используемый в работе гистон H1.3 человека (препарат «Онкогист», ИБХ РАН, Россия) является рекомбинантной и высоко очищенной молекулой N,N-бис-метионин-гистона H1.3, которая, в отличие от природного аналога, содержит два остатка метионина на N-конце. Наличие N-концевого метионина облегчает процесс выделения и очистки рекомбинантного белка [18]. Рекомбинантный гистон H1.3 показал свою безопасность в клинических исследованиях и эффективность при лечении острого миелолейкоза [19]. Механизм действия гистона H1 на опухолевые клетки, предположительно, основан на его способности образовывать агрегаты с фосфолипидами, которые в опухолевых клетках смещены на внешнюю сторону мембраны, что приводит к серьезным перестройкам в клеточной мембране, образованию пор, и в конечном итоге, к программируемой гибели клетки (апоптоз) [20]. В связи с тем, что рекомбинантный гистон H1.3 в составе препарата «Онкогист» уже показал свою безопасность в клинических исследованиях возник интерес в поиске новых приложений его биомедицинского применения.

Существуют различные способы определения токсичности соединений и лекарственных препаратов. В настоящее время широкое распространение в качестве тест-систем получили культуры клеток, для которых разработаны стандартизированные методы для оценки цитотоксичности веществ [21]. Ранее нами было показано, что рекомбинантный гистон H1.3 обладает низкой цитотоксичностью в широком диапазоне исследуемых концентраций [22]. С помощью MTS-теста была определена нетоксическая концентрация рекомбинантного гистона H1.3 для культуры клеток HeLa, которая составила 250 мкг/мл.

Для подтверждения полученных ранее результатов было проведено дифференциальное окрашивание клеток HeLa на жизнеспособность после инкубации с гистоном H1.3 с помощью раствора акридинового оранжевого/бромистого этидия. Жизнеспособность культур клеток определяли после добавления рекомбинантного гистона H1.3 в конечных концентрациях 50, 250 и 500 мкг/мл. Акридиновый оранжевый – флуорохроматический краситель, который связывается с нуклеиновыми кислотами бактериальных и эукариотических клеток. Под действием УФ излучения акридиновый оранжевый окрашивает двуцепочечную ДНК в зеленый. Бромистый этидий при связывании с ДНК флуоресцирует в красной области спектра. Он проникает только в клетки с поврежденной цитоплазматической мембраной, поэтому бромистый этидий используют для визуализации мертвых клеток. Комбинированное использование этих красителей позволяет оценить жизнеспособность клеток [23].

После 48 часов инкубации с гистонами Н1.3 в концентрациях 50 и 250 мкг/мл не наблюдалось изменения морфологии и повышения количества некротических клеток (окрашенных бромистым этидием) по сравнению с необработанными контрольными клетками без добавления гистона Н1.3, что свидетельствует об отсутствии влияния гистона Н1.3 на жизнеспособность клеток HeLa. При повышении концентрации гистона Н1.3 до 500 мкг/мл наблюдалось изменение клеточной морфологии и увеличение количества некротических клеток, что свидетельствует о снижении жизнеспособности клеток в ответ на добавление в культуральную среду рекомбинантного гистона Н1.3 (рис. 1). Таким образом, для исследования влияния рекомбинантного гистона Н1.3 на аденовирусную трансдукцию клеток HeLa была выбрана максимальная нетоксичная концентрация рекомбинантного гистона – 250 мкг/мл.

В работе использовали рекомбинантный репликационно-дефектный аденовирус серотипа 5 Ad5-EGFP, экспрессирующий улучшенный зеленый флуоресцентный белок EGFP. Ранее в нашей лаборатории было показано, что рекомбинантный аденовирус Ad5-EGFP может быть использован в качестве тест-системы для скрининга противовирусных препаратов [24]. К преимуществам тест-системы можно отнести безопасность использования репликационно-дефектного аденовируса и простоту детекции результатов скрининга методами флуоресцентными методами (например микроскопия и проточная цитофлуориметрия). Однако используемая тест-система не позволяет исследовать влияние вещества/препарата на некоторые стадии вирусного цикла, такие как процессы репликации и сборки вирусных частиц. Использование предложенной нами тест-системы на основе рекомбинантного аденовируса позволяет исследовать взаимодействие вещества/препарата с вирусными частицами и их проникновение внутрь клетки. Другим примером применения тест-систем на основе репликационно-

дефектных вирусов является модель рекомбинантного лентивируса, которая была использована нами для скрининга потенциальных противовирусных препаратов и исследования взаимодействия лентивирусов с наночастицами [25–26].

Рекомбинантный аденовирус Ad5-EGFP получали как описано в материале и методах. Для продукции рекомбинантного аденовируса использовали паковую культуру клеток HEK-293A (Invitrogen, США) – иммортализованная линия первичных человеческих эмбриональных клеток почки, трансформированные фрагментами ДНК аденовируса типа 5 [27, 28]. Клеточная линия содержит стабильно интегрированную в геном копию гена *e1*, который экспрессирует белки E1 (E1a и E1b), необходимые для получения рекомбинантного аденовируса. Белки E1a и E1b участвуют в трансактивации некоторых вирусных промоторов, что позволяет этим клеткам производить большое количество белка. Ген *e1* также дополняет E1-делецию в рекомбинантных аденовирусных векторах, что необходимо для репликации вируса.

Титр рекомбинантного аденовируса Ad5-EGFP определяли по бляшкообразующим единицам (БОЕ) в соответствии с методикой, описанной в протоколе ViraPower™ Adenoviral Expression System (Invitrogen, США). Титр рекомбинантного аденовируса Ad5-EGFP составил $6,7 \times 10^7$ БОЕ/мл.

Для оценки влияния рекомбинантного гистона Н1.3 на аденовирусную инфекцию клеток HeLa раствор рекомбинантного аденовируса Ad5-EGFP перед добавлением к клеткам обрабатывали рекомбинантным гистонами Н1.3. Эффективность вирусной трансдукции определяли по экспрессии репортерного гена *egfp*. В качестве положительного контроля использовали протамина сульфат (Invitrogen, США) – катионный пептид, нейтрализующий отрицательный заряд поверхности вирионов и плазматической мембраны клетки, тем самым повышая эффективность вирусной трансдукции *in vitro* [29].

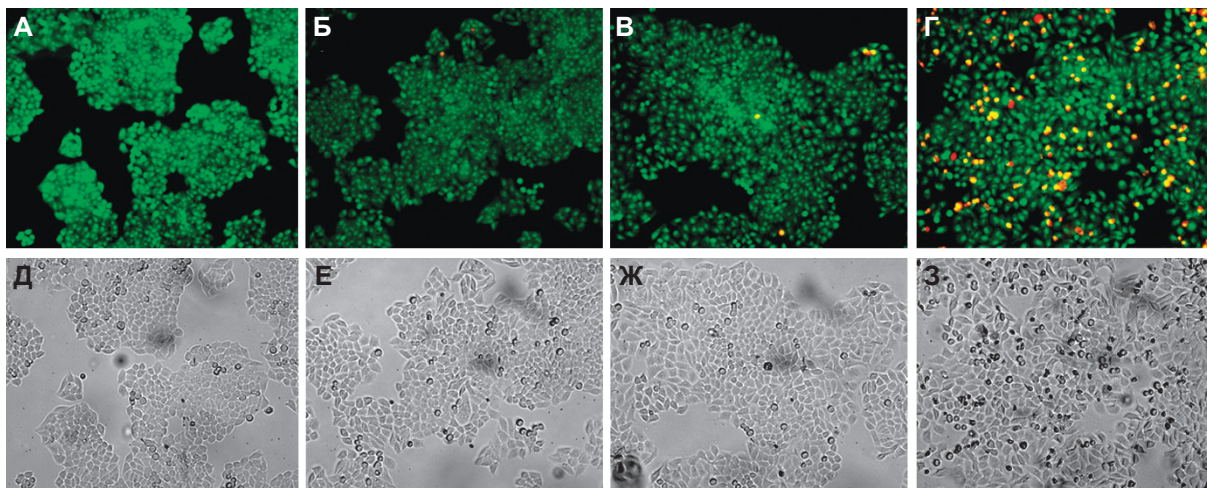


Рис. 1. Жизнеспособность клеток HeLa после добавления гистона Н1.3. 48 ч инкубации. Жизнеспособность определяли с помощью окрашивания акридиновым оранжевым/бромистым этидием: А, Д – контроль без добавления гистона Н1.3; Б, Е – концентрация гистона Н1.3 50 мкг/мл; В, Ж – концентрация гистона Н1.3 250 мкг/мл; Г, З – концентрация гистона Н1.3 500 мкг/мл. А–Г – флуоресцентная микроскопия; Д–З – фазово-контрастная микроскопия. Зеленая флуоресценция – акридиновый оранжевый (живые клетки). Красная флуоресценция – бромистый этидий (некротические клетки). Ув. $\times 200$

После аденовирусной трансдукции без добавления гистона H1.3 или протамина сульфата, 14% клеток HeLa обладали флуоресценцией (рис. 2Б). При аденовирусной трансдукции с добавлением протамина сульфата 20% клеток обладали зеленой флуоресценцией (рис. 2В). Таким образом, добавление протамина сульфата повысило эффективность вирусной трансдукции в 1,4 раза по сравнению с Ad5-EGFP без дополнительных добавок. Трансдукция смесью рекомбинантного аденовируса Ad5-EGFP и рекомбинантного гистона H1.3 привела к сильному снижению флуоресценции (2% EGFP-позитивных клеток). Таким образом, рекомбинантный гистон H1.3 в нетоксичной для клеток концентрации снижает эффективность аденовирусной трансдукции в 5,5 раз (рис. 2Г).

Анализ образования бляшек при инфицировании клеток линии HEK-293A рекомбинантным аденовирусом Ad5-EGFP показал, что пре-инкубация аденовируса Ad5-EGFP с гистоном H1.3 приводит к ингибированию процесса образования бляшек, что указывает на противовирусные свойства рекомбинантного гистона H1.3 (табл.). Добавлению гистона H1.3 к аденовирусу в разведении 10^{-6} привело к сокращению образования бляшек в 7,7 раз. Добавлению гистона H1.3 к аденовирусу в разведении 10^{-7} привело к полному ингибированию образования

бляшек (рис. 3). Стоит отметить, что данные, полученные методом проточной цитофлуориметрии, соотносятся с данными, полученными при подсчете количества бляшек, образуемых клетками HEK-293A после инфицирования аденовирусом.

Известно, что аденовирус серотипа 5 связывается с рецептором CAR (англ. Coxsackie and adenovirus receptor) на поверхности клетки-мишени через головку фибры. Затем интегрины взаимодействуют с пептидным мотивом RGD в основании пентона (капсидный белок на основании фибры), и аденовирус проникает внутрь клетки посредством эндоцитоза, после чего вирус проникает в ядро клетки, где происходит его репликация (для аденовируса дикого типа). Рекомбинантный гистон H1.3 может стерически (пространственно) блокировать фибры аденовируса в результате неспецифического электростатического взаимодействия с отрицательно заряженной вирусной частицей, в результате мешая взаимодействию вирусных частиц с рецепторами на поверхности плазматической клеточной мембраны, не давая вирусу проникнуть внутрь клетки. Для выявления механизма взаимодействия рекомбинантного гистона H1.3 с аденовирусными частицами необходимы дальнейшие исследования, например с использованием сканирующей электронной микроскопии вирусных частиц в комплексе с гистонами.

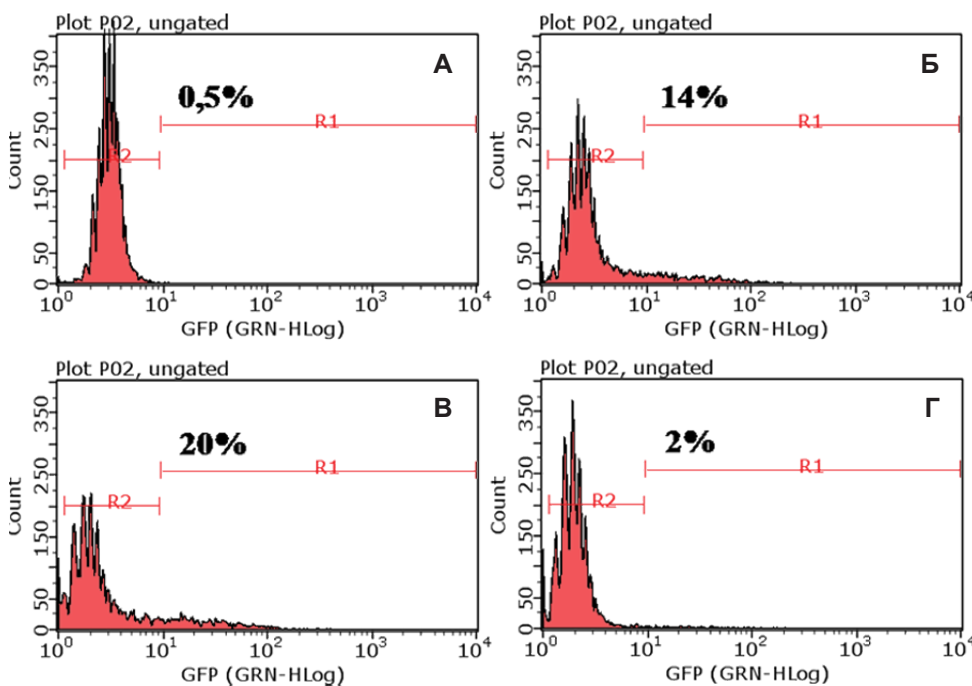


Рис. 2. Проточная цитофлуориметрия клеток HeLa через 48 ч после аденовирусной трансдукции: А – нетрансдуцированный контроль (контроль фоновой флуоресценции, 0,5% аутофлуоресцирующих клеток); Б – клетки HeLa, трансдуцированные рекомбинантным аденовирусом Ad5-EGFP (14% EGFP-позитивных клеток); В – клетки, трансдуцированные Ad5-EGFP с добавлением протамина сульфата (20% EGFP-позитивных клеток); Г – клетки, трансдуцированные смесью Ad5-EGFP и гистона H1.3 (2% EGFP-позитивных клеток)

Таблица. Образование бляшек на монослое клеток HEK-293A при аденовирусной трансдукции

Разведение вируса	Количество бляшек	
	Ad5-EGFP	Предварительная инкубация Ad-EGFP с гистоном H1.3
10-5	Обширный цитопатический эффект	30
10-6	70	9
10-7	5	0

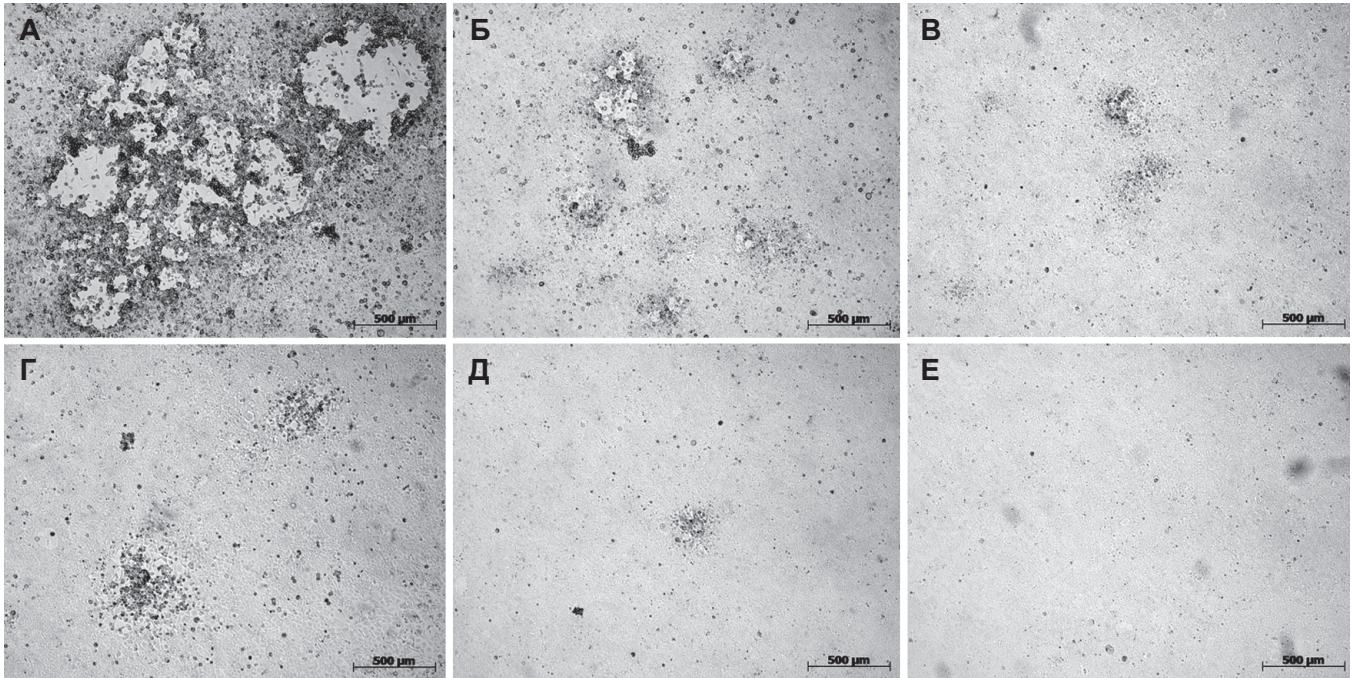


Рис. 3. Влияние гистона H1.3 на аденовирусную инфекцию. Клетки HEK-293A на 7 день после добавления рекомбинантного аденовируса Ad5-EGFP: А, Б, В – добавления аденовируса без добавления гистона. Г, Д, Е – добавление аденовируса преинкубированного с гистонам H1.3. А, Г – разведение Ad5-EGFP 10^{-5} . Б, Д – разведение Ad5-EGFP 10^{-6} . В, Е – разведение Ad5-EGFP 10^{-7} . Шкала: 500 мкм

Таким образом, в нашей работе установлено, что рекомбинантный гистон H1.3 в нетоксичной для клеток концентрации снижает эффективность аденовирусной трансдукции в 5,5–7,7 раз и обладает противовирусным эффектом *in vitro*. Это открывает новые возможности для клинического применения рекомбинантного гистона H1.3 в качестве противовирусного препарата для терапии аденовирусных инфекций.

Благодарности

Работа выполнена в рамках государственной программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета

среди ведущих мировых научно-образовательных центров и субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности. Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания в сфере научной деятельности. Рекомбинантный гистон H1.3 предоставлен ОАО «Институт стволовых клеток человека». Работа частично выполнена на оборудовании Междисциплинарного центра коллективного пользования и Научно образовательного центра фармацевтики Казанского-(Приволжского) федерального университета.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Kington P.R., Romanowski E.G., Gordon Y.J. Prospects for adenovirus antivirals. *J. Antimicrob. Chemother.* 2005; 55(4): 424-9.
2. Waye M.M.Y., Sing C.W. Anti-Viral Drugs for Human Adenoviruses. *Pharmaceuticals.* 2010; 3: 3343-3354.
3. Hillenkamp J., Reinhard T., Ross R.S. The effects of cidofovir 1% with and without cyclosporin a 1% as a topical treatment of acute adenoviral keratoconjunctivitis: a controlled clinical pilot study. *Ophthalmology.* 2002; 109(5): 845-50.
4. Engelmann G., Heim A., Greil J. Adenovirus infection and treatment with cidofovir in children after liver transplantation. *Pediatr. Transplant.* 2009; 13(4): 421-8.
5. Bhadri V.A., Lee-Horn L., Shaw P.J. Safety and tolerability of cidofovir in high-risk pediatric patients. *Transpl. Infect. Dis.* 2009; 11(4): 373-9.
6. Gavin P.J., Katz B.Z. Intravenous ribavirin treatment for severe adenovirus disease in immunocompromised children. *Pediatrics.* 2002; 110(1 Pt 1): e9.
7. Ljungman P. Treatment of adenovirus infections in the immunocompromised host. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2004; 23(8): 583-8.
8. Sumida S.M., Truitt D.M., Lemckert A.A., Neutralizing antibodies to adenovirus serotype 5 vaccine vectors are directed primarily against the adenovirus hexon protein. *J. Immunol.* 2005; 174(11): 7179-85.
9. Cao Y., Lam L. Bispecific antibody conjugates in therapeutics. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2003; 55(2): 171-97.

10. Соловьева В.В., Кудряшова Н.В., Ризванов А.А. Перенос рекомбинантных нуклеиновых кислот в клетки (трансфекция) с помощью гистонов и других ядерных белков. *Клеточная Трансплантология и Тканевая Инженерия.* 2011; 6(3): 29-40.
11. Reichhart R., Zeppezauer M., Jörnvall H. Preparations of homeostatic thymus hormone consist predominantly of histones 2A and 2B and suggest additional histone functions. *PNAS USA.* 1985; 82(15): 4871-5.
12. Reichhart R., Jörnvall H., Carlquist M. The primary structure of two polypeptide chains from preparations of homeostatic thymus hormone (HTH alpha and HTH beta) entire-chain identities to two histones. *FEBS Lett.* 1985; 188(1): 63-7.
13. Zeppezauer M., Reichhart R., inventors; Symbiotec GmbH, assignee. Pure Histone H1 for use in therapeutic procedures. EP0392315 B1. 1994.
14. Braun J., Targan S.R., Eggena M., inventors; Regents of the Univ. of California, Cedars-Sinai Medical Center, assignees. Diagnosis, prevention and treatment of ulcerative colitis, and clinical subtypes thereof, using histone H1. US6074835 A. 2000.
15. Class R., Hand C.M., inventors; Class R.J.W., Hand C.M., assignees. Antimicrobial histone H1 compositions, kits, and methods of use thereof. US20010046976 A1. 2001.
16. Zeppezauer M., Class R., inventors; Zeppezauer M., Class R., assignees. Use of histones for therapeutic purposes. US20090305966 A1. 2009.
17. Parks D.R., Bryan V.M., Oi V.T. Antigen-specific identification and cloning of hybridomas with a fluorescence-activated cell sorter. *PNAS USA.* 1979; 76(4): 1962-6.

18. Giglione C., Vallon O., Meinel T. Control of protein life-span by N-terminal methionine excision. *EMBO J.* 2003; 22(1): 13-23.
19. Gross P., Joernvall H., Thiry M., inventors; Symbiotec GmbH, assignee. Bis-Met Histones. WO 2008/122434 A1. 2008.
20. Zhao H., Bose S., Tuominen E.K. Interactions of histone H1 with phospholipids and comparison of its binding to giant liposomes and human leukemic T cells. *Biochemistry* 2004; 43(31): 10192-202.
21. Мингалеева Р.Н., Соловьева В.В., Блаат Н.Л. Применение культур клеток и тканей для скрининга противоопухолевых препаратов *in vitro*. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия* 2013; 8(2): 20-8.
22. Соловьева В.В., Исаев А.А., Генкин Д.Д. Влияние рекомбинантного гистона H1.3 на эффективность лентивирусной трансдукции клеток человека *in vitro*. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия* 2012; 7(3): 151-4.
23. Liegler T.J., Hyun W., Yen T.S. Detection and quantification of live, apoptotic, and necrotic human peripheral lymphocytes by single-laser flow cytometry. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 1995; 2(3): 369-76.
24. Мартынова Е.В., Данилова Ю.В., Анохин В.А. Биобезопасная модель аденовирусной инфекции: влияние бактериальных протеаз на инфицирование клеток человека *in vitro*. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия* 2012; 7(3): 105-7.
25. Головин Е.В., Мустафин И.Г., Мартынова Е.В. Безопасная модель ВИЧ-инфекции для оценки антиретровирусной активности лекарственных препаратов. *Современные технологии в медицине* 2012; 1: 55-60.
26. Altunbek M., Yalvaç M.E., Keseroglu K. Gold- and Silver-based Nano-Particles Influence Pseudo-Typed Lenti-viral Infection. *Current Nanoscience* 2013; 9(6): 693-7.
27. Graham F.L., Smiley J., Russell W.C. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 1977; 36(1): 59-74.
28. Harrison T., Graham F., Williams J. Host-range mutants of adenovirus type 5 defective for growth in HeLa cells. *Virology* 1977; 77(1): 319-29.
29. Manning J.S., Hackett A.J., Darby N.B. Jr. Effect of polycations on sensitivity of BALD-3T3 cells to murine leukemia and sarcoma virus infectivity. *Appl. Microbiol.* 1971; 22(6): 1162-3.

Поступила: 24.07.2014