

На правах рукописи



**Соловьева Валерия Владимировна**

**ПРИМЕНЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ГИСТОНА H1.3 ДЛЯ  
ВИРУСНОГО И НЕВИРУСНОГО ПЕРЕНОСА НУКЛЕИНОВЫХ  
КИСЛОТ В КУЛЬТУРЕ КЛЕТОК**

03.01.04 – биохимия

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Казань – 2014

Работа выполнена в ФГБОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

**Научный руководитель:**

Доктор биологических наук, доцент  
– **Ризванов Альберт Анатольевич**

**Официальные оппоненты:**

доктор медицинских наук, профессор, ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет», профессор кафедры биохимии  
– **Маянская Наиля Назибовна;**

доктор биологических наук, профессор, ФГБУН Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, зав. лаборатории молекулярной биологии и нанобиологии, зам. директора по научной работе  
– **Чемерис Алексей Викторович**

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра Российской академии наук.

Защита состоится «26» июня 2014 г. в 11:00 часов на заседании Диссертационного совета Д 212.081.08 при ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008 г. Казань, ул. Кремлевская, д.18, ауд.211. Телефон: 7(843)23-37-842

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке им. Н.И. Лобачевского при ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д.35.

Электронная версия автореферата размещена на официальном сайте ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» [www.kpfu.ru](http://www.kpfu.ru)

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2014 года

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор биологических наук, профессор



Абрамова З.И.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

Развитие методов и научных принципов генной терапии требует исследования строения, свойств и функционирования отдельных молекул нуклеиновых кислот и их надмолекулярных комплексов с молекулами-переносчиками (векторами). Генная терапия — новый подход к лечению заболеваний, который направлен на устранение первопричины заболевания. На современном этапе генную терапию можно определить как лечение наследственных и ненаследственных заболеваний путём введения генов в клетки пациентов с целью направленного изменения генных дефектов или придания клеткам новых функций (Исламов и др. // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2007. Т.2, №3).

Для введения в организм рекомбинантного генетического материала используют вирусные и невирусные методы доставки. Вирусные методы основаны на применении рекомбинантных вирусов, полученных с помощью генной инженерии и оптимизированных для переноса генов. Основные преимущества вирусных систем — высокая эффективность генетической модификации и длительность экспрессии трансгенов. Однако клиническое применение вирусных векторов ограничено их иммуногенностью и онкогенностью. В последнее время большие усилия были сосредоточены на разработке систем невирусной доставки генов: физические, химические, «голые» генетические конструкции (Супотницкий М.В. // Биопрепараты. 2011. Т.3).

Известно, что гистоновые и другие ядерные белки могут служить векторами для переноса нуклеиновых кислот в клетки (гистонофекция). Положительный заряд молекул гистоновых белков способствует электростатическому взаимодействию с отрицательно заряженными молекулами нуклеиновых кислот, что приводит к нейтрализации зарядов и позволяет комплексам преодолевать отрицательно заряженную клеточную мембрану. Преимущество гистонов заключается в том, что они остаются в комплексе с ДНК после проникновения в цитоплазму, участвуют в активном транспорте комплексов ДНК/гистон в ядро, где ДНК участвует в процессах транскрипции (Соловьева и др. // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2011. Т.6, №3).

Рекомбинантные гистоны и их производные находят применение в противораковой терапии. Рекомбинантный гистон Н1.3 в составе препарата ONCONIST™ уже прошел в Германии I стадию клинических испытаний, доказавших его безопасность, а также косвенно подтвердивших эффективность при лечении острого миелолейкоза (Gross et al. // Patent US 20110034370 A1. 2008). В настоящее время препарат проходит II фазу клинических исследований в России.

В связи с тем, что рекомбинантный гистон Н1.3 показал свою безопасность в клинических исследованиях (хотя и не связанных с переносом ДНК внутрь клеток),

поиск дополнительных способов биомедицинского применения данного белка является актуальной задачей.

Изучение взаимодействия рекомбинантного гистона Н1.3 и рекомбинантных нуклеиновых кислот, а также процессов транспорта комплексов гистона и нуклеиновых кислот в клетки позволит разработать методы генной и генно-клеточной терапии на основе данной векторной молекулы.

**Цель работы** — характеристика влияния рекомбинантного гистона Н1.3 на вирусный и невирусный перенос нуклеиновых кислот в культуре клеток.

**Задачи исследования:**

1. Установить оптимальное соотношение и значение дзета-потенциала для комплексообразования нуклеиновых кислот и рекомбинантного гистона Н1.3.
2. Определить влияние рекомбинантного гистона Н1.3 и его комплексов с нуклеиновыми кислотами на активность митохондриальных дегидрогеназ и цитотоксичность в культуре первичных и трансформированных клеток *in vitro*.
3. Исследовать влияние рекомбинантного гистона Н1.3 на эффективность трансфекции клеток рекомбинантными нуклеиновыми кислотами и на эффективность трансдукции (инфекции) культур клеток рекомбинантными ленти- и аденовирусами.

**Научная новизна работы**

В результате проведенного комплексного исследования применимости рекомбинантного гистона Н1.3 для вирусного и невирусного переноса нуклеиновых кислот в культуре клеток определены параметры комплексообразования плазмидной ДНК и рекомбинантного гистона Н1.3. Несомненной новизной обладают данные по определению цитотоксичности рекомбинантного гистона Н1.3 и его комплексов с нуклеиновыми кислотами. Впервые показано, что рекомбинантный гистон Н1.3 и его комплексы с нуклеиновыми кислотами обладают низкой токсичностью по отношению к культурам клеток *in vitro* в широком диапазоне исследуемых концентраций, о чем свидетельствуют данные по активности митохондриальных дегидрогеназ. Принципиально новыми являются данные о том, что рекомбинантный гистон Н1.3 повышает эффективность переноса нуклеиновых кислот в культуре клеток при кальций-фосфатном методе трансфекции. Впервые показано, что рекомбинантный гистон Н1.3 влияет на инфекцию клеток рекомбинантным лентивирусом, повышая ее эффективность. Приоритетными следует признать результаты, полученные на модели рекомбинантного аденовируса серотипа 5, где впервые установлено, что рекомбинантный гистон Н1.3 снижает эффективность аденовирусной трансдукции и обладает противовирусным эффектом *in vitro*.

**Практическая значимость работы**

Настоящее исследование расширяет представления о возможностях биомедицинского применения рекомбинантного гистона Н1.3. В рамках

проведенного исследования предложен подход к повышению эффективности генетической модификации культур клеток *in vitro* рекомбинантным лентивирусом. Нами показано, что рекомбинантный гистон Н1.3 повышает эффективность переноса нуклеиновых кислот в культуре клеток при лентивирусной трансдукции, что может быть использовано для повышения эффективности генетической модификации клеток при лентивирусной трансдукции. Получен патент на изобретение РФ №2478711 «Способ повышения эффективности вирусной трансдукции». Апробированный метод кальций-фосфатного метода трансфекции с добавлением гистона может быть использован для повышения эффективности доставки рекомбинантных нуклеиновых в культуры клеток. Впервые показано, что рекомбинантный гистон Н1.3 снижает эффективность аденовирусной трансдукции и обладает противовирусным эффектом *in vitro*. Таким образом, описан новый класс белков, обладающих противовирусной активностью. Это важно для разработки новых методов противовирусной терапии с применением рекомбинантного гистона Н1.3.

Экспериментальные и методические подходы, используемые в работе, открывают перспективу применения рекомбинантного гистона в противовирусной терапии и для повышения эффективности генетической модификации при создании генно-клеточных препаратов для использования в биомедицинских приложениях.

#### ***Основные положения, выносимые на защиту***

1. Рекомбинантный гистон Н1.3 повышает эффективность переноса нуклеиновых кислот в культуре клеток при кальций-фосфатном методе трансфекции и лентивирусной трансдукции.
2. Рекомбинантный гистон Н1.3 снижает эффективность аденовирусной трансдукции и обладает противовирусным эффектом *in vitro*.

#### ***Апробация работы***

Материалы диссертации представлены на следующих всероссийских и международных симпозиумах, конгрессах и конференциях: Международная научная конференция «Ломоносов» (Москва, 2011, 2013), Всероссийская научно-практическая конференция «Молодые ученые в медицине» (Казань, 2011, 2012), Международная научно-практическая конференция «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине» (Казань, 2012), Международная научная интернет-конференция «Актуальные проблемы биохимии и бионанотехнологии» (Казань, 2013), Ежегодный международный симпозиум «Актуальные вопросы генных и клеточных технологий» (Москва, 2012, 2013), Международная научно-практическая конференция «Фармацевтические и медицинские биотехнологии» (Москва, 2012), The 4th International Congress of Molecular Medicine organized by Turkish Society of Molecular Medicine (Стамбул, 2011), Международная научная конференции студентов и молодых ученых

"Молодежь — медицине будущего" (Одесса, 2012), Международная конференции «Биология — наука XXI века» (Москва, 2012), Международная Пироговская научная медицинская конференция студентов и молодых ученых (Москва, 2011).

#### ***Личный вклад автора***

Автор принимал участие в формулировании научной проблемы и планировании экспериментов. Автор лично выполнял все эксперименты, проводил статистическую обработку полученных данных, обсуждал и описывал полученные результаты. Автор участвовал в написании статей и патента на изобретение, проводил информационный поиск по исследуемой тематике.

На основании самостоятельной работы автора решена важная биохимическая задача исследования строения, свойств и функционирования надмолекулярных комплексов гистона H1.3 с нуклеиновыми кислотами и вирусными частицами, что вносит важный вклад в разработку методов и научных принципов генной терапии. Данные, полученные лично автором, демонстрируют возможность расширения применения рекомбинантного гистона в биологии и медицине как для повышения эффективности переноса нуклеиновых кислот при трансфекции/трансдукции клеток, так и для применения в качестве нового противовирусного вещества.

#### ***Структура и объем диссертации***

Материалы диссертационной работы изложены на 164 страницах машинописного текста. Работа содержит 42 рисунка и 8 таблиц. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов исследований, обсуждения результатов, заключения, выводов и списка литературы (320 источников, среди которых 13 — отечественные, 307 — зарубежные).

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы и методы исследования**

#### **Клеточные культуры, культивирование**

В работе использовали следующие клеточные линии: клетки из рака шейки матки HeLa (ATCC number: CCL-2); клетки аденокарциномы молочной железы MCF7 (ATCC number: HTB-22); мезенхимные стволовые клетки (МСК), выделенные из зачатков третьих моляров человека (3ТМ) МСК из 3ТМ (Yalvac et al. Isolation and characterization of stem cells derived from human third molar tooth germs of young adults: implications in neo-vascularization, osteo-, adipo- and neurogenesis, 2010); Фибробласты человека, полученные из фрагментов кожи здорового пациента, удаленных в ходе косметической операции; иммортализованные линии первичных человеческих эмбриональных клеток почки HEK293T (ATCC Number: CRL-11268) и HEK293A (Invitrogen, США). Клетки культивировали в инкубаторе при 37 °С во влажной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>. Для культивирования использовали среду Игла,

модифицированной по методу Дульбекко (DMEM, Sigma-Aldrich, США), к которой были добавлены 10% сыворотки крови плодов коровы (англ. Fetal bovine serum, FBS, Sigma, США), 2 мМ L-глутамин (Sigma-Aldrich, США) и 1х смесь антибиотиков пенициллина и стрептомицина (Sigma-Aldrich, США). Пассирование клеток проводили с использованием 1х 0,25% раствора трипсина-ЭДТА (Sigma-Aldrich, США).

### **Электрофоретические исследования**

Метод задержки в агарозном геле заключается в нанесении комплексов плазмидной ДНК и гистона Н1.3 (плДНК/Н1.3) в лунки агарозного геля и оценки задержки плДНК в лунке в зависимости от количества добавляемого при комплексообразовании гистона. Визуализация ДНК осуществляется с помощью окраски флуоресцентным красителем — бромистым этидием.

Навеску рекомбинантного гистона Н1.3 «Онкогист» (ИБХ РАН, Россия) растворяли в стерильной воде MilliQ до концентрации 50 мкг/мкл, после чего проводили серийное разведение в 150 мМ растворе NaCl до его различных концентраций. Комплексы плДНК/Н1.3 готовили в 150 мМ растворе NaCl. Для этого в пробирку, содержащей 1 мкг плДНК рEGFP-N2 (BD Biosciences Clontech, Германия) в 49 мкл 150 мМ раствора NaCl, добавляли 1 мкл раствора гистона Н1.3 (в разных концентрациях). Смесь перемешивали на вортексе, осаждали коротким центрифугированием и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре, после чего смесь использовали для нанесения в лунки агарозного геля.

### **Определение дзета-потенциала комплексов плДНК/Н1.3**

Дзета-потенциал комплексов плДНК/Н1.3 определяли методом динамического рассеивания света на приборе Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Великобритания) при 25°C. Автоматическую обработку полученных данных проводили с использованием программного обеспечения Malvern Zetasizer, v. 2.2 (Malvern Instruments, Великобритания).

Для получения комплексов плДНК/Н1.3 в 1,5 мл пробирку, содержащую 150 мМ раствор NaCl (физраствор) добавляли плДНК рEGFP-N2 до конечной концентрации 1 мкг/мл и гистон Н1.3 до конечной концентрации 2 мкг/мл, 5 мкг/мл, 25 мкг/мл, 250 мкг/мл или 500 мкг/мл (соотношения плДНК/Н1.3 (w:w) 1:2, 1:5, 1:25, 1:250, 1:500, соответственно). Смесь инкубировалась в течение 30 мин при комнатной температуре.

### **Получение рекомбинантных вирусов**

Рекомбинантный аденовирус Ad5-EGFP получали субклонированием гена улучшенного зеленого флуоресцентного белка *egfp* (англ. Enhanced green fluorescent protein) из вектора донора pDOND221 (plasmid ID №25899, AddGene) в вектор pAd/CMV/V5-DEST (Invitrogen, США) по технологии Gateway® с

последующей продукцией аденовируса пакующей линии клеток HEK293A, как описано в протоколе ViraPower™ Adenoviral Expression System (Invitrogen, США).

Рекомбинантный лентивирус LV-GFP, экспрессирующий ген зеленого флуоресцентного белка GFP, получали ко-трансфекцией пакующей линии клеток HEK293T тремя плазмидами, которые были получены из некоммерческой организации AddGene ([www.addgene.org](http://www.addgene.org)): pCMV-VSV-G (plasmid ID №8454), psPAX2 (plasmid ID №12260) и pWPT-GFP (plasmid ID №12255).

#### **Оценка активности митохондриальных дегидрогеназ в культурах клеток**

Комплексы пЛДНК pEGFP-N2 и гистона H1.3 готовили в 100 мкл питательной среды для клеточных культур без содержания FBS. Для этого в пробирку, содержащую питательную среду без FBS, добавляли пЛДНК до конечной концентрации 2 мкг/мл и гистон H1.3 до конечных концентраций 50, 250, 500 и 1000 мкг/мл. Смесь перемешивали на вортексе, осаждали и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре, после чего меняли культуральную среду клеток HeLa, MCF7, MCK из 3ТМ и фибробластов человека на смесь (100 мкл), содержащую комплексы пЛДНК/H1.3 или только гистон H1.3.

MTS-тест — колориметрический метод определения метаболической активности клеток, который основан на способности митохондриальных дегидрогеназ в присутствии переносчика электронов феназинметасульфата конвертировать тетразолиевое соединение MTS в растворимую форму формазана. Способность клеток восстанавливать тетразолиевую соль до формазана служит показателем жизнеспособности и скорости пролиферации клеток.

Цитотоксичность гистона H1.3 и комплексов пЛДНК/H1.3 определяли с помощью реагента CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega, США) на планшетном анализаторе CERES 900HDi (Bio-Tek Instruments Inc., США) через 24, 48 и 72 часа инкубации в двухволновом режиме: основной фильтр — 490 нм, референс-фильтр — 630 нм. Эксперимент проводили в 4-х повторностях (n=4).

На основании данных, полученных в результате проведения MTS-теста, вычисляли цитотоксическую концентрацию гистона (CC50), при которой происходит ингибирование жизнеспособности клеток на 50% относительно контроля.

#### **Трансдукция клеток HeLa рекомбинантным лентивирусом**

Клетки HeLa культивировали во флаконе T25 до плотности монослоя 50%. Клетки инфицировали рекомбинантным лентивирусом LV-GFP, с множественностью инфекции (англ. Multiplicity of infection, MOI) 10. Клетки инкубировали в течение 3 суток при 37 °С во влажной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>.



### **Влияние рекомбинантного гистона Н1.3 на вирусную трансдукцию**

Влияние гистона на лентивирусную/аденовирусную трансдукцию (инфекцию) исследовали на моделях рекомбинантного лентивируса или аденовируса, экспрессирующих гены *gfp* и *egfp* (LV-GFP или Ad5-EGFP).

Клетки HeLa культивировали в 24-луночной планшете до плотности клеточного монослоя 50%. Далее клетки инфицировали рекомбинантными вирусами LV-GFP или Ad5-EGFP с MOI 0,1. Для этого к клеткам HeLa добавляли рекомбинантный ленти- или аденовирус, или смесь вируса с гистоном Н1.3 преинкубированную в течение 1 часа, или смесь вируса с протамином сульфата. Гистон Н1.3 использовали в конечной концентрации 250 мкг/мл. Протамина сульфат (Invitrogen, США) добавляли в лунку в конечной концентрации 10 мкг/мл (положительный контроль). Клетки инкубировали в течение 48 часов при 37 °С, во влажной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>.

Для определения влияния рекомбинантного гистона Н1.3 на способность аденовирусных частиц к образованию бляшек, при определении вирусного титра к рекомбинантному аденовирусу Ad5-EGFP в серийных разведениях (10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup> и 10<sup>-7</sup>; 670, 67 и 6,7 БОЕ/мл, соответственно) добавляли гистон Н1.3 до конечной концентрации 250 мкг/мл и инкубировали смесь в течение 1 часа при комнатной температуре. После инкубации смесь добавляли к клеткам HEK293А. Через 7 дней подсчитывали количество бляшек в каждом разведении как описано в протоколе ViraPower™ Adenoviral Expression System (Invitrogen, США). В качестве контроля использовали Ad5-EGFP без добавления гистона Н1.3.

### **Влияние рекомбинантного гистона Н1.3 на эффективность кальций-фосфатного метода трансфекции**

Трансфекцию клеток HEK293Т проводили комплексами плДНК рEGFP-N2 и гистона Н1.3 в различных комбинациях (соотношения плДНК/Н1.3 (w:w) — 1:0, 1:0,1, 1:3, 1 мкг плДНК) в комбинации со стандартным методом кальций-фосфатной преципитации.

Клетки HEK293Т культивировали в 24-луночной планшете до плотности клеточного монослоя 60–70%. Трансфекционную смесь для каждого соотношения готовили в 1,5 мл пробирке из расчета на 8 лунок: к 0,4 мл 0,5 М CaCl<sub>2</sub> добавляли 8 мкг плДНК и необходимое количество гистона Н1.3. Смесь перемешивали на вортексе, осаждали и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. После инкубации смесь по каплям добавляли в 15 мл пробирку, содержащую 400 мкл 2х раствора HBS, одновременно перемешивая содержимое на вортексе. Смесь инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре и добавляли к клеткам (по 100 мкл на лунку). Через 6–8 часов после трансфекции меняли культуральную среду на свежую.

## **Трансфекция культур клеток**

Для трансфекции культур клеток HeLa, MCF7, MCK из 3ТМ и фибробластов человека применяли 24-луночные культуральные планшеты. Использовалась культура клеток с плотностью монослоя 60–70%. В лунках культурального планшета меняли культуральную среду на свежую (400 мкл), с содержанием 5 мМ CaCl<sub>2</sub> и добавляли 100 мкл комплексов плДНК/Н1.3 или киРНК/Н1.3. Комплексы плДНК/Н1.3 или киРНК/Н1.3 готовили в культуральной среде без FBS. Для этого в пробирку, содержащей 1 мкг плДНК pEGFP-N2 или 0,5 мкл киРНК Silencer<sup>®</sup> GFP siRNA (Ambion, США) в 95 мкл среды, добавляли 5 мкл гистона Н1.3 (в разных концентрациях), растворенного в стерильной воде MilliQ. Смесь перемешивали на вортексе, осаждали и инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре, после чего использовали для трансфекции культур клеток. В лунках культурального планшета меняли культуральную среду на свежую (500 мкл) с содержанием 5 мМ CaCl<sub>2</sub>. К среде добавляли по 100 мкл комплексов плДНК/Н1.3 или киРНК/Н1.3.

Химическую трансфекцию культур клеток с использованием катионных липидов TransFast (Promega, США) и катионных полимеров TurboFect (Thermo Fisher Scientific Inc., США) проводили согласно рекомендациям фирм-производителей.

## **Проточная цитофлуориметрия и микроскопия клеток**

Микроскопию клеток проводили с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа AxioOberver.Z1 (Carl Zeiss, Германия). Количество GFP позитивных клеток после трансфекции или вирусной трансдукции оценивали с использованием проточных цитометров Becton Dickinson FACSCalibur flow-cytometry system (Becton Dickinson, США) и Guava easyCyte 8HT Flow Cytometry System (Millipore, Германия).

**Статистическую обработку** полученных результатов проводили с использованием пакета прикладных программ Microsoft Excel 2007. Статистическая достоверность разницы определялась с помощью t-критерия Стьюдента (Лакин. // Биометрия. 1990. 352 с.).

## **Результаты исследования и их обсуждение**

В ходе данной работы было проведено исследование применимости рекомбинантного гистона Н1.3 для вирусного и невирусного переноса нуклеиновых кислот в культуре. Рекомбинантный гистон Н1.3 человека является рекомбинантной и высоко очищенной молекулой N,N-бис-метионин-гистона Н1.3, которая, в отличие от природного аналога, содержит два остатка метионина на N-конце. Наличие N-концевого метионина облегчает процесс выделения и очистки рекомбинантного белка (Giglione et al. // EMBO J. 2003. V.22, №1).

На первом этапе работы было исследовано взаимодействие рекомбинантного гистона Н1.3 и нуклеиновых кислот с помощью электрофоретических методов. При образовании комплексов нуклеиновых кислот с гистонами посредством электростатических взаимодействий происходит нейтрализация зарядов и увеличение размера, что приводит к снижению подвижности (мобильности) комплексов при электрофорезе.

В рамках выполняемой работы было исследовано комплексообразование плДНК/Н1.3 не только в разных соотношениях, но и особенности комплексообразования в различных растворах, а также зависимость от времени инкубации и метода нанесения образцов в лунки агарозного геля. Показано, что двухвалентные ионы, такие как  $Mg^{2+}$  и  $Ca^{2+}$ , способны к связыванию с ДНК и нейтрализации ее отрицательного заряда. Наличие этих ионов влияет на эффективность трансфекции с использованием катионных липидов (Lam et al. // *Biochim Biophys Acta*. 2000. V.1463, №2). Исходя из этого в качестве растворов для комплексообразования плДНК и гистона Н1.3 использовали 135 мМ  $MgCl_2$ , 135 мМ и 0,3 М  $CaCl_2$ , 135 мМ  $KCl$ , 135 мМ и 150 мМ  $NaCl$ , питательную среду с содержанием 10% FBS и без FBS.

Определено оптимальное соотношение плДНК/Н1.3 для комплексообразования (w:w) — 1:2. Показано, что наиболее эффективно гистон Н1.3 связывает релаксированные формы плДНК, такие как кольцевая релаксированная и линейная, в то время как компактные формы плДНК, суперскрученная и денатурированная, хуже связываются с гистонами Н1.3. Это по-видимому связано с изменением конформации ДНК и стерическими проблемами доступа гистона ко всей поверхности цепи ДНК. Полученные данные указывают на важность не только электростатических взаимодействий, но и конформации плДНК при взаимодействии плДНК и гистона Н1.3. Возможно, для повышения эффективности комплексообразования плДНК и гистона Н1.3 необходим перевод плазмиды в кольцевую релаксированную или линейную форму.

Комплексообразование плДНК и гистона Н1.3 происходило приблизительно с одинаковой эффективностью во всех исследуемых растворах, однако использование культуральной среды с содержанием 10% FBS, приводило к размыванию полосок плДНК в геле, что, по-видимому, связано с взаимодействием сывороточных белков с плДНК и/или комплексами плДНК/Н1.3. Стоит отметить, что присутствие сыворотки в культуральной среде не повлияло на способность гистона Н1.3 связывать плДНК, оптимальное соотношение для комплексообразования также составило 1:2. Показано, что при длительном хранении комплексов плДНК/Н1.3 снижается их стабильность.

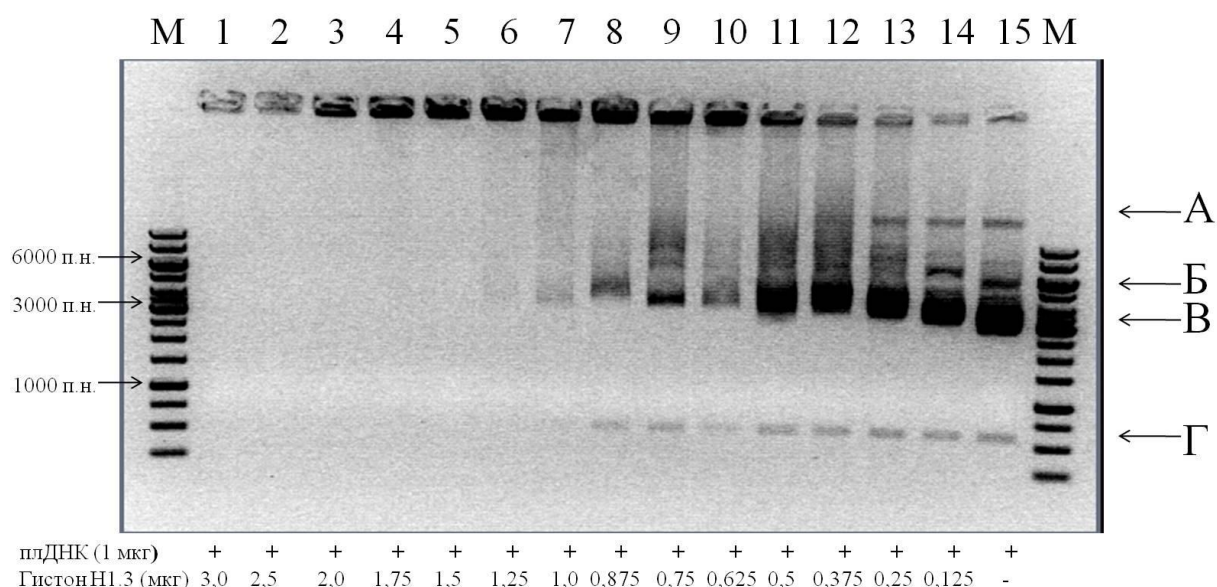


Рисунок 1 – Комплексообразование плДНК/Н1.3 в 150 мМ растворе NaCl. Длительная экспозиция при фотографировании геля, окрашенного бромистым этидием. Диапазон исследуемых количеств гистона Н1.3 (при количестве плазмидной ДНК 1 мкг): от 0,125 до 3,0 мкг. Плазмидная ДНК — рEGFP-N2. М — маркер Gene Ruler 1Kb DNA Lader. Лунки 1–15 — комплексы с разными соотношениями плДНК и гистона Н1.3 (w:w): 1 — 1:3, 2 — 1:2,5, 3 — 1:2, 4 — 1:1,75, 5 — 1:1,5, 6 — 1:1,25, 7 — 1:1, 8 — 1:0,875, 9 — 1:0,75, 10 — 1:0,625, 11 — 1:0,5, 12 — 1:0,375, 13 — 1:0,25, 14 — 1:0,125, 15 — 1:0. А — кольцевая релаксированная ДНК, Б — линейная ДНК, В — суперскрученная ДНК, Г — денатурированная ДНК.

Важную роль в эффективной трансфекции клеток играет значение дзета-потенциала (электрокинетического потенциала) комплексов нуклеиновых кислот с трансфекционным агентом. По литературным данным дзета-потенциал плазмидной ДНК варьирует от от -20 мВ до -40 мВ (Honary et al. // Trop J Pharm Res. 2013. V.12, №2). В работе был определен дзета-потенциал плазмидной ДНК рEGFP-N2, который составил -22,2 мВ, и показано, что при соотношении плДНК/Н1.3 (w:w) 1:25 происходит наибольшая нейтрализация дзета-потенциала комплексов (9,61 мВ). Полученные результаты по взаимодействию рекомбинантных нуклеиновых кислот с гистоном Н1.3 были использованы при выборе оптимальных соотношений плДНК/Н1.3 для трансфекции культур клеток.

Рекомбинантный гистон Н1.3 показал свою безопасность в клинических исследованиях и эффективность при лечении острого миелолейкоза (Gross et al. // Patent US 20110034370 A1. 2008). Механизм действия гистона Н1 на опухолевые клетки основан на его способности образовывать агрегаты с фосфолипидами, которые у 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) (Zhao et al. // Biochemistry. 2004. V.43, №31).

В нашей работе для определения цитотоксичности рекомбинантного гистона Н1.3 и его комплексов с нуклеиновыми кислотами мы использовали тест по оценке активности митохондриальных дегидрогеназ в клетках (MTS-тест).

В экспериментах *in vitro* были использованы концентрации гистона 50 мкг/мл, 250 мкг/мл (предполагаемая максимальная нетоксичная концентрация в кровотоке) и 1000 мкг/мл. Были определены цитотоксические концентрации рекомбинантного гистона и его комплексов с плазмидной ДНК, ингибирующих жизнеспособность первичных и трансформированных клеточных линий на 50% (англ. Cytotoxic concentration 50, CC50) (Таблица 1).

Таблица 1

Цитотоксические концентрации (CC50) рекомбинантного гистона Н1.3 и его комплексов с плазмидной ДНК

Культура клеток	CC50, мкг/мл					
	Гистон Н1.3			Комплексы плДНК/Н1.3		
	24 часа	48 часов	72 часа	24 часа	48 часов	72 часа
МСК из 3ТМ	716	250	567	515	486	509
Фибробласты	1362	520	637	722	486	609
HeLa	1612	1529	1256	3727	738	5230
МСF7	1336	1207	830	1271	463	692

Показано, что рекомбинантный гистон Н1.3 и комплексы плДНК/Н1.3 ингибируют жизнеспособность МСК из 3ТМ, фибробластов человека и клеток линии МСF7 в большей степени, чем клеточной линии HeLa. При инкубации в течение 72 часов добавление плДНК не оказывало существенного влияния на цитотоксичность гистона Н1.3. Цитотоксический эффект гистона Н1.3 и его комплексов зависит от клеточной линии. Например, для клеток линии HeLa добавление плДНК к гистону Н1.3 повышало их жизнеспособность, что наблюдалось после 24 и 72 часов инкубации.

На основании полученных данных показано, что максимальную терапевтическую концентрацию рекомбинантного гистона Н1.3 250 мкг/мл можно использовать в качестве нетоксической в экспериментах *in vitro*.

Полученные результаты по цитотоксичности рекомбинантного гистона Н1.3 и его комплексов с нуклеиновыми кислотами были использованы при выборе оптимальных соотношений плДНК/Н1.3 для трансфекции культур клеток.

Следующим этапом нашей работы стала оценка эффективности трансфекции клеток-мишеней рекомбинантными нуклеиновыми кислотами с применением гистона Н1.3 в качестве трансфекционного агента. По данным флуоресцентной микроскопии и проточной цитофлуориметрии можно сделать вывод, что гистон Н1.3 мало эффективен для доставки плДНК в первичные (МСК из 3ТМ, фибробласты человека) и трансформированные (HeLa, МСF7) культуры клеток.

Например, при трансфекции МСК из 3 ТМ плазмидой рEGFP-N2 с помощью гистона Н1.3 процент EGFP-позитивных клеток составил 0,96% при фоновом

уровне флуоресценции 0,19%. Для трансфекционного агента TransFast (положительный контроль) процент EGFP-позитивных клеток составил 11,57%. Оптимизация условий комплексообразования в различных растворах не привела к увеличению эффективности трансфекции с использованием рекомбинантного гистона H1.3.

Трансфекция киРНК, специфичной к GFP, в культуру клеток HeLa-GFP с помощью гистона H1.3 не привела к снижению их зеленой флуоресценции, что свидетельствует о низкой эффективности гистона H1.3 для трансфекции киРНК. Клетки HeLa-GFP содержат рекомбинантный ген *gfp*, с которого происходила транскрипция (синтез мРНК) и трансляция (синтез белка GFP). Белок детектируют по его зеленой флуоресценции. Если в клетку попадают киРНК, специфичные к мРНК гена GFP, они приводят к специфичной деградации мРНК гена *gfp*, снижению синтеза и, соответственно, внутриклеточного накопления GFP, что может быть обнаружено по снижению зеленой флуоресценции клеток. Количество клеток, в которых наблюдалось снижение зеленой флуоресценции при использовании гистона H1.3 (17,36%), сопоставимо с нетрансфицированным контролем и составило (15,02%).

В настоящее время для введения рекомбинантных нуклеиновых кислот в эукариотические клетки широко используют кальций-фосфатный метод, при котором нуклеиновая кислота образует с фосфатами комплекс, который затем поглощается клеткой. Кальций-фосфатный метод характеризуется простотой применения и низкой стоимостью, однако эффективность этого способа зависит от образования комплексов нуклеиновых кислот с фосфатом, которые чувствительны к значению рН растворов. Актуальной проблемой остается также разработка подходов к повышению эффективности кальций-фосфатного метода, не требующих специального оборудования и сохраняющих низкую стоимость метода.

В нашей работе было показано, что использование рекомбинантного гистона H1.3 повышало эффективность кальций-фосфатного метода трансфекции клеток HEK293T в 1,4 раза по отношению к клеткам, трансфицированным только кальций-фосфатным методом (Рисунок 2). Стоит отметить, что максимальная эффективность достигалась при добавлении небольшой концентрации гистона, что не приводило к полному связыванию плДНК, таким образом, ДНК продолжала нести суммарный отрицательный заряд (соотношение плДНК/H1.3 (w:w) 1:0,1), необходимый для комплексообразования с фосфатом. В то же время наличие единичных молекул гистона H1.3 на плДНК, возможно, повышало эффективность ядерного транспорта после проникновения комплексов в клетку.

Новым подходом, потенциально способным повысить эффективность генной и клеточной терапии, может стать использование генетических векторов на основе вирусов. Широкое применение в генной терапии нашли векторные системы на основе ретровирусов, находящиеся на разных стадиях клинических испытаний.

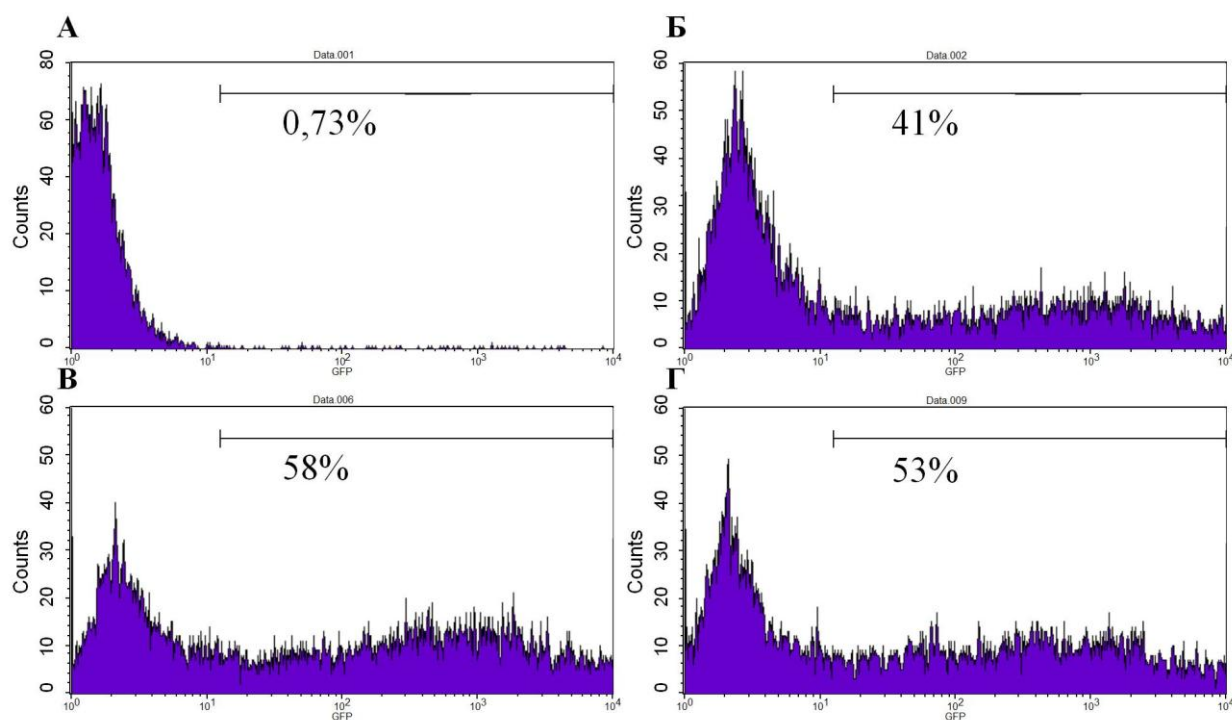


Рисунок 2 – Проточная цитофлуориметрия клеток HEK293T, трансфицированных с помощью кальций-фосфатного метода в комбинации с гистонофекцией. 48 часов после трансфекции. Клетки трансфицировали плДНК рEGFP-N2. Фоновый уровень флуоресценции составил 0,73% (А). Б — трансфекция с помощью кальций-фосфатного метода. В — трансфекция клеток с помощью комбинированного метода: гистонофекции, соотношение плДНК/Н1.3 — 1:0,1 (w:w), и кальций-фосфата. Г — трансфекция клеток с помощью комбинированного метода: гистонофекции, соотношение плДНК/Н1.3 — 1:3 (w:w), и кальций-фосфата.

На сегодняшний день используют различные вещества для повышения эффективности вирусной трансдукции: поликатион декстрана, поликатион полибрена, протамина сульфат и др. Однако эти методы обладают рядом недостатков, препятствующих их применению в клинике. В связи с этим остро стоит вопрос поиска новых эффективных и биологически безопасных методов генетической модификации клеток.

Для исследования влияния рекомбинантного гистона Н1.3 на лентивирусную трансдукцию клеток линии HeLa была выбрана максимальная нетоксичная концентрация рекомбинантного гистона — 250 мкг/мл.

В работе использовали рекомбинантный лентивирус LV-GFP на основе ВИЧ-1, экспрессирующий зеленый флуоресцентный белок GFP. Эффективность вирусной трансдукции определяли по экспрессии репортерного гена *gfp*. Ранее в нашей лаборатории было показано, что рекомбинантный лентивирус LV-GFP может быть использован в качестве модели для тестирования химиопрепаратов, а также для скрининга новых способов воздействия на клетки человека, включая генную терапию (Головин и др. // Современные технологии в медицине. 2012. Т1).

Перед трансдукцией клеток HeLa рекомбинантный лентивирус инкубировали с рекомбинантным гистоном Н1.3. Показано, что рекомбинантный гистон Н1.3 повышает эффективность лентивирусной трансдукции в 2,5 раза (Рисунок 3).

Показано, что рекомбинантный гистон Н1.3 снижает эффективность аденовирусной трансдукции и обладает противовирусным эффектом *in vitro*. 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. Лечение аденовирусных инфекций осложняется наличием различных серотипов аденовируса. В настоящее время ведется активный поиск новых препаратов для терапии аденовирусной инфекции.

В нашей работе были исследованы противовирусные свойства рекомбинантного гистона Н1.3 в культуре клеток *in vitro*. 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 репликационно-дефектный аденовирус Ad5-EGFP может быть использован в качестве тест-системы для скрининга противовирусных препаратов (Мартынова и др. // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2012. Т.7, №3).

Раствор аденовируса Ad5-EGFP обрабатывали рекомбинантным гистоном Н1.3, после чего добавляли к клеткам линии HeLa. Эффективность вирусной трансдукции определяли по экспрессии репортерного гена *egfp*. Показано, что рекомбинантный гистон Н1.3 в нетоксичной для клеток концентрации снижает эффективность аденовирусной трансдукции в 5,5 раз (Рисунок 3).

Анализ образования бляшек при инфицировании клеток линии HEK293A рекомбинантным аденовирусом Ad5-EGFP показал, что пре-инкубация аденовируса Ad5-EGFP с гистоном Н1.3 приводит к ингибированию процесса образования бляшек, что указывает на противовирусные свойства рекомбинантного гистона Н1.3. Добавлении гистона Н1.3 к аденовирусу в разведении  $10^{-6}$  (67 БОЕ/мл) привело к сокращению образования бляшек в 7,7 раз. Добавлении гистона Н1.3 к аденовирусу в разведении  $10^{-7}$  (6,7 БОЕ/мл) привело к полному ингибированию образования бляшек (Таблица 2).

Стоит отметить, что данные, полученные методом проточной цитофлуориметрии соотносятся с данными, полученными при подсчете количества бляшек, образуемых клетками HEK293A после инфицирования аденовирусом — одинаковый порядок ингибирования.

Различное действие на ленти- и аденовирусную инфекцию гистона Н1.3 возможно объясняется различиями в строении и размерах ленти- и аденовирусных частиц.



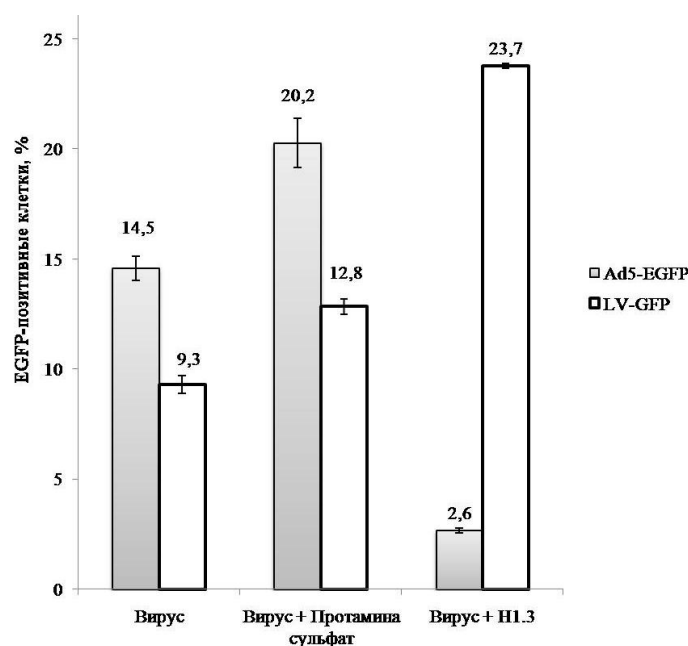


Рисунок 3 – Влияние гистона H1.3 на ленти- и аденовирусную инфекцию. Процент GFP-позитивных клеток подсчитывали через 48 часов после трансфекции с помощью проточной цитофлуориметрии. Фоновый уровень флуоресценции составил 0,5%. Вирус — клетки HeLa, трансдуцированные рекомбинантным вирусом (Ad5-EGFP или LV-GFP). Вирус + Протамина сульфат — клетки, трансдуцированные вирусом с добавлением протамин сульфата. Вирус + H1.3 — клетки, трансдуцированные смесью вируса и гистона H1.3. Результаты представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение (n=3).

Таблица 2

Образование БОЕ клетками HEK293A при аденовирусной трансдукции

Разведение вируса	Количество бляшек	
	Ad5-EGFP	Предварительная инкубация Ad5-EGFP с гистонам H1.3
$10^{-5}$	Обширный цитопатический эффект	30
$10^{-6}$	70	9
$10^{-7}$	5	0

Аденовирус серотипа 5 связывается с рецептором CAR (англ. Coxsackie and adenovirus receptor) на поверхности клетки через головку фибры. Затем интегрин 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 мешая взаимодействию вирусных частиц с плазматической клеточной мембраной и не давая вирусу проникнуть внутрь клетки.

Слияние мембран является основным механизмом доставки вирусного генома оболочечных вирусов (таких как лентивирусы) в клетки-мишени. После первичной неспецифической адгезии вируса к клеточной поверхности, вирусные гликопротеины специфически связываются с родственными рецепторами, после чего происходит слияние липидных мембран вируса и клетки-мишени и, вирусный нуклеокапсид высвобождается в цитоплазму. Гистон в этом случае может выступать как катионная биомолекула, действуя по аналогии с протамином сульфата, неспецифически связываясь с вирусной частицей за счет электростатического взаимодействия. При этом происходит снижение отрицательного заряда, снижение электростатического отталкивания отрицательно заряженных вирусных частиц и плазматической клеточной мембраны, что приводит к повышению эффективности первичной неспецифической адгезии вируса к клеточной поверхности.

Для выявления механизма взаимодействия рекомбинантного гистона Н1.3 с ленти- и аденовирусными частицами необходимы дальнейшие исследования, например с использованием сканирующей электронной микроскопии вирусных частиц в комплексе с гистонами.

## ВЫВОДЫ

1. Установлено оптимальное соотношение плазмидной ДНК и рекомбинантного гистона Н1.3 для комплексообразования — 1:2 (w:w). Показано, что наиболее эффективно гистон Н1.3 связывает релаксированные формы плазмидной ДНК, такие как кольцевая релаксированная и линейная формы, в то время как компактные формы плазмидной ДНК, суперскрученная и денатурированная, хуже связываются с гистонами Н1.3.

2. Определена максимальная нетоксичная концентрация рекомбинантного гистона Н1.3 (250 мкг/мл) и  $CC_{50}$  для первичных и трансформированных культур клеток. Добавление пДНК к гистону Н1.3 не оказывало существенного влияния на жизнеспособность клеток.

3. Рекомбинантный гистон Н1.3 в чистом виде мало эффективен для доставки рекомбинантных нуклеиновых кислот в различные культуры клеток. Однако, использование рекомбинантного гистона Н1.3 повышало эффективность кальций-фосфатного метода трансфекции в 1,4 раза по отношению к клеткам, трансфицированным только кальций-фосфатным методом.

4. Рекомбинантный гистон Н1.3 повышает эффективность лентивирусной трансдукции в 2,5 раза. В то же время гистон Н1.3 в 5,5–7,7 раз снижает эффективность аденовирусной трансдукции и оказывает ингибирующее действие на формирование бляшек клетками НЕК293А, инфицированными аденовирусом серотипа 5, что указывает на противовирусные свойства гистона Н1.3 по отношению к аденовирусам.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

По материалам диссертации опубликовано 20 печатных работ, в том числе 6 статей в ведущих рецензируемых научных журналах и изданиях, рекомендованных ВАК для защиты кандидатских и докторских диссертаций, 13 тезисов докладов на Международных и Всероссийских конференциях и конгрессах, получен 1 патент на изобретение РФ.

1. Патент на изобретение РФ: Способ повышения эффективности вирусной трансдукции. Заявитель: ОАО «Институт стволовых клеток человека». Авторы: Ризванов А.А., **Соловьева В.В.**, Исаев А.А., Генкин Д.Д. Патент на изобретение №2478711. Заявка №2011151506/10. Приоритет изобретения 19 декабря 2011 г. Зарегистрирован в Государственном реестре изобретений РФ 10 апреля 2013 г. Срок действия патента истекает 19 декабря 2031 г.

2. Соловьева В.В. Перенос рекомбинантных нуклеиновых кислот в клетки (трансфекция) с помощью гистонов и других ядерных белков / В.В. Соловьева, Н.В. Кудряшова, А.А. Ризванов // Клеточная Трансплантология и Тканевая Инженерия. – 2011. – Т.6, №3. – С. 29-40. (Список ВАК, РИНЦ 0,243)

3. Соловьева В.В. Влияние рекомбинантного гистона H1.3 на эффективность лентивирусной трансдукции клеток человека *in vitro* / В.В. Соловьева, А.А. Исаев, Д.Д. Генкин, А.А. Ризванов // Клеточная Трансплантология и Тканевая Инженерия. – 2012. – Т.7, №3. – С.151–154. (Список ВАК, РИНЦ 0,243)

4. Соловьева В.В. Исследование эндогенной секреции сосудистого эндотелиального фактора роста мультипотентными стволовыми клетками из зачатков третьих моляров человека / В.В. Соловьева, Н.Л. Блатт, А.К. Шафигуллина, А.А. Ризванов // Клеточная Трансплантология и Тканевая Инженерия. – 2012. – Т.7, №3. – С.155–158. (Список ВАК, РИНЦ 0,243)

5. Blatt N.L. Application of Cell and Tissue Culture Systems for Anticancer Drug Screening / N.L. Blatt, R.N. Mingaleeva, **V.V. Solovyeva**, S.F. Khaiboullina, V.C. Lombardi, A.A. Rizvanov // World Applied Sciences Journal. – 2013. – V.23, №3. – P.315-325. (Список ВАК)

6. Мингалеева Р.Н. Применение культур клеток и тканей для скрининга противоопухолевых препаратов *in vitro* / Р.Н. Мингалеева, **В.В. Соловьева**, Н.Л. Блатт, А.А. Ризванов // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2013. – Т.8, № 2. – С.20-28. (Список ВАК, РИНЦ 0,243)

7. Solovyeva V.V. Human Adipose Derived Stem Cells Do Not Alter Cytokine Secretion in Response To The Genetic Modification With pEGFP-N2 Plasmid / V.V. Solovyeva, I.I. Salafutdinov, E.V. Martynova, S.F. Khaiboullina, A.A. Rizvanov // World Applied Sciences Journal. – 2013. – V.26, №7. – P.968-972. (Список ВАК)

## Список сокращений

Ad (англ. Adenovirus) — аденовирус  
DMEM (англ. Dulbecco's modified Eagle's medium) — среда Игла, модифицированная по методу Дульбекко  
DPBS (англ. Dulbecco's modified Phosphate Buffered Saline) — раствор Дульбекко  
EGFP (англ. Enhanced Green Fluorescent Protein) — улучшенный зеленый флуоресцентный белок  
FBS (англ. Fetal Bovine Serum) — сыворотка крови плодов коровы  
LV (англ. Lentivirus) — лентивирус  
MOI (англ. Multiplicity Of Infection) — множественность инфицирования  
NTC (англ. Non-transfection Control) — нетрансфицированный контроль  
OD (англ. Optical Density) — оптическая плотность  
PBS (англ. Phosphate Buffered Saline) — натрий-фосфатный буфер  
PMS (англ. Phenasin Methosulphate) — феназинметасульфат  
w:w — весовое соотношение двух веществ  
a.o. — аминокислотные остатки  
БОЕ — бляшкообразующая единица  
ВИЧ — вирус иммунодефицита человека  
ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота  
киРНК — короткая интерферирующая РНК  
мРНК — матричная рибонуклеиновая кислота  
МСК из ЗТМ — культура МСК, выделенных из зачатков третьих моляров человека  
МСК — мезенхимная стволовая клетка  
плДНК — плазмидная ДНК  
РНК — рибонуклеиновая кислота  
т.п.н. — тысяч пар нуклеотидов  
ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота

Просьба высылать отзывы на автореферат по адресу:  
420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д.18, главное здание КФУ, к. 105, отдел аттестации научно-педагогических кадров, e-mail: RGDzjubenko@kpfu.ru, факс 8(843)233-78-67. Диссертационный совет Д212.081.08. Ученый секретарь Абрамова Зинаида Ивановна. Факс 8(843)238-76-01.  
E-mail автора: *solovyovavv@gmail.com*

Формат 60x84/16. Гарнитура Таймс. Бумага офсетная №1  
Печать RISO. Уч.-изд.л. 1,2. Тираж 100 экз.  
ЦЕНТР ПЕЧАТИ “Линк”. Казань, ул. Карла Маркса, 51