

Эффективность доставки генов бакуловirusами в клетки млекопитающих *in vitro*

И. Н. Вагина, О. В. Аноприенко, Е. А. Захарук, В. Ф. Горчев¹,

Л. И. Строковская, А. П. Соломко

Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины
Ул. Академика Заболотного, 150, Киев, Украина, 03680

¹Институт биохимии им. А. В. Палладина НАН Украины
Ул. Леонтовича, 9, Киев, Украина, 01601

solomko@imbg.org.ua

Рекомбинантный бакуловirusный вектор, содержащий репортерный ген EGFP под регуляцией сильной промоторной кассеты СAG, использовали для трансдукции нормальной (HEK293) и опухолевой (HeLa) клеточных линий человека. Показана зависимость эффективности трансдукции от дозы вируса, времени инкубации с вирусом, температуры и типа клеток. Экспрессия репортерного гена носила временный характер и, постепенно уменьшаясь, детектировалась в единичных клетках на 15-е сут после трансдукции.

Ключевые слова: рекомбинантный бакуловirus, AcMNPV, трансдукция, временная экспрессия, генная терапия.

Введение. Способность бакуловirusов эффективно проникать в различные клетки и ткани млекопитающих *in vivo* и *in vitro* выявлена сравнительно недавно [1–3] и послужила основанием для исследования возможности их использования в качестве векторов для клеточной инженерии и генной терапии [4, 5]. По сравнению с другими вирусными векторными системами бакуловirusы обладают рядом преимуществ, включающих неспособность вирусом реплицироваться в клетках млекопитающих [6], широкий спектр трансдуцируемых типов клеток и тканей при отсутствии выраженной цитотоксичности [4], способность (благодаря структуре генома и вирусных частиц) включать большие (до 30 тыс. п. н.) фрагменты гетерологичной ДНК и т. д. [7]. Для доставки генов в клетки млекопитаю-

щих использованы векторы на основе вирусом ядерного полиэдроза *AcMNPV* и *BmNPV* [4, 7]. Экспрессию генов в клетках млекопитающих в составе бакуловirusов выявляли при встраивании генов под контроль цитомегаловirusного (CMV) IE-промотора и промотора из вирусом саркомы Рауса (RSV) [1, 8].

Данная работа посвящена определению оптимальных условий эффективной трансдукции бакуловirusами нормальной и опухолевой клеточных линий млекопитающих для обеспечения высокого уровня экспрессии экзогенных генов в составе рекомбинантных бакуловirusных векторов. В нашей работе экспрессию репортерного гена *EGFP* в клетках млекопитающих регулировали экспрессионной кассетой СAG, которая в некоторых типах клеток проявляла себя более сильным регулятором, чем промоторы CMV и RSV [2].

Материалы и методы. *Клеточные культуры и вирусы.* Монослойную культуру клеток насекомых Sf21 выращивали в среде TC-100 («Sigma», США) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (FBS) («Sigma») при температуре 28 °C. Клетки инфицировали бакуловirusами согласно стандартным процедурам [9].

В работе использовали две линии клеток млекопитающих: HEK293 (линия клеток эмбриональной почки человека) и HeLa (клетки карциномы шейки матки человека), полученные из Российской коллекции клеточных культур (Санкт-Петербург). Клетки культивировали в среде DMEM («Sigma») с добавлением 10 % FBS при температуре 37 °C в CO₂-инкубаторе.

Конструирование рекомбинантных бакуловirusов. Рекомбинантные бакуловirusы получали на основе вируса множественного ядерного полиедроза *Autographa californica* (*AcMNPV*) в экспрессионной системе Bac-to-Bac («Invitrogen», США). На основе плазмиды *pFastBac* сконструирован рекомбинантный бакуловirusный вектор с экспрессионной кассетой CAG, выделенной с помощью рестриктаз *SpeI* и *HindIII* («Fermentas», Литва) из бакуловirusного трансферного вектора *pBacMam-1* («Invitrogen»).

Последовательность гена *EGFP* получена из векторной плазмиды *pEGFP-C1* («Clontech», США) по сайтам *Eco47III* и *KpnI* и встроена в поликлональный сайт, расположенный между промотором и последовательностью сигнала полиаденилирования по сайтам рестрикции *SmaI*, *KpnI*.

Трансфекцию проводили с использованием реагента CellFECTIN («Invitrogen»). Вирус концентрировали центрифугированием при 100000 g. Титр вирусных препаратов после амплификации и концентрирования составлял (2–4)10⁸ БОЕ (бляшкообразующих единиц) в 1 мл.

Трансдукция клеток млекопитающих рекомбинантными бакуловirusами. Клетки рассеивали в шестилуночные плашки в концентрации 2 · 10⁵ клеток на лунку в культуральной среде DMEM с добавлением 10 % FBS и антибиотиков с последующей инкубацией при *t* = 37 °C в CO₂-инкубаторе на протяжении 12 ч. Культуральную среду сливали, клетки промывали фосфатным буфером D-PBS

(Dulbecco PBS, без ионов Ca²⁺ и Mg²⁺) и добавляли рекомбинантный бакуловirus в концентрации 20, 200 и 500 moi (multiplicity of infection = количество БОЕ на клетку), общий объем PBS на лунку довели до 500 мкл. Далее использовали оптимизированный метод трансдукции [4]. Клетки во всех вариантах инкубировали в течение 4 ч при *t* = 28 °C, затем добавляли 1,5 мл среды DMEM и культивировали в течение 16 ч при *t* = 37 °C. В конце инкубационного периода раствор с вирусом сливали, клетки промывали PBS и добавляли 2 мл среды DMEM, содержащей 10 % FBS, продолжая культивирование клеток на протяжении 24 ч при температуре 37 °C, после чего клетки анализировали на проточном цитофлуориметре.

Флуоресцентная микроскопия и проточная цитофлуориметрия. Эффективность трансдукции определяли по количеству клеток, экспрессирующих светящийся белок, с использованием цитофлуориметра Coulter Epics XL, предварительно анализируя препараты на флуоресцентном микроскопе (Микмед-2ЕС). Культуру клеток для цитофлуориметрии снимали обработкой раствором трипсина (0,25 %) и ЭДТА (0,02 %) в соотношении 1:1. Клетки ресуспендировали в D-PBS (без Ca²⁺ и Mg²⁺) с 5 % FBS до плотности (1–5) · 10⁵/мл. Для каждого образца анализировали 10000 вариантов. В качестве отрицательного контроля использовали клетки, трансдуцированные вирусом *AcMNPV* без *EGFP*. Статистическую обработку результатов трансдукции проводили в соответствии со стандартными методами [10] с презентацией данных в программе Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение. Для оптимизации условий трансдукции клеток млекопитающих разного происхождения рекомбинантными бакуловirusами сконструирован рекомбинантный бакуловirusный вектор (*AcMNPV*) *AcMNPV-EGFP*, содержащий репортерный ген *EGFP* под регуляцией сильной промоторной кассеты CAG (рис. 1). CAG-кассета, включающая IE-энхансер цитомегаловirusа, промотор гена α -актина цыпленка и сигнал полиаденилирования гена β -глобина кроля, эффективно запускает экспрессию во многих типах клеток и проявляет себя более сильным регулятором, чем промоторы CMV и RSV [2].

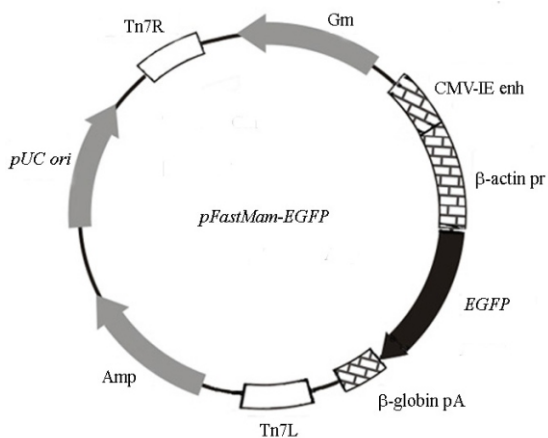


Рис. 1. Конструкция плазмиды *pFastMam-EGFP*, использованной для получения рекомбинантного бакуловирусного вектора *AcMNPV-EGFP*. Промотор гена полиэдрина заменен на комбинированный элемент, состоящий из IE-энхансера цитомегаловируса (CMV-IE enh) и промотора гена β -актина цыпленка (β -actin pr)

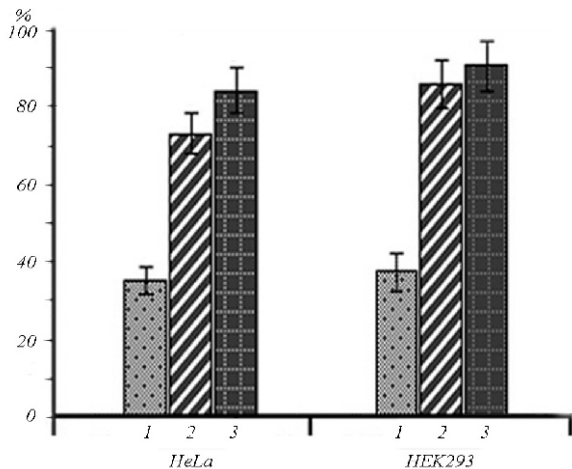


Рис. 3. Зависимость эффективности трансдукции клеток млекопитающих бакуловирусом *AcMNPV-EGFP* от дозы вируса при оптимизированных условиях трансдукции: 1 – 20; 2 – 200; 3 – 500 moi

Эффективность трансдукции бакуловирусами клеток млекопитающих варьирует в широких пределах и зависит от типа клеток. Линии клеток HEK293 и HeLa выбраны для оптимизации метода, поскольку демонстрировали в разных работах [4, 11] достаточно высокий уровень трансдукции.

Клетки линии HEK293 и HeLa трансдуцировали рекомбинантным бакуловирусом *AcMNPV-EGFP*, варьируя множественность инфицирования на клетку (20, 200, 500 moi) при $t = 28^\circ\text{C}$ на протяжении 4 ч в растворе PBS. Эффективность трансдукции повышалась при увеличении дозы вируса как

для клеток линии HEK293 (и составляла соответственно 38, 86 и 96 %), так и для клеток линии HeLa (35, 73 и 80 %) (рис. 2, см. вклейку, рис. 3). Полученные результаты демонстрируют пропорциональную зависимость эффективности трансдукции от дозы бакуловируса, что согласуется с данными литературы [4, 12]. Однако высокая концентрация рекомбинантного вируса (800 moi и больше) может приводить к перегрузке клеток млекопитающих вирусными геномами и являться причиной нарушения клеточного метаболизма, вызывающего замедление темпа деления клеток и снижение их жизнеспособности [5]. Оптимальная доза вируса, подобранная в наших опытах, составляла 500 moi (96 % светящихся клеток для линии HEK293 и 80 % – для клеток линии HeLa), доза вируса 200 moi также была достаточно эффективной (86 и 73 % соответственно).

Помимо концентрации вируса наиболее важным фактором, влияющим на эффективность трансдукции, является время инкубации [4, 11, 12]. В разных исследованиях время инкубации с рекомбинантными бакуловирусами колебалось от 1 [6] до 24 ч [11]. При этом наблюдалась позитивная корреляция между интенсивностью флуоресценции и временем инкубации, в особенности для высоких концентраций вируса. Показано, что вероятность проникновения бакуловирусов в клетки млекопитающих возрастает с увеличением времени инкубации и дозы вируса [12]. Однако существуют данные [11] о том, что увеличение продолжительности инкубации может оказывать отрицательное действие на пролиферацию клеток млекопитающих в особенности, если во время трансдукции клетки находятся в непермиссивных условиях (культуральная среда и температура).

Существенным фактором, действующим на степень проникновения бакуловирусов в клетки, является температура. В разных исследованиях температура инкубации рекомбинантных бакуловирусов с клетками млекопитающих колебалась от 4 до 37 °C [11, 12]. Наиболее эффективная трансдукция бакуловирусами клеток млекопитающих отмечены при $t = 25\text{--}28^\circ\text{C}$. Установлено, что титр бакуловирусов значительно снижался при $t = 37^\circ\text{C}$ и через 12 ч составлял 30 % от исходного количества.

тва вируса. Сравнение эффективности трансдукции рекомбинантным бакуловирусом *AcMNPV-EGFP* при температурах 28 и 37 °C в наших предварительных экспериментах показало, что при дозе вируса 200 moi для клеток линии HEK293 этот показатель существенно выше при $t = 28$ °C (86 % по сравнению с 51 %), а для клеток линии HeLa практически оставался на том же уровне (72–73 %).

Для разных клеточных линий предпочтительной средой для трансдукции в одних случаях была среда DMEM, в других – раствор D-PBS. Как показано ранее [4, 12], максимальная эффективность трансдукции достигалась при использовании D-PBS. В некоторых работах [11] трансдукцию проводили непосредственно в культуральной среде для клеток насекомых без концентрирования вируса с помощью центрифугирования, что значительно упрощало и ускоряло процедуру. Однако при таком подходе оптимальное соотношение вируса и клеток наблюдается при значительном увеличении объема инкубационной среды, что снижает эффективность трансдукции (наши предварительные данные). Кроме того, использование вирусного инокулята при трансдукции в некоторых случаях приводит к нарушению роста клеток млекопитающих [11]. А разведение вирусного инокулята раствором фосфатного буфера способствует повышению эффективности трансдукции [13]. Применение в этом варианте культуральной среды DMEM не давало высоких показателей. В нашей работе после предварительных экспериментов использовали раствор D-PBS.

Учитывая изложенные выше данные и результаты предварительных экспериментов, мы подобрали оптимальные условия трансдукции, состоящей из двух этапов. На первом этапе клетки инкубировали с рекомбинантным бакуловирусом в течение 4 ч при $t = 28$ °C в растворе фосфатного буфера (D-PBS), на втором – клетки продолжали инкубировать с рекомбинантным бакуловирусом, снижая его концентрацию в 3 раза (за счет добавления 1,5 мл среды DMEM, содержащей 10 % FBS), при $t = 37$ °C на протяжении 16 ч. Такой комбинированный подход позволил сохранить перmissive условия и для вируса, и для клеток млекопитающих, что способствует эффективному проникно-

ванию вируса в клетки. При этом уровень трансдукции нормальных (HEK293) и опухолевых (HeLa) клеток оказался достаточно близким по значению в соответствии с дозой вируса.

Максимальное количество клеток, экспрессирующих светящийся белок, наблюдалось через 24 и 48 ч после трансдукции. Значительное количество светящихся клеток сохранялось на 9-е сут, однако экспрессия репортерного гена постепенно уменьшалась, сохраняясь в единичных трансдуцированных клетках на протяжении 15 сут.

Повышенный интерес к бакуловирусам сделал необходимой более детальную характеристику процессов, сопровождающих введение рекомбинантных бакуловиров в клетки млекопитающих *in vivo* и *in vitro* [4, 7]. Несмотря на то, что такая характеристика, как отсутствие выраженной цитотоксичности даже при введении больших (500 moi) доз вируса, указывает на безопасность и преимущества бакуловиров, решение задачи применения вирусов насекомых в качестве векторов для генной терапии требует дальнейшего изучения. Исследование потенциала рекомбинантных бакуловиров для решения проблем клеточной инженерии, в том числе трансдукции стволовых клеток, доставки малых интерферирующих РНК, изучения функции генов и т. д. [5, 13], демонстрирует их перспективность в этих направлениях. Возможное применение бакуловиров в антиопухолевой терапии предполагает несколько подходов, например, различные варианты стратегий вакцинации либо экспрессии в составе бакуловиров антираковых агентов. Дальнейшее углубление понимания биологии бакуловиров и их взаимодействия с клетками млекопитающих будет способствовать более эффективному и целенаправленному применению вирусов насекомых.

I. N. Vagyna, O. V. Anopriyenko, O. A. Zaharuk, V. F. Gorchev, L. I. Strokovska, A. P. Solomko

Efficient gene delivery into mammalian cells by baculovirus vector *in vitro*

Summary

The recombinant baculovirus vector with EGFP reporter gene under the control of strong CAG promoter cassette was used for transduction of normal (HEK293) and tumor (HeLa) human cell lines. Dependence of transduction efficiency on the virus dose, time

of virus incubation, temperature and cell type is shown. Transient reporter gene expression gradually diminished and was detected in single cells on the 15th day after transduction.

Keywords: recombinant baculovirus, AcMNPV, transduction, transient expression, gene therapy.

I. М. Вагіна, О. В. Анопрієнко, О. А. Захарук, В. Ф. Горчев,
Л. І. Строківська, О. П. Соломка

Ефективність транспортування генів бакуловірусами в клітини ссавців *in vitro*

Резюме

Рекомбінантний бакуловірусний вектор, який містить репортерний ген EGFP під регуляцією сильної промоторної касети СAG, використано для трансдукції нормальної (HEK293) і пухлинної (HeLa) клітинних ліній людини. Показано залежність ефективності трансдукції від дози вірусу, часу інкубації з вірусом, температури і типу клітин. Експресія репортерного гена мала тимчасовий характер, поступово зменшувалась і детектувалась у поодиноких клітинах на 15-ту добу після трансдукції.

Ключові слова: рекомбінантний бакуловірус, AcMNPV, трансдукція, тимчасова експресія, генна терапія.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Hofmann C., Sandig V., Jennings G., Rudolph M., Schlag P., Strauss M. Efficient gene transfer into human hepatocytes by baculovirus vectors // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1995.—**92**, N 22.—P. 10099–10103.
- Shoji I., Aizaki H., Tani H., Ishii K., Chiba T., Saito I., Miyamura T., Matsuura Y. Efficient gene transfer into various mammalian cells, including non-hepatic cells, by baculovirus vectors // J. Gen. Virol.—1997.—**78**, N 10.—P. 2657–2664.
- Tani H., Limn C. K., Yap C. C., Onishi M., Nozaki M., Nishimune Y., Okahashi N., Kitagawa Y., Watanabe R., Mochizuki R., Moriishi K., Matsuura Y. *In vitro* and *in vivo* gene delivery by recombinant baculoviruses // J. Virol.—2003.—**77**, N 18.—P. 9799–9808.

- Kenoutis C., Efroze R. C., Swevers L., Lavdas A. A., Gaitanou M., Matsas R., Iatrou K. Baculovirus-mediated gene delivery into mammalian cells does not alter their transcriptional and differentiating potential but is accompanied by early viral gene expression // J. Virol.—2006.—**80**, N 8.—P. 4135–4146.
- Hu Y.-C. Baculovirus vectors for gene therapy // Insect viruses: biotechnological applications / Ed. D. C. Bonning.—New York: Elsevier, 2006.—Vol. 68.—P. 287–320.
- Condreay J. P., Witherspoon S. M., Clay W. C., Kost T. A. Transient and stable gene expression in mammalian cells transduced with a recombinant baculovirus vector // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1999.—**96**, N 1.—P. 127–132.
- Fujita R., Matsuyama T., Yamagishi J., Sahara K., Asano S., Bando H. Expression of *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus genes in mammalian cells and upregulation of the host beta-actin gene // J. Virol.—2006.—**80**, N 5.—P. 2390–2395.
- Boyce F. M., Bucher N. L. Baculovirus-mediated gene transfer into mammalian cells // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1996.—**93**, N 6.—P. 2348–2352.
- King L. A., Possee R. D. The baculovirus expression system. A laboratory guide.—London: Chapman and Hall, 1992.—220 p.
- Лакин Г. Ф. Биометрия.—М.: Высш. шк., 1990.—352 с.
- Cheng T., Xu C. Y., Wang Y. B., Chen M., Wu. T., Zhang J., Xia N. S. A rapid and efficient method to express target genes in mammalian cells by baculovirus // World J. Gastroenterol.—2004.—**10**, N 11.—P. 1612–1618.
- Hsu C. S., Ho Y. C., Wang K. C., Hu Y. C. Investigation of optimal transduction conditions for baculovirus-mediated gene delivery into mammalian cells // Biotechnol. Bioeng.—2004.—**88**, N 1.—P. 42–51.
- Kost T. A., Condreay J. P., Jarvis D. L. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells // Nat. Biotechnol.—2005.—**23**, N 5.—P. 567–575.

УДК 578.841:578.23
Надійшла до редакції 18.07.08

Рис. 2 до статті І. М. Вагіної та співавт.

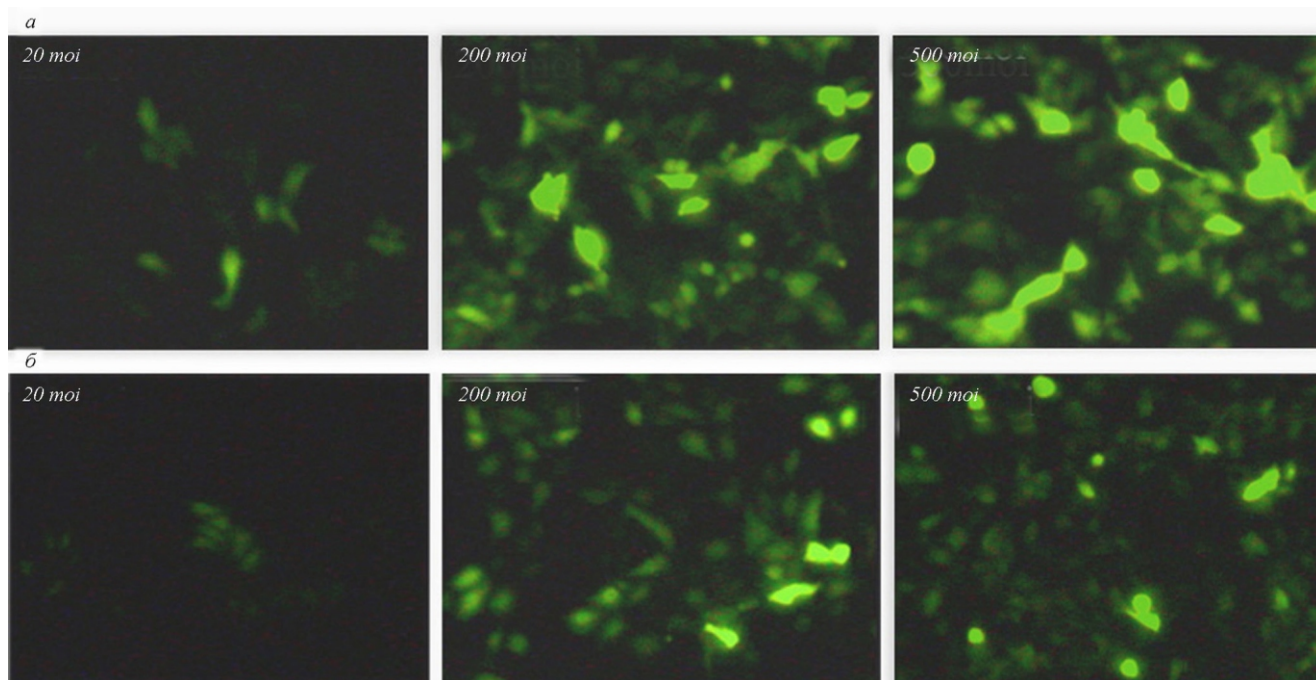


Рис. 2. Результаты флуоресцентной микроскопии трансдуцированных разными дозами рекомбинантного бакуловируса AcMNPV-EGFP клеток млекопитающих (100): а – трансдукция линии клеток HEK293; б – трансдукция клеток HeLa. Доза вируса, приведенная в единицах moi (multiplicity of infection = количество БОЕ на клетку), указана в левом верхнем углу фотографий