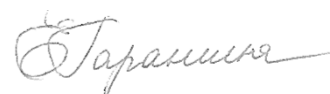


На правах рукописи



ГАРАНИНА ЕКАТЕРИНА ЕВГЕНЬЕВНА

**КО-ЭКСПРЕССИЯ И ИММУНОГЕННЫЕ СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНЫХ
БЕЛКОВ VEGF165 И FGF2 В СОСТАВЕ МУЛЬТИЦИСТРОННЫХ
КОНСТРУКЦИЙ**

03.01.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань 2016

Работа выполнена на кафедре генетики, а также на базе научно-образовательного центра фармацевтики ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Научный руководитель: доктор биологических наук, доцент,
главный научный сотрудник ИФМиБ
Ризванов Альберт Анатольевич

Научный консультант: доктор медицинских наук, профессор,
зав. кафедрой медицинской биологии
и генетики КГМУ
Исламов Рустем Робертович

Официальные оппоненты: **Фаизов Тагир Хадиевич**, доктор ветеринарных наук, профессор биохимии, заведующий лабораторией биохимии и молекулярно-генетического анализа ФГБУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности» (г. Казань);

Ермолин Игорь Леонидович, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой гистологии с цитологией и эмбриологией ГБОУ ВПО "Нижегородская государственная медицинская академия" Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Нижний Новгород)

Ведущая организация: ФГБОУ ВО Ульяновский государственный университет (г. Ульяновск)

Защита диссертации состоится «22» сентября 2016 г. в 13⁰⁰ на заседании диссертационного совета Д 212.081.08 при ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420055, г. Казань, ул. Карла Маркса, д. 74, в зале заседания ученого совета (аудитория №205А)

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. Н.И. Лобачевского при Казанском (Приволжском) федеральном университете.

Автореферат разослан « » августа 2016 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук



З.И. Абрамова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Развитие методов генодиагностики, энзимодиагностики и научных принципов генной терапии открывают перспективы разработки альтернативных подходов и внедрения в практическую медицину технологий генной и клеточной терапии различных дегенеративных заболеваний человека, приводящих к ранней инвалидизации. Ряд нейродегенеративных заболеваний, в частности, боковой амиотрофический склероз, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, обусловлены нарушением различных биохимических процессов, требующих более детального изучения. Существующие методы лечения вышеуказанных патологий носят паллиативный характер и не способствуют функциональному восстановлению больного, что обуславливает необходимость разработки альтернативных подходов, а также анализа и синтеза биологически активных веществ с дальнейшим выяснением их физиологического действия на организм.

На современном этапе генная терапия предполагает лечение с помощью терапевтических (рекомбинантных) генов человека, обеспечивающих синтез белков взамен собственных дефектных для коррекции биохимических процессов в организме, или, например, синтез дополнительных белков для стимулирования регенерации.

Плазмидные векторы ввиду их биобезопасности активно применяют для доставки экзогенной ДНК в клетки человека (Pichon et al. // Curr Opin Biotechnol. 2010. Vol. 21, №5). Стандартные и наиболее распространенные техники введения плазмидных векторов в эукариотические клетки включают электропорацию или химическую трансфекцию с помощью катионных и/или липофильных надмолекулярных комплексов. Для лечения некоторых заболеваний наибольший терапевтический эффект может быть достигнут путем экспрессии нескольких терапевтических генов. Однако одновременное введение нескольких плазмид, кодирующих разные гены человека, не гарантирует стабильной ко-экспрессии трансгенов и, соответственно, биосинтеза каждого из белков в клетках-мишенях. В то же время, скоординированный совместный биосинтез рекомбинантных белков важен для создания оптимального тканевого микроокружения при паракринном механизме стимуляции регенерации или аутокринном механизме модуляции фенотипа клеток-мишеней.

Метод генетической модификации мононуклеарных клеток пуповинной крови человека двухкассетными плазмидными конструкциями (патент на изобретение РФ №2431669) оказался эффективным для обеспечения экспрессии мРНК клонированных генов с последующим биосинтезом рекомбинантных белков *in vitro* и *in vivo*. Трансфекция мононуклеарных клеток крови пуповины (МККП) плазмидой pBud-Sox2-Oct4, кодирующей транскрипционные факторы октамер связывающего белка 4 (Oct4) и Sox2 существенно повышала дифференцировочный потенциал клеток в различные типы: в эндотелиальные, микроглиальные и, что немаловажно, нейрональные. Модифицированные мононуклеарные клетки из пуповинной крови, сверхэкспрессирующие фактор роста сосудистого эндотелия (VEGF) и основной фактор роста фибробластов 2 типа (FGF2) при трансфекции плазмидой pBud-VEGF-FGF2, дифференцировались в астроцитоподобные клетки, которые морфологически имели звездчатую форму и экспрессировали характерный маркер астроцитов S100 (HNA+S100+) (Rizvanov et al. // Exp Biol. 2011. Vol.236, №1).

Несмотря на биобезопасность плазмидных векторов, они обладают низкой эффективностью трансфекции *in vivo* и недолговременной экспрессией трансгенов. Вирусный метод доставки рекомбинантных нуклеиновых кислот обеспечивает долговременную экспрессию трансгена и стабильную продукцию белковых макромолекул. По данным (февраль 2016 года) интернет-ресурса www.clinicaltrials.gov восемь клинических испытаний с использованием адено-ассоциированных и одно — с использованием лентивирусного векторы для терапии заболеваний ЦНС ведутся в настоящее время или находятся на стадии завершения.

Репликационно-дефектные аденовирусы обладают рядом особенностей, оптимальных для применения в генной терапии: они способны легко трансдуцировать различные клеточные типы нервной ткани, в том числе пост-митотические нейроны мозга; обладают низкой патогенностью и высокой эффективностью экспрессии рекомбинантных генов; обеспечивают долговременную (2-7 лет) экспрессию трансгенов (Arraiahgari et al. // Expert Opin Biol Ther. 2015. Vol.15, №3). Для достижения ко-экспрессии различных трансгенов для терапии бокового амиотрофического склероза (БАС) ранее нами были разработаны различные комбинации аденовирусов, кодирующих кДНК генов *ncam1*, *vegfl65*, *gdnf* для модификации МККП и последующей трансплантации трансгенным мышам с фенотипом БАС. Однако, как и в случае плазмидных векторов, ко-трансдукция клеток разными вирусными векторами не гарантирует одновременный синтез рекомбинантных белков в каждой инфицированной клетке. Таким образом, помимо поиска оптимального вектора-переносчика генетической информации, актуальной остается проблема выбора эффективной стратегии ко-экспрессии генов. 2А-пептидные последовательности пикорновирусов широко применяются для обеспечения ко-экспрессии нескольких генов. Преимущества данной стратегии заключаются в независимой от типа клеток ко-экспрессии белков, соединенных 2А-пептидной последовательностью. Несколько полипептидов синтезируется в равном количестве с одной мРНК под контролем общего промотора, а малый размер 2А-пептида (54-174 п.н.) позволяет значительно экономить генетическую информацию, что важно при применении векторов с ограниченной пакующей способностью. Однако наличие дополнительных аминокислотных остатков на С-конце пептида может оказывать существенное влияние на формирование вторичной и третичной структуры белка, а также иммуногенные свойства, что является одним из лимитирующих факторов для клинического применения (de Felipe // Curr Gene Ther. 2002. Vol.2, №3) . Решение данных проблем откроет дорогу к созданию аденовирусных конструкций, ко-экспрессирующих различные терапевтические белки посредством 2А-аминокислотных последовательностей вируса ящура, для генетической модификации стволовых клеток и разработке новых перспективных методов лечения нейродегенеративных заболеваний.

Цель работы — определение ко-экспрессии и выявление иммуногенных свойств белков фактора роста эндотелия сосудов и основного фактора роста фибробластов в клетках человека, модифицированных генетическими конструкциями, содержащих 2А-пептидные последовательности пикорновирусов.

В рамках цели диссертационного исследования были поставлены следующие задачи:

1. Создать экспрессионные 2А-пептидные мультицистронные плазмидные и аденовирусные конструкции, кодирующие белки генов *vegfl65* и *fgf2*;

2. Исследовать ко-экспрессию генов, биосинтез и ко-трансляционное расщепление рекомбинантных белков в первичных и иммортализованных культурах клеток человека (эмбриональной линии почки человека, содержащей Т-антиген вируса SV40 (HEK293T); стволовых клетках из жировой ткани человека (СК-ЖТ), фибробластах из кожи человека, в мононуклеарных клетках крови пуповины человека), трансфицированных полученными плазмидными векторами или трансдуцированных рекомбинантными аденовирусами.

3. Провести анализ иммуногенных свойств рекомбинантных белков в составе мультицистронных плазмидных и аденовирусных векторов на модели лабораторных животных *in vivo*.

4. Трансдуцировать мононуклеарные клетки крови пуповины человека аденовирусом, ко-экспрессирующим гены *vegf* и *fgf2*, соединенные 2А-пептидной последовательностью пикорновирюсов, и исследовать биосинтез рекомбинантных белков, выживаемость, миграцию и дифференцировку генетически модифицированных клеток после трансплантации трансгенным мышам с моделью бокового амиотрофического склероза.

Научная новизна. В работе впервые созданы мультицистронные генетические конструкции с применением 2А-пептидных последовательностей пикорновирюсов. Впервые показано, что разработанные генетические конструкции на основе плазмидного и аденовирусного векторов обеспечивают одновременную экспрессию генов и последующий биосинтез фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и основного фактора роста фибробластов (FGF2). Несомненной новизной обладают данные, полученные методом иммуноферментного анализа, свидетельствующие об отсутствии иммунного ответа на 2А-пептидный антиген у лабораторных животных при введении рекомбинантного аденовируса *in vivo*. Также впервые получены данные, свидетельствующие о ко-транскрипции клонированных генов, биосинтезе и ко-трансляционном расщеплении рекомбинантных белков в генетически модифицированных клетках, трансфицированных рекомбинантными плазмидными и аденовирусными генетическими конструкциями.

Принципиально новыми являются данные о способности МККП к трансдукции полученной конструкцией, о том, что генетически модифицированные клетки пуповинной крови человека, трансплантированные трансгенным мышам с фенотипом бокового амиотрофического склероза, выживают, мигрируют в спинной мозг, ко-экспрессируют рекомбинантные белки и дифференцируются в клетки, экспрессирующие маркеры астроцитов и шванновских клеток.

Научно-практическая ценность работы. Настоящее исследование закладывает научные принципы генотерапии с применением 2А-пептидных последовательностей пикорновирюсов для обеспечения ко-экспрессии генов и биосинтеза рекомбинантных белков. Данные, полученные в рамках диссертационной работы, имеют практическую ценность для разработки методов генной и генно-клеточной терапии наследственных и приобретенных заболеваний человека.

Исследование иммуногенности 2А-пептидных плазмидных и вирусных векторов демонстрирует биобезопасность и возможность биомедицинского применения разработанных генетических конструкций.

Апробированный метод генетической модификации мононуклеарных клеток крови пуповины человека 2А-пептидными вирусными конструкциями может быть использован для разработки эффективных методов терапии нейродегенеративных заболеваний человека.

Положения выносимые на защиту

1. Рекомбинантный аденовирус, ко-экспрессирующий гены сосудистого эндотелиального фактора роста и основного фактора роста фибробластов, соединенные в одной открытой рамке считывания через фурин-содержащую 2А-пептидную последовательность, обеспечивает биосинтез и ко-трансляционное расщепление рекомбинантных белков в клетках человека *in vitro* и *in vivo*.
2. Фурин-содержащие 2А-пептидные плазмидные и аденовирусные векторы не вызывают иммунный ответ на антиген вируса ящура.

Апробация работы

Материалы диссертации представлены на следующих всероссийских и международных симпозиумах, конгрессах и конференциях: Всероссийская студенческая научная конференция памяти академика АН РТ проф. Д.М. Зубаирова (Казань, 2011); XV международная Пушинская школа – конференция молодых ученых (Пушино, 2011); XVI международная Пушинская школа–конференция молодых ученых (Пушино, 2012); V ежегодный симпозиум «Актуальные вопросы генных и клеточных технологий» (Москва, 2012); международная научная конференция студентов и молодых ученых «Современные теоретические и практические аспекты клинической медицины» (Одесса, 2012); XVII Всероссийская научно-практическая конференция «Молодые ученые в медицине» (Казань, 2012); III международная научно-практическая конференция «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине» (Казань, 2013); I научно-практическая конференция студентов и молодых ученых Института фундаментальной медицины и биологии «Современные проблемы фундаментальной медицины и биологии» (Казань, 2013); VI ежегодный международный симпозиум «Актуальные вопросы генных и клеточных технологий» (Москва, 2013); международная научно-практическая конференция «Современные проблемы науки и образования» (Сочи, 2013); международная конференция «Scientific research and their practical application. Modern state and ways of development» (Киев, 2013); международная научно-практическая конференция «Актуальные вопросы науки и образования» (Москва, 2014); IV международная научно-практическая конференция «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и практической медицине» (Казань, 2014); XIX международная Пушинская школа – конференция молодых ученых (Пушино, 2015).

Публикация результатов исследования

По материалам диссертации опубликовано 3 статьи в ведущих рецензируемых научных журналах и изданиях, рекомендованных ВАК для защиты кандидатских диссертаций, и 21 тезис докладов на международных и всероссийских конференциях и конгрессах.

Структура и объем диссертационной работы

Материалы диссертационной работы изложены на 157 страницах машинописного текста. В работе приведено 32 рисунка и 14 таблиц. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения, выводов, заключения и списка литературы (263 наименования).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. В работе использованы следующие клеточные культуры: культура клеток эмбриональной линии почки человека, содержащая Т-антиген вируса SV40 НЕК293Т; культура клеток эмбриональной линии почки человека НЕК293А; первичная культура клеток из жировой ткани человека (СК-ЖТ), мононуклеарные клетки крови пуповины (МККП).

Исследование иммуногенных свойств рекомбинантных белков проведено на лабораторных мышах *Mus musculus*. Оценка миграции жизнеспособности и дифференцировки трансплантированных клеток выполнены на трансгенных мышах линии B6SJL-Tg(SOD1-G93A)dl1Gur/J (002726)

Создание кассеты VEGF165-FuP2A-FGF2. Первоначально с помощью геноспецифичных праймеров проводили ПЦР-амплификацию фрагмента кДНК генов VEGF165 и FGF2 с присоединением нуклеотидной последовательности 2А-пептида, ксоRиоторая также содержит сайт гидролиза фуриновой протеазой, а также сайт гидролиза эндонуклеазой *EcoRI*. Полученные в ходе первого раунда ПЦР-продукты использовали для дальнейшей асимметричной амплификации с последующим получением фрагмента VEGF165-FuP2A-FGF2.

Получение экспрессионных конструкций на основе аденовирусных и плазмидных векторов. Для создания экспрессионных конструкций на основе аденовируса первоначально проводили ПЦР-амплификацию для постановки *att*-сайтов, необходимых для рекомбинации между вектором донором и вектором назначения. Полученные в ходе ПЦР-продукты анализировали методом горизонтального электрофореза в агарозном геле, очищали на колонке с использованием набора GeneJet Gel Extraction Kit (Fermentas). Очищенный ПЦР продукт использовали для первоначального субклонирования в плазмидный вектор pDONR221 при помощи ВР-рекомбинации (Invitrogen). Рекомбинационной смесью трансформировали компетентные клетки *E.coli* Top10 (Cohen et al. // Proc Natl Acad Sci U S A.1973. Vol.70, №11). Наличие вставки подтверждали ПЦР-скринингом бактериальных колоний, а также секвенированием.

Для получения экспрессионной аденовирусной конструкции проводили ферментативную реакцию LR-рекомбинации между вектором-донором pDONR-VEGF165-FuP2A-FGF2 и вектором pAd/CMV/V5-Dest с последующей трансформацией бактериальных клеток. Наличие вставки целевых генов подтверждено секвенированием.

Полученную в ходе асимметричной ПЦР-амплификации кассету VEGF165-FuP2A-FGF2, фланкированную сайтами рестрикции эндонуклеаз *KpnI* и *EcoRI*, в дальнейшем клонировали в экспрессионном плазмидном векторе pEGFP-N2 (Clontech) с помощью реакции рестрикции-лигации по «липким концам». Для этого ПЦР-продукт и плазмидную ДНК гидролизовали рестриктазами *KpnI* и *EcoRI* с дальнейшей очисткой и лигированием с использованием фермента Т4 ДНК-лигазы.

Выделение плазмидной ДНК pAd-VEGF165-FuP2A-FGF2 и pVEGF165-FuP2A-FGF2-P2A-EGFP проводили с использованием набора GeneJet Plasmid Miniprep Kit (Fermentas) согласно рекомендованным производителем инструкциям.

Исследование ко-экспрессии рекомбинантных белков VEGF165 и FGF2 in vitro. Для исследования ко-экспрессии, а также процессинга белков VEGF165 и FGF2 проводили генетическую модификацию иммортализованных и первичных клеточных культур полученными ранее препаратами плазмидной ДНК. Ко-экспрессию белков в

трансфицированных клетках выявляли при помощи иммуноцитохимического анализа. Ко-трансляционное расщепление и процессинг белков исследовали с помощью электрофореза в денатурирующих условиях (Laemmli, 1980) с последующим иммуноблоттингом с использованием антител козла к белку сосудистого эндотелиального фактора роста (Sigma) и антител мыши к основному фактору роста фибробластов (GenScript).

Получение рекомбинантного аденовируса Ad5-VEGF165-FuP2A-FGF2. Рекомбинантный аденовирус получали с помощью трансфекции культуры клеток HEK293A линейризованной плазмидной ДНК (гидролиз рестриктазой *PacI*). О продукции вирусных частиц свидетельствует так называемый цитопатический эффект, выраженный в изменении морфологии клеток. Выход вирусных частиц из клеток индуцировали применением нескольких циклов замораживания-оттаивания. Осаждение клеток проводили при 3000 об/мин в течение 15 мин с дальнейшей фильтрацией супернатанта. Получение препаративного количества аденовируса достигали повторным инфицированием клеточной линии HEK293A ранее полученным вирусным стоком с последующим криолизом и концентрированием в градиенте хлорида цезия по стандартному протоколу. Титр полученного вируса Ad5-VEGF165-FuP2A-FGF2 определяли по оптической плотности (A260) после диализа против фосфатно-солевого буфера, а также по бляшкообразованию с нанесением агарозного слоя.

Исследование иммуногенных свойств рекомбинантных белков in vivo. Целью второго этапа исследования стала оценка иммуногенности 2А-пептидных препаратов в составе мультицистронных конструкций *in vivo*. Исследования активации иммунного ответа на антигены сосудистого эндотелиального фактора роста, 2А-пептид вируса ящура, а также аденовирусные белки проводили на белых 6 месячных лабораторных мышцах самцах *Mus musculus*. Все манипуляции с животными проводили в соответствии с правилами, рекомендованными Физиологической секцией Российского национального комитета по биологической этике (Генин и др., 2001), и приказом Минздрава РФ № 267 от 19.06.2003 "Об утверждении правил лабораторной практики".

Предварительно осуществлялся забор венозной крови с последующим получением сыворотки, которая служила отрицательным контролем. Первой группе животных внутримышечно вводили по 3×10^9 вирусных частиц диализованного рекомбинантного аденовируса Ad5-VEGF165-FuP2A-FGF2 в объеме 50 мкл физиологического раствора. Второй группе животных вводили конъюгат 2А-пептида, конъюгированный по сульфгидрильной группе N-концевого цистеина гемоцианином фиссуреллы. Проведён анализ аминокислотных последовательностей 2А-пептидов различных пикорнавирусов: F2A, T2A, E2A.

F2A: VKQTLNFDLLKLAGDVESNPG-P

T2A: EGRGSLTTCGDVEENPG-P

E2A: QCTNYALLKLAGDVESNPG-P

На основании 100% гомологии С-концевого участка 2А-пептидов был синтезирован 9-аминокислотный пептид CG-9 (CGDVEENPG). Цистеин на N-конце пептида гомологичен последовательности T2A пептида. С помощью конъюгации по сульфгидрильной группе с белком KLH был получен комплекс, который позволит проводить иммунизацию животных с целью получения специфических анти-2А-пептидных антител. Конъюгат пептида в концентрации 1 мг/мл вводили внутрибрюшинно с полным адъювантом Фрейнда в общем объеме 200 мкл/животное. Конечная концентрация 2А-антигена составила 25 мкг.

Третьей группе животных вводили внутривенно 50 мкг плазмидной ДНК pVEGF165-FuP2A-FGF2-P2A-EGFP с использованием катионного раствора Turbofect *in vivo* (Thermoscientific). Для иммунизации с трансфицирующим агентом предварительно готовили раствор 5% глюкозы с плазмидной ДНК и 6 мкл катионного раствора.

Забор крови и повторное введение плазмидной ДНК проводили через 28 дней после первого введения. Концентрация 2А-пептида и количество вирусных частиц осталось прежним. Через 14 дней после повторного введения проводили финальный забор крови из венозного синуса. Животных предварительно наркотизировали раствором хлоралгидрата (Acros Organics). Из полученной венозной крови выделяли сыворотку.

Методом иммуноферментного анализа была проведена оценка иммуногенности 2А-пептидных препаратов в составе плазмидной и аденовирусной конструкций, а также эффективность экспрессии белков аденовируса и сосудистого эндотелиального фактора роста *in vivo*.

Исследование иммунного ответа к VEGF проводили с использованием коммерческого набора (Вектор Бест, Уфа) в соответствии с протоколом производителя. Для оценки иммуногенности 2А-пептида в составе аденовирусной и плазмидной конструкции лунки 96-луночного планшета для ИФА (BD Biosciences) покрывали 10 мкг антигена. В качестве антигенов служили ранее полученный конъюгат 2А-пептида, а также лизат клеток НЕК293А, трансдуцированных аденовирусом. 10 мкг антигена растворяли в 100 мкл карбонат-бикарбонатного буфера (рН 9,6). Неспецифическое связывание с белками блокировали добавлением 3% БСА в течение 2 часов при комнатной температуре. После трехкратной промывки лунки планшета покрывали 100 мкл сыворотки, разведенной в соотношении 1:100 блокирующим буфером. Инкубацию с первичными антителами проводили 16 часов при +4°C. В качестве положительного контроля использовали ранее полученные антитела кролика, а также синтезированные антитела к пептиду CGDVEENPG, конъюгированному с KLH (Genscript). После инкубации с первичными антителами лунки планшета промывали раствором ФСБ-Т в течение 1 часа. Инкубацию со вторичными антителами против тяжелой и легкой цепи иммуноглобулинов кролика и/или мыши (anti-mouse IgG HRP, A4416, Sigma; разведение 1:2000) проводили 1 час при +37°C. Визуализацию иммунопреципитата осуществляли путем добавления ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин). Остановку реакции проводили, внося эквивалентное количество 2М H₂SO₄. Оценка иммуногенности проводили при OD₄₉₀ и референсной длине волны 650 нм на приборе Tecan2000. Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ MS Excel 2007.

Исследование ко-экспрессии генов vegf165 и fgf2 на экспериментальной модели животных, моделирующих фенотип бокового амиотрофического склероза

Эксперименты выполнены на половозрелых трансгенных мышях обоего пола, линии B6SJL-Tg(SOD1-G93A)dl1Gur/J (002726). Трансгенные мыши экспрессируют мутантный ген *sod1* (Gly93→Ala; глицин замещён на аланин в позиции 93) человека и демонстрируют прогрессирующую дегенерацию мотонейронов, как при БАС человека. У применяемых в работе трансгенных мышей развитие заболевания запаздывает по сравнению с оригинальными животными приблизительно на 2-3 месяца.

Выделение и генетическая модификация мононуклеарных клеток из пуповинной крови человека

Выделение ядродержащих клеток крови проводили согласно опубликованной ранее методике (Hawley et al., 2004). Клетки мононуклеарной фракции пуповинной крови человека после выделения культивировали на чашке (d=10 см) на среде RPMI-1640 (ПанЭко) с добавлением 10% FBS (HyClone) и смеси антибиотиков пенициллина и стрептомицина (100 ЕД/мл; 100 мкг/мл) (ПанЭко). Генетическую модификацию мононуклеарных клеток рекомбинантным аденовирусом Ad5-VEGF165-FuP2A-FGF2 осуществляли непосредственно после выделения. Клетки инфицировали диализованным аденовирусом с MOI 10. Клетки выдерживали в течение 12-16 часов во влажной среде при температуре +37°C с 5% содержанием CO₂.

Ксенотрансплантация генетически модифицированных мононуклеарных клеток трансгенным мышам, модулирующих фенотип бокового амиотрофического склероза

Все манипуляции с животными проводили в соответствии с правилами, рекомендованными Физиологической секцией Российского национального комитета по биологической этике, и приказом Минздрава РФ № 267 от 19.06.2003 "Об утверждении правил лабораторной практики". Проведение исследований было одобрено Республиканским комитетом по этическим вопросам при проведении клинических испытаний-исследований лекарственных средств при Министерстве здравоохранения Республики Татарстан (Протокол №3 от 04.04.2006 г.).

Животным (самки и самцы) в возрасте от 22 до 28 недель (начальный этап развития заболевания) в стерильных условиях ретроорбитально трансплантировали генетически модифицированные клетки мононуклеарной фракции пуповинной крови человека, 2×10⁶ клеток в 100 мкл физиологического раствора. Первой группе вводили мононуклеарную фракцию клеток пуповинной крови человека, модифицированных аденовирусом Ad5-VEGF165-FuP2A-FGF2; второй группе животных вводили физиологический раствор.

Иммунофлуоресцентный анализ экспрессии белков VEGF и FGF2 in vivo

Для обнаружения трансплантированных донорских клеток в тканях реципиента и с целью выяснения их фенотипа, серийные поперечные срезы спинного мозга подвергали иммунофлуоресцентному окрашиванию.

Через 4 недели после трансплантации генетически модифицированных мононуклеарных клеток осуществляли забор материала. Животных наркотизировали кетамин-ксилазином. Для гистологического анализа наркотизированных мышей транскардиально перфузировали раствором охлажденного ФСБ и 4% раствора параформальдегида (рН 7,4). Цельный спинной мозг удаляли и фиксировали раствором параформальдегида в течение 12-16 часов при 4°C. Иммерсию срезов проводили в растворе 30% сахарозы (рН 7,4) при температуре 4°C.

Для приготовления криостатных срезов поясничный отдел спинного мозга помещали в заливочную среду TBS (Triangle Biomedical Science, США) и замораживали с помощью элемента Пельтье в камере криостата Microm HM 560 (Thermo Scientific, США). Свободно плавающие поперечные срезы толщиной 20 мкм подвергали иммунофлуоресцентному окрашиванию. Неспецифическое связывание с эпитопами блокировали нормальной сывороткой ослика (Sigma) в течение 12 часов. Для идентификации антигенов срезы инкубировали с первичными антителами (разведение 1:100) к ядерному антигену человека HNA (mouse monoclonal, Millipore, США),

сосудистому эндотелиальному фактору роста VEGF (Santa Cruz) и основному фактору роста фибробластов FGF2 (Santa Cruz) в течение ночи при 4°C, промывали в фосфатно-солевом буфере, и затем инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с флуоресцентными красителями anti-mouse Alexa 647 (Invitrogen, США), anti-rabbit Alexa 488 (Invitrogen), anti-goat Alexa 555 (Invitrogen, США) в течение 2 ч при комнатной температуре. Для визуализации клеточных ядер срезы дополнительно окрашивали в течение 10 мин при комнатной температуре раствором 4',6-диамидино-2-фенилиндола (краситель DAPI, 10 мкг/мл в ФС буфере, Sigma, США). Окрашенные срезы заключали в среду, поддерживающую флуоресценцию, и изучали при помощи конфокального сканирующего микроскопа LSM 780 (Carl Zeiss, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Получение экспрессионных конструкций на основе плазмид и аденовирусов, ко-экспрессирующих гены VEGF165 и FGF2

Для создания мультицистронных аденовирусных конструкций первоначально проводили ПЦР-амплификацию кДНК генов *veg165* и *fgf2*. Для этой цели использовали геноспецифичные праймеры, фланкированные нуклеотидными последовательностями 2А-пептида. Также данные праймеры содержат нуклеотидные последовательности, кодирующие сайт гидролиза пептида фуриновой протеазой, а также сайт рестрикции эндонуклеазой *EcoRI*.

Продукты ПЦР-амплификации были вырезаны из геля и очищены на колонке EZ-10 Spin Column Purification Kit согласно инструкциям производителя, для дальнейшей асимметричной ПЦР, целью которой было объединение кДНК генов FGF2 и VEGF в одну кассету, соединенную через 2А-пептидную последовательность. Электрофореграмма представлена на рисунке 1.

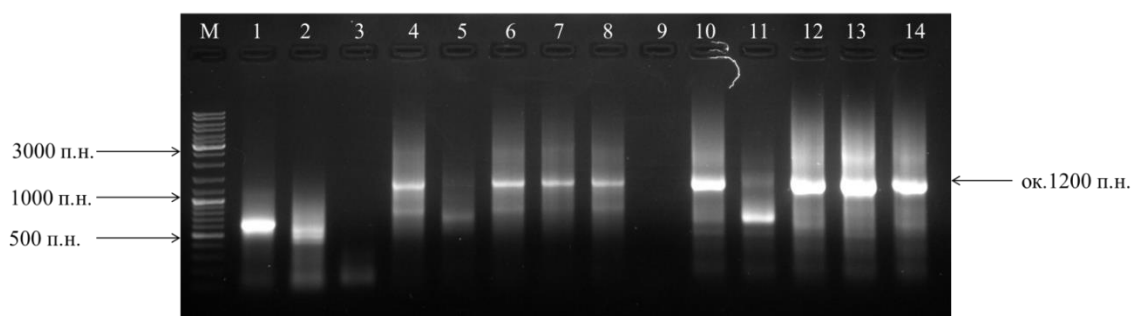


Рисунок 1 - Асимметричная ПЦР-амплификация VEGF165-FuP2A-FGF2. Электрофорез в 1,5% агарозном геле. М — маркер GeneRuler DNA ladder mix; 1 — плазмидная ДНК pBud-VEGF165-EGFP; 3 — плазмидная ДНК pBud-VEGF165-FGF2; 3 — отрицательный контроль, 4-14 — исследуемые образцы VEGF165-FuP2A-FGF2

В результате ПЦР были получены ампликоны с длиной нуклеотидной последовательности 1200 п.н., что соответствует ожидаемому размеру целевой конструкции VEGF165-FuP2A-FGF2. Продукты ПЦР-амплификации под номерами 12-14 были очищены из геля на колонке и использовались для дальнейшей ПЦР-амплификации с целью добавления *attB*-сайтов для дальнейшего клонирования в плазмидный вектор pDONR221 по технологии Gateway. Первоначально ПЦР-амплификацию проводили с помощью градиентной ПЦР для оптимизации

концентрации ионов Mg^{2+} , а также поиска оптимальной температуры гибридизации праймеров.

Наиболее оптимальными условиями ПЦР-амплификации являются температура отжига праймеров $52\text{ }^{\circ}\text{C}$ при 1 мМ содержании магния в реакционной смеси. Так, была получена кассета, содержащая кДНК генов *vegf165* и *fgf2*, соединенных 2А-пептидной последовательностью вируса ящура (Рисунок 2).

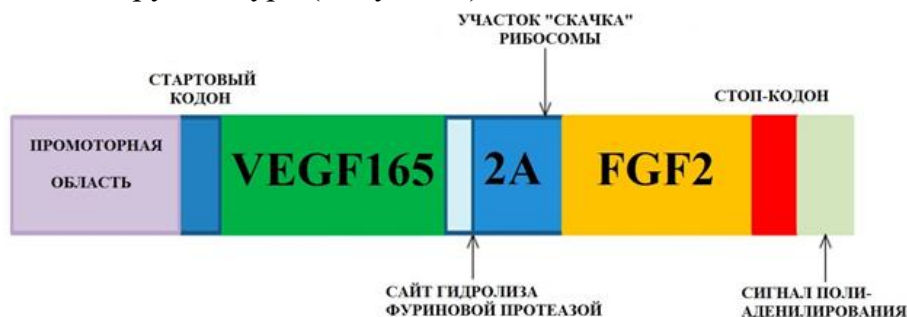


Рисунок 2 – Схематичное изображение генетической кассеты, содержащей терапевтические белки, соединенные 2А-пептидной последовательностью вируса ящура

После ПЦР-амплификации по вышеописанным условиям ПЦР-продукт был очищен на колонке и в дальнейшем использовался для рекомбинации в промежуточный вектор pDONR221. Рекомбинационной смесью трансформировали компетентные клетки *E.coli* Top10. Наличие вставки подтверждено методом ПЦР-скрининга колоний с использованием вектор-специфичных праймеров.

Был проведен анализ первичной нуклеотидной последовательности образца плазмидной ДНК. Секвенирование ДНК подтвердило наличие трансгенной вставки генов *vegf165* и *fgf2* и отсутствие мутаций. Образец плазмидной ДНК pDONR-VEGF165-FuP2A-FGF2 №15 в дальнейшем использовали для проведения реакции LR-рекомбинации в экспрессионный аденовирусный вектор pAd/CMV/V5-Dest. Селекцию клонов проводили по устойчивости к антибиотику ампициллину. На основании результатов ПЦР-анализа было отобрано несколько клонов, которые содержали трансгенную вставку размером 1200 п.н., что свидетельствует об эффективной рекомбинации в аденовирусный вектор.

В соответствии с целью исследования была поставлена задача: получить рекомбинантный аденовирус, кодирующий гены *vegf165* и *fgf2*, соединенные между собой 2А-пептидной последовательностью вируса ящура в одной открытой рамке считывания.

Для получения аденовируса необходимо плазмидную ДНК pAd-VEGF165-FuP2A-FGF2 перевести из кольцевой формы в линейную с помощью гидролиза эндонуклеазой *PacI*, который обеспечивает удаление бактериальных последовательностей (точки начала репликации pUC и гена резистентности к ампициллину), а также создает концевые терминальные повторы. Очищенной смесью трансфицировали эмбриональную линию клеток почки человека HEK293A, содержащую E1-промотор, который определяет раннюю транскрипцию вирусных генов и сборку аденовируса. Подсчет титра аденовируса по оптической плотности проводили по формуле:

Титр аденовируса = $OD_{260} \times \text{фактор разведения} \times 1,1 \times 10^{12}$ вирусных частиц в 1 мл. – это должно быть в материалах Титр аденовируса Ad5-VEGF165-FuP2A-FGF2 составил $3,2 \times 10^9$ БОЕ/мл при $1,6 \times 10^{12}$ вирусных частиц/мл.

Полученную в ходе асимметричной ПЦР-амплификации кассету VEGF165-P2A-FGF2, фланкированную сайтами рестрикции эндонуклеаз *KpnI* и *EcoRI*, в дальнейшем клонировали в экспрессионном плазмидном векторе pEGFP-N2 (Clontech) с помощью реакции рестрикции-лигации по «липким концам». Для этого ПЦР-продукт и плазмидную ДНК гидролизовали рестриктазами *KpnI* и *EcoRI* с дальнейшей очисткой и лигированием с использованием фермента Т4 ДНК-лигазы. Лигационной смесью трансформировали компетентные клетки *E.coli* TOP10. Селекцию проводили по устойчивости к канамицину. Из клонов, содержащих трансгенную, выделяли плазмидную ДНК с использованием коммерческого набора GeneJet Plasmid Miniprep Kit (Thermoscientific) согласно инструкции производителя. Электрофореграмма представлена на рисунке 3. Размер полученной плазмидной конструкции составил 5820 т.п.н. Наличие целевой вставки было также подтверждено секвенированием.

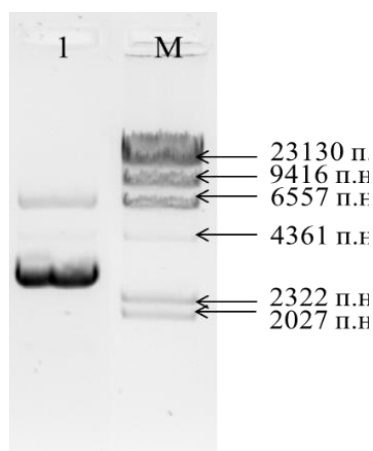


Рисунок 3 - Анализ выделения плазмидной ДНК в 0,8% агарозном геле. 1 – образец плазмидной ДНК pVEGF165-FuP2A-FGF2-P2A-EGFP, М – маркер λ HindIII DNA Marker (Fermentas)

Исследование ко-экспрессии, биосинтеза и ко-трансляционного расщепления рекомбинантных белков VEGF165 и FGF2 в первичных и иммортализованных культурах клеток человека

Для оценки эффективности ко-экспрессии генов *veg165* и *fgf2* *in vitro* в культуре клеток НЕК293Т, трансфицированных плазмидной ДНК pAd-VEGF165-FuP2A-FGF2, проводили иммунофлуоресцентный анализ через 48 часов после генетической модификации. Одновременный биосинтез белков сосудистого эндотелиального фактора роста VEGF и основного фактора роста фибробластов FGF2 подтвержден с помощью тройного окрашивания специфичными антителами (Рисунки 4-5).

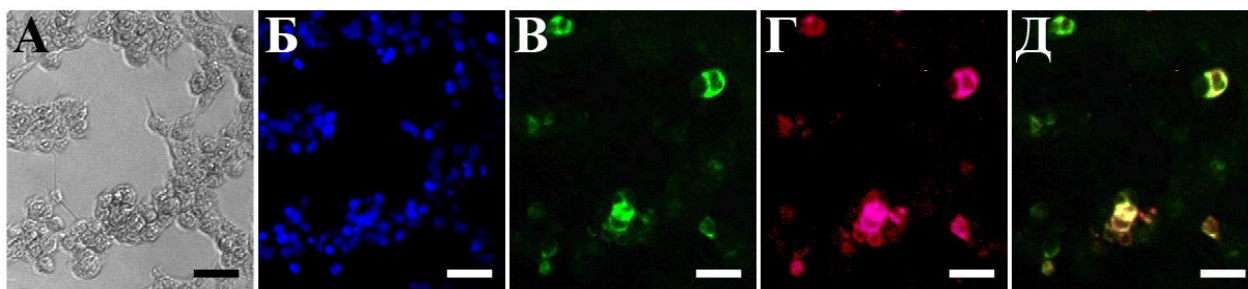


Рисунок 4 - Иммунофлуоресцентный анализ культуры клеток HEK293T, генетически модифицированных плазмидной ДНК pAd-VEGF165-FuP2A-FGF2. 48 часов после трансфекции. А — фазово-контрастная микроскопия, Б — окрашивание флуоресцентным красителем DAPI (синяя флуоресценция), В — окрашивание антителами к белку фактора роста эндотелия сосудов с использованием вторичных антител осли к иммуноглобулинам IgG козы, конъюгированные с красителем Alexa Fluor488, зеленая флуоресценция), Г — окрашивание к белку основного фактора роста фибробластов с использованием вторичных антител осли к иммуноглобулинам IgG мыши, конъюгированные с красителем Alexa Fluor 647, красная флуоресценция, Д — совмещение красного и зеленого спектров флуоресценции. Шкала 200 мкм

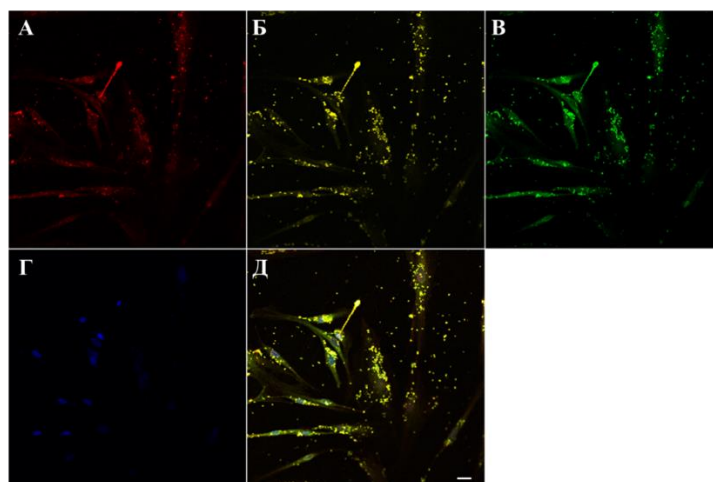


Рисунок 5 - Иммунофлуоресцентный анализ культуры клеток из жировой ткани человека, генетически модифицированных плазмидной ДНК pVEGF165-FuP2A-FGF2-P2A-EGFP. Конфокальная микроскопия, 48 часов после трансфекции. А — окрашивание антителами к белку основного фактора роста фибробластов с использованием вторичных антител осли к иммуноглобулину G мыши, конъюгированные с флуоресцентной меткой Alexa Fluor 647, красная флуоресценция, Б — окрашивание антителами к белку фактора роста эндотелия сосудов с использованием вторичных антител осли к иммуноглобулину G козы, конъюгированные с флуоресцентной меткой Alexa Fluor555, желтая флуоресценция, В — флуоресцентная микроскопия, зеленая флуоресценция, Г — окрашивание флуоресцентным красителем DAPI, Д — совмещение синего, красного и зеленого спектров флуоресценции. Увеличение 20X. Шкала 20 мкм.

Для оценки эффективности ко-трансляционного гидролиза 2A-пептидной последовательности фуриновой протеазой, а также корректного процессинга белков VEGF165 и FGF2 в культуре клеток HEK293T, проводили электрофоретическое разделение белков в 12% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях. Белки-мишени выявляли иммуноблоттингом с использованием специфичных антител к белкам VEGF165 и FGF2. Результаты представлены на рисунке 6.

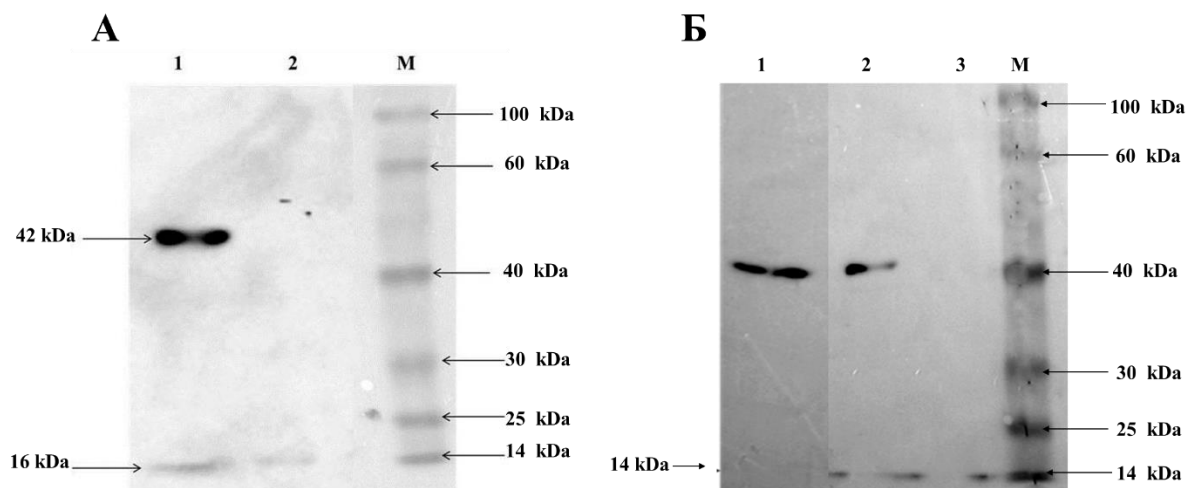


Рисунок 6 - Анализ экспрессии рекомбинантных белков VEGF165 и FGF2 в культуре клеток HEK293T. Электрофорез белков в денатурирующих условиях в 12% ПААГ с последующим иммуноблоттингом. **А:** Окрашивание к белку сосудистого эндотелиального фактора роста VEGF165 (16 кДа) и к бета-актину (42 кДа). 1—лизаты клеток HEK293T, трансфицированных плазмидой pAd- VEGF165-FuP2A-FGF2, 2— рекомбинантный белок VEGF165, М—маркер Smart Multi Color Pre-Stained Protein Standard. **Б:** Окрашивание к белку основного фактора роста фибробластов (14 кДа) и к бета-актину (42 кДа). 1— лизаты нетрансфицированных клеток HEK293T, 2—лизаты клеток HEK293T, 3—рекомбинантный белок основного фактора роста фибробластов (14 кДа), М—маркер Smart Multi Color Pre-Stained Protein Standard

Исходя из результатов иммуноблоттинга можно заключить, что в генетически модифицированных клетках осуществляется одновременный биосинтез белков сосудистого эндотелиального фактора роста и основного фактора роста фибробластов. Более того, соответствие молекулярной массы белков мишеней аналогичному рекомбинантному свидетельствует об эффективном процессинге 2А-пептидной последовательности рибосомой и отщеплении 2А-пептида в результате гидролиза фуриновой протеазой.

Несмотря на большое количество работ по применению 2А пептидных последовательностей для экспрессии иммуноглобулинов (Camper et al. // J Immunol Methods. 2011. Vol.372, №1-2), репортерных белков (Appleby et al. // J Immunol Methods. 2013. Vol.397, №12; Minskaia et al. // BMC Biotechnol. 2013. Vol.13) и факторов транскрипции (Woltjen et al. // Nature. 2009. Vol.458, №7239), в литературе отсутствуют данные по их применению для экспрессии комбинаций других типов терапевтических белков, например, факторов роста.

Впервые нами были получены генетические конструкции, кодирующие гены сосудистого эндотелиального фактора роста и основного фактора роста фибробластов (VEGF и FGF2), соединенные между собой 2А-пептидной последовательностью и содержащие сайт гидролиза фуриновой протеазой. Сверхэкспрессия соответствующих терапевтических белков VEGF и FGF2 наблюдалась как в иммортализованной культуре клеток HEK293T, (в 70000 раз для VEGF и 53000 для FGF2), так и в первичных клеточных линиях— мононуклеарных клетках крови пуповины (в 1450 раз для VEGF и в 1666 раз для FGF2) и стволовых клетках из жировой ткани человека (в 2500 и 1100 раз соответственно), трансдуцированных рекомбинантным аденовирусом Ad5-VEGF165-FuP2A-FGF2. Похожие результаты были продемонстрированы He с

коллегами (He et al. // *Thromb Res.*2011.Vol.128, №6), где использование 2А-пептидных последовательностей вируса ящура обеспечивает эквимольную коэкспрессию генов тяжелой и легкой цепи с дальнейшим формированием в процессе самосборки полноразмерной молекулы фактора коагуляции VIII. Созданная нами конструкция на основе репликационно-дефектного аденовируса, содержащая сайт гидролиза фуриновой протеазой, также обеспечила эквимольную сверхэкспрессию обоих терапевтических белков в первичных и иммортализованных клеточных культурах.

Исследование иммуногенных свойств рекомбинантных белков в составе мультицистронных плазмидных и аденовирусных конструкций

Для исследования иммуногенных свойств белков в составе мультицистронной аденовирусной конструкции *in vivo* была проведена внутримышечная иммунизация лабораторных мышей диализованным аденовирусом в количестве, а также препаратом плазмидной ДНК. Контрольной группе мышей вводили конъюгат 2А-пептида с адьювантом Фрейнда в количестве 25 мкг на животное. Иммунореактивность в сыворотке крови животных к таким антигенам как 2А-пептид, VEGF165 и аденовирусные белки оценивали методом прямого иммуноферментного анализа с последующей обработкой данных в MS Excel 2007. Результаты теста Стьюдента для парной выборки выявили статистически значимые различия в контрольной и опытной группах. Ярко выраженный иммунный ответ у мышей на аденовирусные белки — предсказуемый результат. Более того, стабильный иммунный ответ наблюдается и при повторном введении аденовирусного препарата (Рисунок 7). В группе мышей при введении аденовирусных частиц не был зарегистрирован ярко выраженный иммунный ответ к белкам 2А-пептида пикорновируса, в то время как в контрольной группе (введение конъюгата пептида с адьювантом Фрейнда) наблюдается существенное повышение показателей оптической плотности на 42 сутки после первой иммунизации.

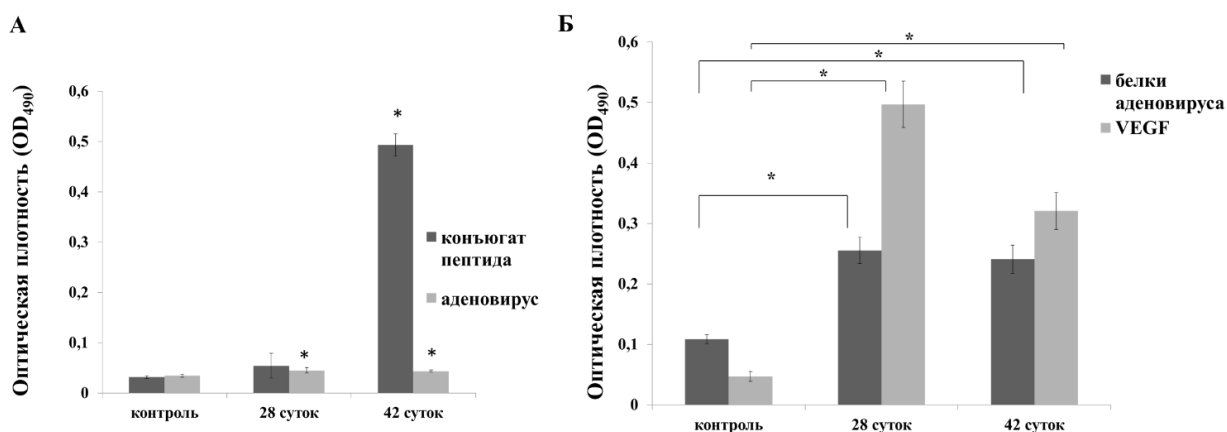


Рисунок 7 – А: Анализ иммунореактивности к 2А-пептиду пикорновирусов в сыворотке крови мышей. Иммуноферментный анализ к антигену 2А-пептида (CGDVEENPG). Данные представлены как среднее значение оптической плотности в группе \pm С.К.О., $p < 0,01$. Б: Анализ иммунореактивности к антигену фактора роста сосудистого эндотелия и белкам аденовируса в сыворотке крови мышей. Иммуноферментный анализ. Данные представлены как среднее значение оптической плотности в группе \pm С.К.О., $p < 0,05$. “*” отмечены статистически значимые данные

Нами было показано, что при внутримышечном введении аденовируса лабораторным животным не было зарегистрировано ярко выраженного иммунного ответа на 2А-пептидный антиген. В группе подопытных мышей наиболее интенсивная

продукция VEGF в сыворотке отмечалась через 28 дней после внутримышечного введения диализата аденовируса Ad5-VEGF165-FuP2A-FGF2. На 42 сутки после первого введения, т.е. на 14 сутки после повторного введения концентрация антител к белку фактора роста эндотелия сосудов снижалась (Рисунок 7).

Результаты, полученные в ходе ИФА, свидетельствуют об эффективной экспрессии трансгенов *in vivo* с выработкой антител к чужеродным белкам аденовирусов и VEGF человека. В то же время наблюдалось отсутствие иммунного ответа на 2А-пептидную последовательность пикорновирусов в контексте мультицистронного аденовирусного препарата, ко-экспрессирующего гены терапевтических белков.

При введении препарата плазмидной ДНК наблюдалась схожая динамика иммунного ответа на 2А-пептидный антиген. Значительных колебаний оптической плотности при оценке иммуногенных свойств белка фактора роста сосудистого эндотелия не наблюдалось в обоих случаях. Также нельзя говорить о статистически значимом иммунном ответе на антиген основного фактора роста фибробластов как при введении «голой» плазмидной ДНК, так и в комплексе с катионным раствором.

Ксенотрансплантация генетически модифицированных мононуклеарных клеток из пуповинной крови человека трансгенным мышам с моделью бокового амиотрофического склероза

Детекцию МККП в спинном мозге проводили методом иммуногистохимического анализа с использованием специфичных антител. Результаты иммуногистохимического анализа спинного мозга мышей с фенотипом БАС через 30 суток после трансплантации генетически модифицированных МККП представлены на рисунке 8.

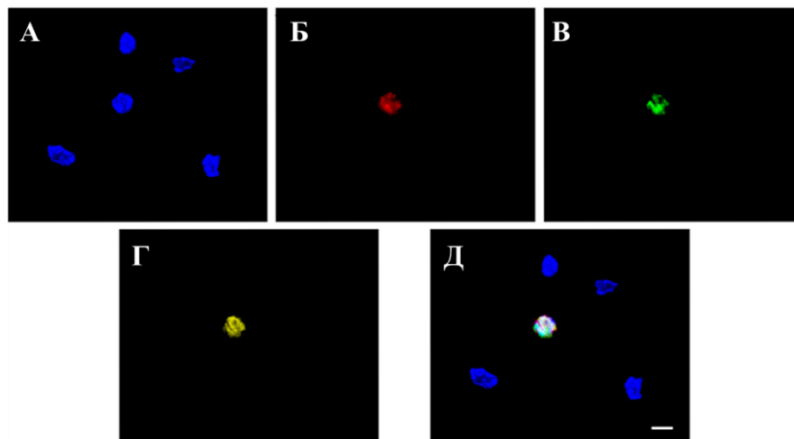


Рисунок 8 -Иммуногистохимический анализ поперечного среза спинного мозга (поясничный отдел) трансгенных мышей с фенотипом БАС через 28 суток после трансплантации МККП, модифицированных аденовирусом Ad5-VEGF165-FuP2A-FGF2. А—окрашивание флуоресцентным красителем DAPI; Б—окрашивание к белку ядерного антигена человека с использованием вторичных антител осли к иммуноглобулинам G мыши с меткой Alexa Fluor 647; В—окрашивание к белку сосудистого эндотелиального фактора роста с использованием вторичных антител осли к иммуноглобулинам G козла с меткой Alexa Fluor 488; Г—окрашивание к белку основного фактора роста фибробластов с использованием вторичных антител осли к иммуноглобулинам G кролика с меткой Alexa Fluor 555; Д—совмещение А-Г. Увеличение X63. Шкала 5 мкм

Таким образом, из результатов иммунофлуоресцентного окрашивания срезов спинного мозга следует, что МККП, трансдуцированные рекомбинантным аденовирусом, мигрируют в очаги дегенерации, и через 28 суток после трансплантации трансгенным мышам B6SJL-Tg(SOD1-G93A)dl1Gur/J с фенотипом бокового амиотрофического склероза синтезируют белки, выполняющие терапевтические функции. Для исследования дифференцировочного потенциала трансплантированных стволовых клеток в нейрональном направлении был проведен иммуногистохимический анализ образцов спинного мозга мышей. Срезы окрашивали антителами к белкам Oct6 и Aqp4, которые являются маркерами астроцитов. Результаты представлены на рисунках 9 и 10.

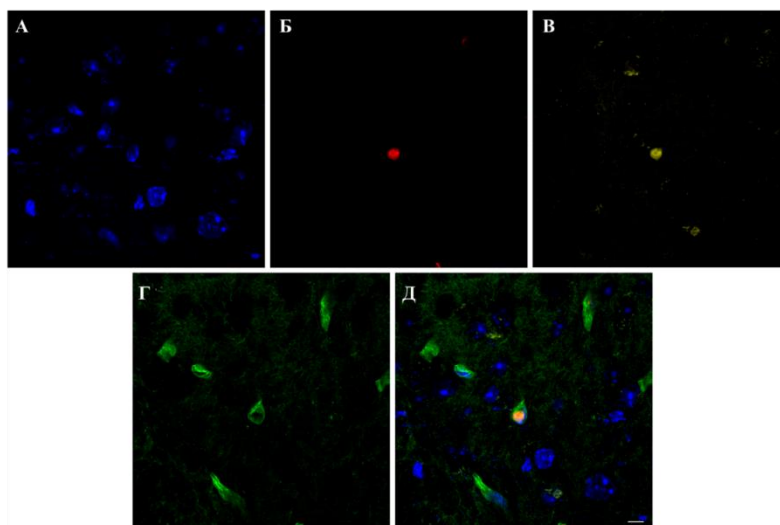


Рисунок 9 -Иммуногистохимический анализ поперечного среза спинного мозга (поясничный отдел) трансгенных мышей с фенотипом БАС. 28 суток после трансплантации МККП, модифицированных аденовирусом Ad5-VEGF165-FuP2A-FGF2. А—окрашивание флуоресцентным красителем DAPI; Б—окрашивание к белку ядерного антигена человека с использованием вторичных антител осла к иммуноглобулинам G мыши с меткой Alexa Fluor 647; В—окрашивание к белку Oct6 с использованием вторичных антител осла к иммуноглобулинам G кролика с меткой Alexa Fluor 555; Г—окрашивание к белку Aqp4 с использованием вторичных антител осла к иммуноглобулинам G козла с меткой Alexa Fluor 488; Д—совмещение А-Г. Увеличение X63. Шкала 20 мкм

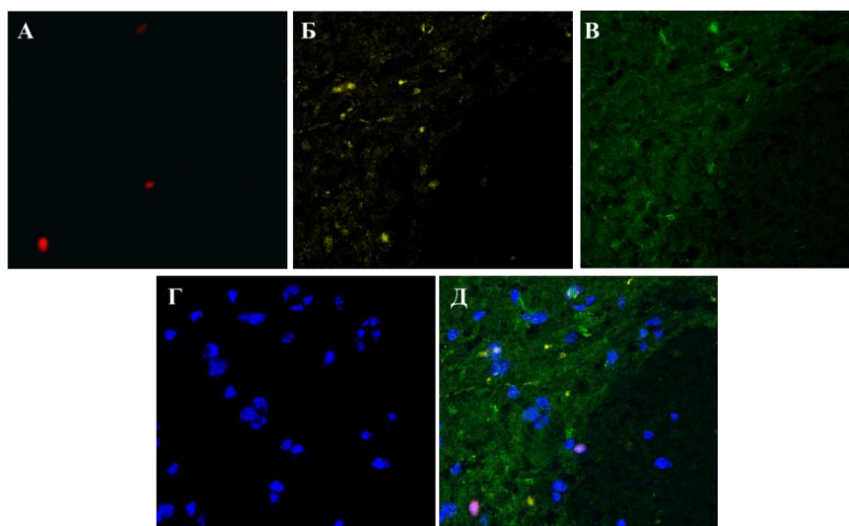


Рисунок 10 -Иммуногистохимический анализ поперечного среза спинного мозга (поясничный отдел) трансгенных мышей с фенотипом БАС. 28 суток после трансплантации МККП, модифицированных аденовирусом Ad5-VEGF165-FuP2A-FGF2. А— окрашивание к белку ядерного антигена человека с использованием вторичных антител осли к иммуноглобулинам G мыши с меткой Alexa Fluor 647; Б—окрашивание к белку Oct6 с использованием вторичных антител осли к иммуноглобулинам G кролика с меткой Alexa Fluor 555; В—окрашивание к белку VEGF с использованием вторичных антител осли к иммуноглобулинам G козла с меткой Alexa Fluor 488; Г— окрашивание флуоресцентным красителем DAPI; Д—совмещение А-Г. Увеличение X63. Шкала 5 мкм

В трансплантированных клетках мононуклеарной фракции пуповинной крови спустя 28 суток после введения трансгенным мышам с фенотипом БАС осуществляется биосинтез не только терапевтических белков с аденовирусного вектора, но также специфических белков, характерных для астроцитов. Это позволяет предположить, что МККП, генетически модифицированные рекомбинантным аденовирусом, способны дифференцироваться в нейроглиальном направлении и тем самым поддерживать естественную популяцию клеток глии в спинном мозге.

В литературе имеются данные, что при боковом амиотрофическом склерозе гибель мотонейронов тесно связана с активностью астроцитов (Di Giorgio et al. // *Nat Neurosci.* 2007. Vol.10, №5). Астроциты способствуют поддержанию гомеостаза через периваскулярные синаптические нервные окончания, охватывающие стенки кровеносных сосудов. Более того, отростки астроцитов, плотно прилегают к нейронам, обеспечивая стабильное микроокружение. Астроциты экспрессируют ряд белков, заякоренных на мембране синапса—аквапорин 4 и маркер калиевых каналов Kir4.1 (Nielsen et al. // *J Neurosci.* 1997. Vol.17, №1). У мышей, экспрессирующих мутантную форму супероксид дисмутазы1, нарушение функционирования клеток микроглии и астроцитов способствует прогрессированию БАС (Boillee et al. // *Science.* 2006 Vol.312, №5778; Clement et al. // *Science.* 2003. Vol.302, №5642). Недавние исследования также показали, что астроциты, несущие мутантный ген *sod1*, секретируют ряд токсических факторов, в том числе NOX2, активирующего образование свободных радикалов, которые, в свою очередь, индуцируют дегенерацию мотонейронов, полученных из эмбриональных стволовых клеток (Marchetto et al. // *Cell Stem Cell.* 2008. Vol.3, №6; Nagai et al. // *Nat Neurosci.* 2007. Vol.10, №5). Таким образом, разработка альтернативного подхода для восстановления астроцитарно-глиальной функции представляет терапевтическую значимость.

Наиболее перспективным направлением лечения БАС стала генно-клеточная терапия с использованием стволовых клеток пуповинной крови, которые обеспечивают трофическую поддержку и обладают иммуномодуляторным эффектом при терапии ряда нейродегенеративных заболеваний—паралича, травмы спинного мозга (Arien-Zakay et al. // *Best Pract Res Clin Haematol*. 2010. Vol. 23, №2; Greggio et al. // *Life Sci*. 2014. Vol. 96, №1-2; Veeravalli et al. // *Stem Cells Dev*. 2011. Vol. 20, №5; Wishnew et al. // *Pediatrics*. 2014. Vol.134, №5). Ранее нами было показано применение комбинации рекомбинантных аденовирусов, кодирующих терапевтические белки VEGF165 и GDNF, а также молекулу клеточной адгезии NCAM1, в контексте генно-клеточной терапии бокового амиотрофического склероза. Трансплантированные клетки генетически модифицированные МККП имели способность дифференцироваться в микроглия-подобные клетки и были позитивные по маркеру Iba1+, а также использовали свой эндогенный потенциал для дифференцировки в эндотелиальные клетки (CD34+) (Islamov et al. // *Curr Gene Ther*. 2015. Vol.15, №3).

Известно, что фактор транскрипции Oct6 необходим для перехода с немиелинизирующей фазы в фазу миелинизации при развитии шванновских клеток. (Arroyo et al. // *J Neurosci*. 1998. Vol.18, №19). В норме белок Oct6 локализуется в цитоплазме и не играет значимую роль в функционировании клеток. Однако, на ранней стадии дегенерации аксонов, Oct6 активно синтезируется в кластерах шванновских клеток с нарушенной иннервацией, и иногда в ядрах. В случае активной нейрорегенерации наблюдается интенсивная транскрипция мРНК Oct6 в ядрах шванновских клеток. Таким образом, в случае острой дегенерации аксонов демиелинизация в шванновских клетках способствует увеличению продукции Oct6. В период нейрорегенерации Oct6 транслоцируется в ядро, это активирует транскрипцию некоторых генов, ответственных за процесс миелинизации (Kawasaki et al. // *Acta Neuropathol*. 2003. Vol.105, №3). Мы наблюдали ядерную локализацию белка Oct6 в трансплантированных МККП, что свидетельствует о возможном участии МККП в процессе миелинизации. Синтез аквапорина 4 в трансплантированных МККП свидетельствует о дифференцировке генетически модифицированных стволовых клеток в астроцитарном направлении. В литературе имеются данные, подтверждающие реактивность астроцитов при различных травмах и повреждениях. Также показано, что астроциты, позитивные по маркеру Aqp4, тесно ассоциированы со шванновскими клетками. Santos-Silva с коллегами было показано, что белки семейства основных факторов роста фибробластов участвуют в образовании связей между астроцитами, шванновскими клетками (Santos-Silva et al. // *J Neurosci*. 2007. Vol. 27, №27).

Таким образом, при трансплантации МККП, модифицированных рекомбинантным аденовирусом, обеспечивающим одновременный биосинтез белков VEGF и FGF2, наблюдается дифференцировка трансплантированных МККП в астроглиальном направлении. Полученные в ходе работы результаты о применении рекомбинантного репликационно дефектного аденовируса в контексте генно-клеточной терапии бокового амиотрофического склероза свидетельствуют о перспективности применения мультицистронной конструкции для повышения выживаемости мотонейронов спинного мозга.

ВЫВОДЫ

1. С использованием 2А-пептидных последовательностей пикорновирусов созданы мультицистронные генетические конструкции на основе плазмидного векторы рEGFP-N2 и репликационно дефектного аденовируса, обеспечивающие

одновременную экспрессию сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF165), основного фактора роста фибробластов (FGF2).

2. Показана сверхэкспрессия мРНК генов *vegf165* и *fgf2* в различных культурах клеток: в культуре клеток эмбриональной линии почки человека HEK293T, а также в первичных клеточных типах – стволовых клетках из жировой ткани человека и мононуклеарных клетках крови пуповины при генетической модификации рекомбинантными нуклеиновыми кислотами, содержащие 2А-пептидные последовательности вируса ящура. Использование фуриновой протеазы в дизайне мультицистронных векторов обеспечивает эффективный биосинтез и пост-трансляционный гидролиз полипептидов VEGF165 и FGF2.

3. Использование фуриновой протеазы в контексте мультицистронной аденовирусной конструкции обеспечивает эффективное удаление 2А-пептидных последовательностей, что проявляется отсутствием иммунного ответа на антиген белков пикорновирусов с одновременной продукцией антител к белкам аденовируса и сосудистого эндотелиального фактора роста.

4. Генетически модифицированные мононуклеарные клетки пуповинной крови человека, экспрессирующие рекомбинантные гены *vegf* и *fgf2*, после трансплантации трансгенным мышам с моделью бокового амиотрофического склероза выживают через 28 суток после трансплантации, мигрируют в область поясничного утолщения в спинном мозге и экспрессируют маркеры, характерные для астроцитов и шванновских клеток—Ost6+ и Aqr4+.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах, включенных в список ВАК:

1. **Черенкова, Е.Е.** Создание рекомбинантных аденовирусов и лентивирусов, экспрессирующих ангиогенные и нейропротекторные факторы, с помощью технологии клонирования Gateway / **Е.Е. Черенкова, В.Ю. Федотова, М.А. Борисов, Р.Р. Исламов, А.А. Ризванов** // Гены и клетки. – 2012. – Т.7, №3. – С.164-168

2. Mukhamedyarov, M.A. Analysis of the efficiency of gene-cell therapy in transgenic mice with amyotrophic lateral sclerosis phenotype / M.A. Mukhamedyarov, A.A. Rizvanov, V.Yu. Fedotova, I.I. Salafutdinov, **Е.Е. Cherenkova** [et al.] // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2013. – Vol.154, №4. – P. 558-561.

3. **Garanina, Е.Е.** Construction of recombinant adenovirus containing picornaviral 2A-peptide sequence for the co-expression of neuro-protective growth factors in human umbilical cord blood cells / **Е.Е. Garanina, Y.O. Mukhamedshina, I.I. Salafutdinov, A.P. Kiyasov, H.J. Reis**, [et al.] // Spinal Cord. – 2016. – Vol. 54, №6. – P. 423-430.

Другие публикации:

1. **Черенкова, Е.Е.** Мультицистронные вектора для генно-клеточной терапии нейродегенеративных заболеваний человека / **Е.Е. Черенкова, В.Ю. Федотова** // Сборник тезисов 85-й Всероссийской студенческой научной конференции памяти академика АН РТ проф. Д.М. Зубаирова – 2011. – С.238

2. **Черенкова, Е.Е.** Конструирование мультицистронных векторов для генно-клеточной терапии нейродегенеративных заболеваний человека / **Е.Е. Черенкова, А.А. Ризванов** // Сборник тезисов 15-й Международной Пущинской школы – конференции молодых ученых. – 2011. – С.183

3. Усманов, Р.Х. Получение рекомбинантных аденовирусов, кодирующие факторы роста сосудистого эндотелия и глиальные нейротрофические факторы, используемых в генно-клеточной терапии / Р.Х. Усманов, **Е.Е. Черенкова** // Сборник тезисов 16-й Международной Пущинской школы – конференции молодых ученых. – 2012. – С. 155
4. Черенкова, Е.Е. Создание экспрессионных векторов, кодирующих белки, молекулы клеточной адгезии, проангиогенные, нейротрофические и нейропротекторные факторы для генной и генно-клеточной терапии / **Е.Е. Черенкова**, В.Ю. Федотова, Р.Р. Исламов, А.А. Ризванов // V Ежегодный симпозиум «Актуальные вопросы генных и клеточных технологий»: Тезисы докладов. – 2012. – Т.7, №2. – С. 51
5. Черенкова, Е.Е. Мультицистронные векторы для генной терапии // **Е.Е. Черенкова**, И.И. Салафутдинов, А.А. Ризванов // Міжнародна наукова конференція студентів і молодих вчених «Сучасні теоретичні та практичні аспекти клінічної медицини 19-20 квітня 2012 року»: Тези доповідей. – 2012. – С. 54
6. Соловьева, В.В. Генетическая модификация мононуклеарных клеток пуповинной крови человека *ex vivo* рекомбинантными аденовирусами / В.В. Соловьева, В.Ю. Федотова, **Е.Е. Черенкова**, И.И. Салафутдинов, А.А. Ризванов // XVII Всероссийская научно-практическая конференция «Молодые ученые в медицине»: Материалы конференции. – 2012. – С. 113
7. Черенкова, Е.Е. Создание аденовирусных векторов для генной и генно-клеточной терапии, кодирующих проангиогенные, нейротрофические и нейропротекторные факторы / Е.Е. Черенкова, Р.Х. Усманов, Р.Р. Исламов, А.А. Ризванов // III международная научно-практическая конференция «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине»: Тезисы докладов. – 2013. - спецвыпуск №.1. – С. 100
8. Сафиуллов, З.З. Иммунофлуоресцентный анализ экспрессии рекомбинантного гена сосудистого эндотелиального фактора роста VEGF в генетически модифицированных клетках пуповинной крови человека, после трансплантации трансгенным SOD1 - G93A – мышам / З.З. Сафиуллов, А.А.Измайлов, Я.О. Мухамедшина, В.В. Соловьева, И.И. Салафутдинов, Е.Е. Черенкова, [и др.] // III международная научно-практическая конференция «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине»: Тезисы докладов – 2013. – спецвыпуск №.1. - С. 96
9. Усманов Р.Х. Оценка терапевтического эффекта генетически модифицированных мононуклеарных клеток пуповинной крови человека при трансплантации трансгенным мышам с фенотипом бокового амиотрофического склероза / Р.Х. Усманов, Е.Е. Черенкова, А.А. Ризванов // I научно-практическая конференция студентов и молодых ученых Института фундаментальной медицины и биологии <<Современные проблемы фундаментальной медицины и биологии>>: Сборник тезисов. – 2013. – С. 116-117
10. Соловьева, В.В. Генетическая модификация стволовых клеток из жировой ткани человека плазмидой pEGFP-N2 не влияет на секрецию цитокинов/хемокинов // В.В. Соловьева, И.И. Салафутдинов, Е.Е. Черенкова, С.Ф. Хайбуллина, А.А. Ризванов // VI Ежегодный Международный симпозиум «Актуальные вопросы генных и клеточных технологий»: тезисы докладов. – 2013. – Т.8, №3. – С. 53-54
11. Черенкова, Е.Е. Исследование иммуногенных свойств плазмидного вектора, коэкспрессирующего рекомбинантные белки с помощью 2А-пептидных последовательностей вируса ящура // Е.Е. Черенкова, И.И. Салафутдинов, А.А.

Ризванов // VI Ежегодный Международный симпозиум «Актуальные вопросы генных и клеточных технологий»: тезисы докладов. – 2013. – Т.8, №3. – С. 57-58

12. Cherenkova E.E. Multicistronic vectors based on self-cleaving 2A-peptide sequence of FMDV for adenoviral expression of neuroprotective growth factors / E.E. Cherenkova, I. I. Salafutdinov, R.R. Islamov, A.A. Rizvanov // STRANN, Saint Petersburg, Russia. – 2012. – P.12

13. Черенкова, Е.Е. Исследование иммуногенности 2А-пептидного препарата, коэкспрессирующего ангиогенные и нейротрофические факторы с помощью 2А-пептидных последовательностей вируса ящура / Е.Е. Черенкова, И.И. Салафутдинов, Р.Р. Исламов, А.А. Ризванов // Материалы международной научно-практической конференции "Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины" - 2013. - С.193-194

14. Черенкова, Е.Е. Получение рекомбинантного аденовируса, коэкспрессирующего про-ангиогенные факторы / Е.Е. Черенкова, А.А. Ризванов // Сборник научных трудов Sworld. – 2013. – Т. 43, № 3. – С. 87-89

15. Черенкова, Е.Е. Конструирование экспрессионных векторов, кодирующих про-ангиогенные, нейротрофические и нейротрофические факторы для генной и генноклеточной терапии / Е.Е. Черенкова, Р.Р. Исламов, А.А. Ризванов // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2013. - №11-2. – С. 57-58

16. Гаранина, Е.Е. Эффективность генно-клеточной терапии бокового амиотрофического склероза с использованием рекомбинантных аденовирусов Ad5-VEGF165 и Ad5-NCAM1 / Е.Е. Гаранина, В.Ю. Федотова, З.З. Сафиуллов, Р.Р. Исламов, А.А. Ризванов // Актуальные вопросы образования и науки: Сборник научных трудов по материалам Международной научно-практической конференции 30 сентября 2014 г., Часть 8. – 2014. – С.51

17. Салафутдинов И.И. Модуляция секрета стволовых клеток человека, трансдуцированных рекомбинантными аденовирусами / И.И. Салафутдинов, В.В. Соловьева, Е.Е. Черенкова, Е.В. Мартынова, С.Ф. Хайбуллина, А.А. Ризванов // Сборник трудов 4й международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и практической медицине» 29 октября-1 ноября 2014 г. – 2014. – С. 141

18. Черенкова Е.Е. Изучение экспрессии рекомбинантных генов *vegfl65* и *ncam1* в моноклеональных клетках пуповины человека *in vitro* и после трансплантации трансгенным мышам с моделью бокового амиотрофического склероза / Е.Е. Черенкова, Я.О. Мухамедшина, З.З. Сафиуллов, Р.Р. Исламов, А.А. Ризванов // Сборник трудов 4й международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и практической медицине» 29 октября-1 ноября 2014 г. – 2014. – С. 152.

19. Черенкова, Е.Е. Создание рекомбинантного аденовируса, одновременно кодирующего кодон-оптимизированные последовательности фактора роста гепатоцитов и фактора роста фибробластов / Е.Е. Черенкова, Э.И. Шарипова, А.А. Ризванов, А.П. Киясов // Сборник трудов 4й международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и практической медицине» 29 октября-1 ноября 2014 г. – 2014. – С. 153

20. Гаранина, Е.Е. Исследование иммуногенности 2А-пептидных препаратов в контексте мультицистронной аденовирусной конструкции *in vivo* / Е.Е. Гаранина, А.А. Ризванов // Биология – наука XXI века: 19-я Международная Пушкинская школа-

конференция молодых ученых (Пушино, 20–24 апреля 2015 г.). Сборник тезисов. – Пушино. – 2015. – С.130–131

21. Ivanova V.V. Differential Immuno-Reactivity to Genomic DNA, RNA and Mitochondrial DNA is Associated with Auto-Immunity / V.V. Ivanova, S.F. Khaiboullina, **E.E. Cherenkova**, E.V. Martynova, [et al.] // Cellular Physiology and Biochemistry. – 2014. – Vol. 34. – P. 2200-2208

22. Mukhamedshina, Y.O. Assessment of Glial Scar, Tissue Sparing, Behavioral Recovery and Axonal Regeneration following Acute Transplantation of Genetically Modified Human Umbilical Cord Blood Cells in a Rat Model of Spinal Cord Contusion / Y.O. Mukhamedshina, **E.E. Garanina**, G.A. Masgutova, [et al.] // PLoS One. – 2016. – Vol. 11(3):e0151745.

23. Islamov, R.R. Symptomatic Improvement, Increased Life-Span and Sustained Cell Homing in Amyotrophic Lateral Sclerosis After Transplantation of Human Umbilical Cord Blood Cells Genetically Modified with Adeno-Viral Vectors Expressing a Neuro-Protective Factor and a Neural Cell Adhesion Molecule / R.R. Islamov, A.A. Rizvanov, M.A. Mukhamedyarov, I.I. Salafutdinov, **E.E. Garanina**, [et al.] // Current Gene Therapy. – 2015. – Vol.15, №2. – P. 266-276

24. Mukhamedshina, Y.O. Adenoviral vector carrying glial cell-derived neurotrophic factor for direct gene therapy in comparison with human umbilical cord blood cell-mediated therapy of spinal cord injury in rat /Y.O. Mukhamedshina, G.F. Shaymardanova, **E.E. Garanina**, [et al.] // Spinal Cord. – 2016. – Vol. 54(5):347-59

Е-mail автора: kathryn.cherenkova@gmail.com

Отзывы на автореферат просим высылать по адресу: 420008, Казань, ул. Кремлевская, 18, главное здание Казанского федерального университета, отдел аттестации научно-педагогических кадров, Ученому секретарю Диссертационного совета Д 212.081.08 Абрамовой Зинаиде Ивановне, факс: (843) 238-76-01. Е-mail: ziabramova@mail.ru.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Ad5—аденовирус серотипа 5	VEGF—фактор роста эндотелия сосудов
Aqp4—аквапорин 4	БАС—боковой амиотрофический склероз
CD—маркер кластерной дифференцировки	ИФА—иммуноферментный анализ
EGFP—улучшенный зеленый флуоресцентный белок	кДа—килодальтон
FGF2—основной фактор роста фибробластов	кДНК—комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота
Fu—фурин	М—моль
НЕК293Т—культура клеток эмбриональной линии почки человека, содержащей Т-антиген вируса SV40	МККП—моноклеарные клетки крови пуповины
KLH—гемоцианин фисуреллы	мкг—микрограмм
NCAM1—нейрональная молекула клеточной адгезии 1	мкл—микролитр
Ost6—октамер-связывающий белок 6	ПААГ—полиакриламидный гель
SOD1—супероксид дисмутаза 1	ПЦР—полимеразная цепная реакция