

УДК 576.36/616.1

© В.С. Прасолов, Д.С.Иванов

РЕТРОВИРУСНЫЕ ВЕКТОРЫ В ГЕННОЙ ТЕРАПИИ

В.С. ПРАСОЛОВ, Д.С.ИВАНОВ

Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН, Москва

Обзор посвящен системам ретровирусного переноса и экспрессии генов, нашедших широкое применение как в фундаментальной биологии, так и генной терапии. Рассматриваются уникальные особенности ретровирусов, послужившие основой для конструирования ретровирусных векторов и приемы работы с такими векторами.

Ключевые слова: Генотерапия, ретровирусы, ретровирусные векторы.

Перенос и экспрессия генов в клетках млекопитающих представляет существенный интерес как для современной фундаментальной биологии, так и ее прикладных областей: биотехнологии, сельского хозяйства, ветеринарии.

Создание новых высокоэффективных методов переноса и экспрессии генов в клетках человека сыграло ключевую роль в возникновении нового быстро развивающегося направления биомедицины - генной терапии, направленной на борьбу с многочисленными тяжелыми заболеваниями, вызванными генетическими дефектами, как наследственной, так и приобретенной природы (онкологические, некоторые вирусные заболевания).

Основной прием генотерапии - перенос и экспрессия в клетках пациента нормальных генов с целью восполнения дефицита функции гена, вызванного мутациями или полным отсутствием этого гена в случае моногенных заболеваний; а в случае онкологических заболеваний - введение в злокачественные клетки больного генов, увеличивающих их иммуногенность или сообщающих им чувствительность к химиотерапевтическим агентам.

В случае полигенных заболеваний в клетки больного вводят гены, кодирующие белки, способные приостановить развитие патологического процесса. Такой подход разрабатывается для терапии аутоиммунных заболеваний [1].

Большинство одобренных в США и Западной Европе генно-терапевтических клинических протоколов основаны на использовании вирусных векторов. Из них по меньшей мере в 50% протоколов используются ретровирусные векторы [2-4], тогда как в остальных случаях используются векторы на основе ДНК-содержащих вирусов различной природы или невирусные

методы доставки рекомбинантных ДНК, такие, например, как баллистические методы или методы с использованием липосом.

Структура генома и жизненный цикл ретровирусов.

Прежде чем перейти к принципам, лежащим в основе дизайна ретровирусных векторов, необходимо остановиться на основных особенностях структуры генома и жизненного цикла ретровирусов [5].

Структура вирусных частиц и геномная организация вирусов группы MuLV довольно просты (рис. 1 и 2). Только 3 вирусных гена нужны для репликации вируса: *gag* (определяющий группоспецифический антиген), кодирующий внутренние белки вирусной частицы; *pol* - направляющий синтез протеазы, обратной транскриптазы (также обладающей и активностью РНКазы H) и интегразы; и *env*, который кодирует белки оболочки вируса.

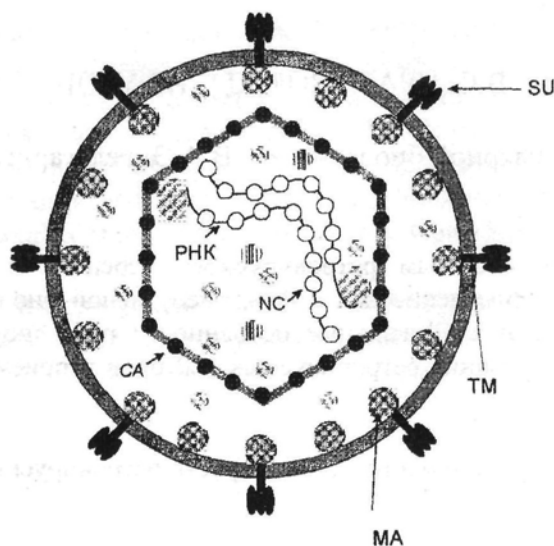


Рисунок 1

Схема строения ретровирусного вириона

- RT - обратная транскриптаза
- Pro - протеаза
- Int - интеграза
- NC - нуклеокапсидный белок
- CA - капсидный белок

- MA - матричный белок
- TM - трансмембранный белок
- SU - поверхностный гликопротеин

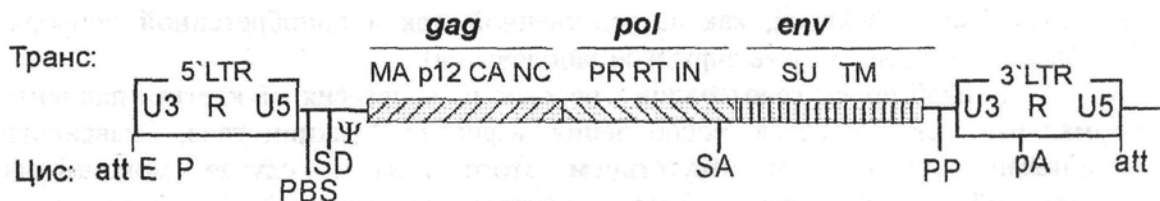


Рисунок 2

Схема генома простого ретровируса (Mo-MuLV) и его генетические элементы с цис- и транс- функциями. Элементы с цис-функциями - гены, кодирующие следующие белки: *gag* - MA (матричный p15), p12, CA (капсидный p30), NC (белок нуклеокапсида p30) *pol* - PR (протеаза), RT (обратная транскриптаза/РНКазы H), IN (интегразы) *env* - SU (поверхностный gp70), TM - трансмембранный белок

Элементы с цис-функциями: Ψ-последовательность - сигнал упаковки/димеризации вирусной РНК att - последовательности, по которым идет интеграция в геном E, P - энхансер/промотор PBS - primer binding site - участок связывания специфической тРНК pA - сигнал полиаденилирования PP - полипуриновая последовательность SA, SD - акцепторный и донорный сайты сплайсинга

Зрелые вирусные частицы, отпочковавшиеся от мембраны зараженной клетки, содержат 2 молекулы одноцепочечной РНК (геном ретровирусов - диплоидный!), заключенных в икосаэдрический капсид, состоящий из внутренних белков. Капсид окружен оболочкой из цитоплазматической мембраны клетки, от которой отпочковался вирус, модифицированной гликозилированными белками оболочки вируса (продукты гена *env*).

Первичный контакт ретровируса с новой клеткой при заражении осуществляется за счет специфического взаимодействия белков оболочки вируса (гликопротеинов) с нормальными поверхностными белками клетки (рецепторами), выполняющими ту или иную функцию (см. ниже). Проникновение вирусного капсида, содержащего РНК-геном вируса, в заражаемую клетку происходит путем слияния мембран вириона и заражаемой клетки, которое индуцируется взаимодействием поверхностного гликопротеина вируса с его клеточным рецептором [6].

В настоящее время выделено и охарактеризовано несколько клеточных поверхностных белков, выполняющих роль рецепторов при вирусном заражении [7]. Для экотропных MuLV, способных заражать только клетки грызунов (мышь, крыса), рецептором является белок, кодируемый геном *Cat 1*, который ответственен за транспорт из среды в клетку основных аминокислот. Для амфотропных MuLV, способных заражать как клетки грызунов, так и приматов (в том числе и человека), роль рецепторов выполняют клеточные белки, кодируемые геном(и) *Pit*, которые ответственны за транспорт фосфатов.

Проникновение в клетку сопровождается освобождением капсида от оболочки и началом синтеза двухцепочечного ДНК-генома (провируса) на матрице вирусной РНК с помощью входящей в состав вирусного нуклеокапсида РНК-зависимой ДНК-полимеразы (обратной транскриптазы).

Затравкой (праймером) этой многоступенчатой реакции служит клеточная тРНК (для большинства MuLV - пролиновая тРНК), комплементарная PBS (primer binding site) участку, расположенному в 5'-концевой части вирусной РНК. Конечным продуктом полимеразной реакции является двухцепочечный ДНК-провирус, содержащий все вирусные гены и фланкированный большими 3' и 5' концевыми повторами (long terminal repeat, LTR). В LTR содержатся регуляторные элементы, выполняющие важные функции в жизненном цикле ретровируса (см. ниже).

ДНК-провирус способен интегрировать в геном делящихся клеток и, как указывалось выше, передаваться по наследству вместе с клеточным геномом. Интеграция вирусной ДНК (провируса) является уникальным событием в жизненном цикле этих вирусов и абсолютно необходима для их последующей репликации и персистенции в зараженных клетках. Специфические последовательности на концах LTR (так называемые att-сайты), так же как и кодируемая вирусным геном *pol* интегразы, необходимы для процесса интеграции.

Интеграция не зависит от каких-либо специфических последовательностей нуклеотидов в геномной ДНК клетки-хозяина (в геноме можно выделить 500-1000 участков в которые независимая интеграция осуществляется с частотой $\sim 2,5 \times 10^{-4}$ на участок). Вместе с тем есть указания на то, что провирус предпочтительно интегрирует в активно-транскрибируемые участки генома [8].

Интегрированный провирус представляет собой транскрипционную единицу, обладающую своими собственными регуляторными элементами, однако экспрессия полностью осуществляется с помощью ферментов и факторов хозяйской клетки, т.к. продукты вирусных генов у простых ретровирусов, к

которым относятся вирусы лейкозов мышей, не принимают участия в транскрипции. Вируспецифическая регуляция экспрессии на уровне транскрипции определяется сигнальными элементами, локализованными в LTR.

В результате альтернативного сплайсинга образуется как полноразмерная (геномная) РНК, направляющая на рибосомах синтез продуктов генов *gag* и *pol*, так и сплайсированная РНК, являющаяся матрицей при синтезе белков оболочки (продукты гена *env*).

Первичными продуктами трансляции вирусных РНК являются белки-предшественники, созревание которых до зрелых белков осуществляется в результате их протеолитического расщепления. Процессинг предшественника, кодируемого генами *gag* и *pol*, осуществляется вирусной протеазой, а гликозилированного предшественника - продукта гена *env*, - клеточными протеазами. Полагают, что процессинг предшественника, кодируемого геном *env*, происходит в процессе его синтеза и транспорта через мембрану клетки.

Специфическая последовательность (ψ -область), расположенная в 5'-концевой области части полноразмерной вирусной РНК, является сигналом для упаковки вирусной РНК в белки капсида. Оболочка вириона формируется из мембраны клетки при выходе вирусных частиц из клетки путем отпочковывания (рис. 3)

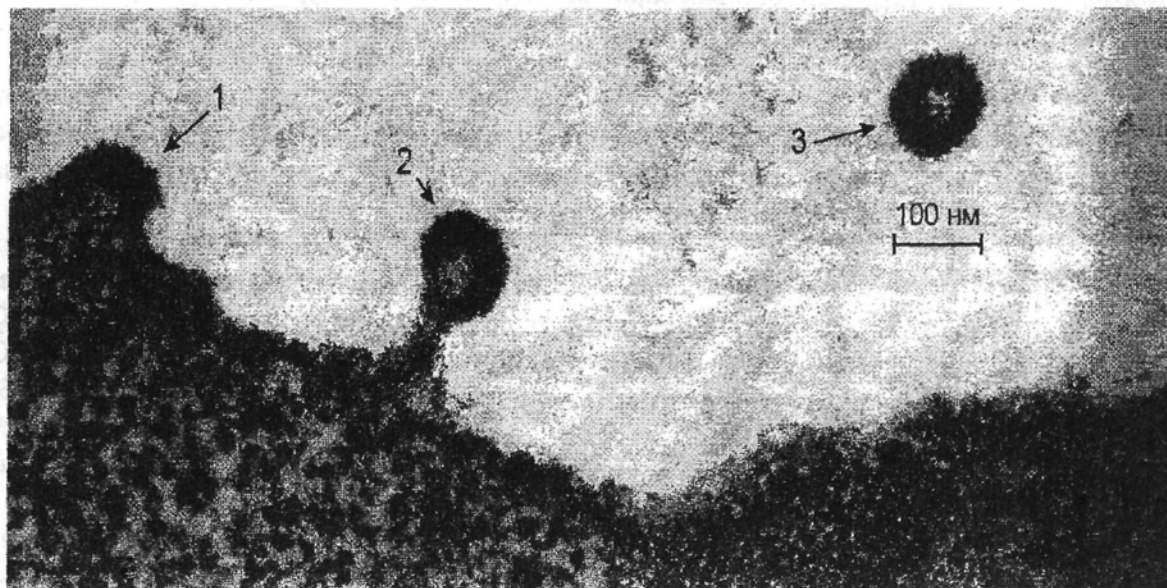


Рисунок 3

Электронная микрофотография ретровируса С-типа группы MLV на разных стадиях формирования вириона (любезно предоставлена д-ром Габриэлем Рутгером, Ин-т экспериментальной вирусологии и иммунологии им. Генриха-Петте, Гамбург, ФРГ)

- 1- Начальная стадия формирования вириона
- 2- Отпочковывание вириона
- 3- Зрелый вирион

Новообразованные частицы готовы присоединиться к свободным рецепторам на поверхности незараженных клеток, после чего все события, описанные выше, повторяются, т.е. осуществляется новый цикл репликации вируса (рис. 4).

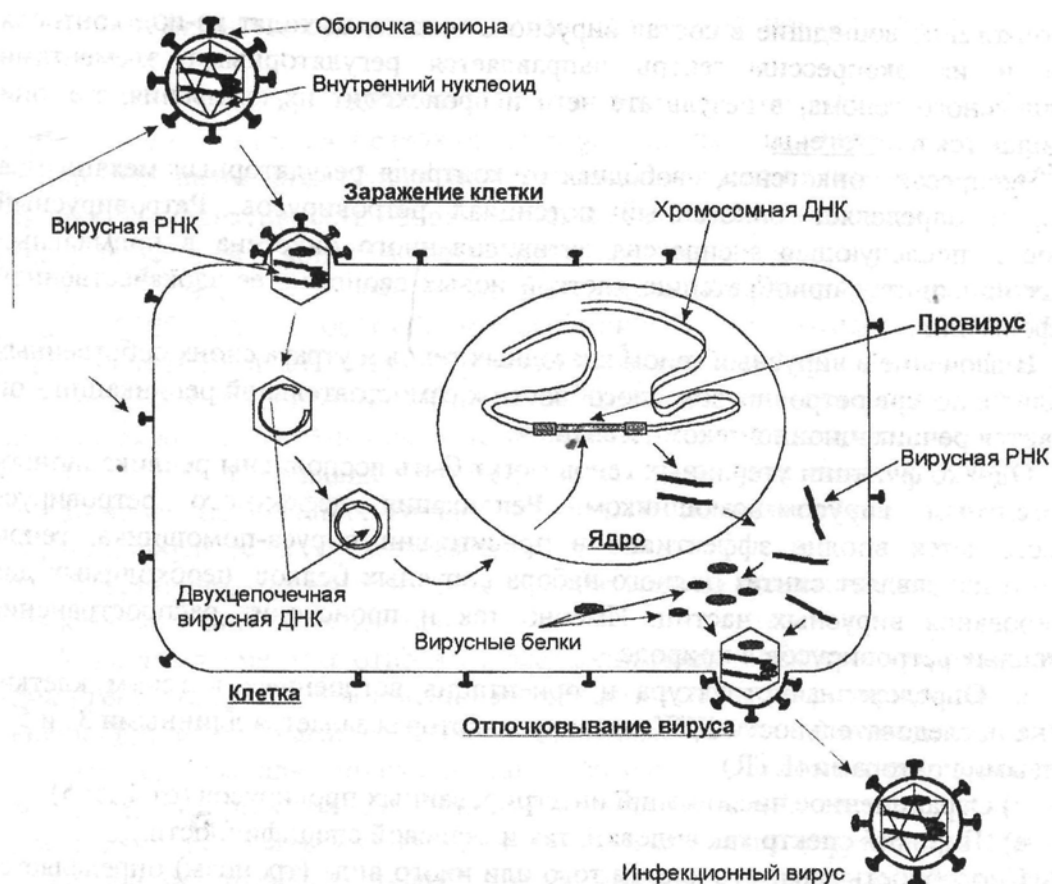


Рисунок 4

Схема жизненного цикла репликационно-компетентного ретровируса.

Природные свойства ретровирусов определяют возможность создания на их основе эффективных векторов для переноса и экспрессии генов в клетках млекопитающих, в том числе и человека. Причем перенос может быть осуществлен как в перевиваемые клетки *in vitro*, так и в клетки тканей живого организма, т.е. *in vivo*.

Таковыми свойствами являются:

а) Способность генома ретровирусов (в виде ДНК-провируса) интегрировать в геном зараженной клетки. Провирус затем стабильно реплицируется в составе клеточного генома и передается от поколения к поколению подобно обычным клеточным генам.

б) Отсутствие цитопатического действия - ретровирусы группы вирусов лейкозов мышей (murine leukemia viruses, - MuLV), на основе которых сконструировано большинство используемых в настоящее время ретровирусных векторов (как в фундаментальных исследованиях, так и в генотерапевтических целях), не вызывают гибели инфицированных клеток (данный обзор посвящен ретровирусным векторам, сконструированным на основе этой группы вирусов).

в) Способность ретровирусов включать генетический материал зараженной клетки в свой геном и переносить его в геном других клеток при развитии вирусной инфекции. Именно так возникают онкогенные ретровирусы. Показано, что образование таких ретровирусов происходит в результате "захвата" вирусным геномом важных регуляторных генов клетки - протоонкогенов, - при одновременной потере своих вирусных генов. Величина приобретенного фрагмента клеточной ДНК может достигать 7 тыс. пар нуклеотидов (т.п.н.).

Протоонкогены, вошедшие в состав вирусного генома, выходят из-под контроля клетки и их экспрессия теперь направляется регуляторными элементами ретровирусного генома, в результате чего и происходит их активация, т.е. они превращаются в онкогены.

Экспрессия онкогенов, свободная от контроля регуляторных механизмов клетки, и определяет онкогенный потенциал ретровирусов. Ретровирусный перенос и последующая экспрессия активированного онкогена в нормальных клетках приводит к приобретению клеткой новых свойств - ее злокачественной трансформации.

Включение в вирусный геном клеточных генов и утрата своих собственных приводит к потере ретровирусом способности к самостоятельной репликации - он становится репликационно-некомпетентным.

Однако функции утерянных генов могут быть восполнены репликационно-компетентным вирусом-помощником. Репликация дефектного ретровируса осуществляется вполне эффективно в присутствии вируса-помощника, геном которого направляет синтез полного набора вирусных белков, необходимых для формирования вирусных частиц. Именно так и происходит распространение онкогенных ретровирусов в природе.

г) Определенная структура и ориентация встроенных в геном клетки-хозяина последовательности ДНК-провируса, которая задается длинными 3' и 5' - концевыми повторами (LTR).

д) Ограниченное число копий интегрированных провирусов (от 1 до 5).

е) Широкий спектр как видовой, так и тканевой специфичности.

Способность заражать клетки того или иного вида (тропизм) определяется в первую очередь белком оболочки вируса, взаимодействующим при заражении с клеточными белками, выполняющими роль рецепторов и локализованными на поверхности мембраны. Важную роль играет также совместимость сигналов транскрипции вирусного генома и факторов транскрипции клетки.

В случае ретровирусов, дефектных по гену белков оболочки *env*, также как и в случае ретровирусных векторов, тропизм определяется белками оболочки вируса-помощника. Таким образом, меняя вирус-помощник, можно направленно изменять тропизм дефектного вируса или ретровирусного вектора. Этот прием часто используется как в фундаментальных, так и в прикладных исследованиях.

Лимитирующим является пролиферативный статус клеток - ретровирусы группы MuLV способны заражать лишь делящиеся клетки, что связано с неспособностью провируса в комплексе с внутренними белками вируса проникать через ядерную мембрану в ядро. В ходе митоза, когда ядерная мембрана разрушается, провирус получает возможность подойти к геномной ДНК и встроиться в геном.

Сложные ретровирусы, такие как лентивирусы, способны заражать и неделящиеся клетки.

Принципы конструирования ретровирусных векторов

Анализ функциональной значимости различных участков ретровирусного генома и их роли в жизненном цикле позволил разделить элементы генома на две группы [9]:

1. Обладающие *цис*-функцией (*cis*-элементы)
2. Обладающие *транс*-функцией (*trans*-элементы)

Эффективная репликация ретровируса осуществляется лишь при наличии в его геноме всех *цис*-элементов. К ним относятся:

1. Энхансер, промотор и сигнал полиаденилирования геномной РНК вируса.

2. ψ -область, необходимая для формирования вирусных частиц. Именно с взаимодействия белков-продуктов гена gag с ψ -областью геномной вирусной РНК начинается сборка вирусных частиц. Было показано, что область, влияющая на эффективность сборки - несколько больше ψ -области и включает примыкающие к ней 5' концевые последовательности гена gag [10].

3. Элементы, необходимые для синтеза ДНК провируса на геномной вирусной РНК путем обратной транскрипции (к ним относятся - участок связывания тРНК или PBS, полипуриновый участок или PPT, необходимые для синтеза первой и второй цепи провирусной ДНК, соответственно, и повтор R на обоих концах вирусной РНК, также необходимый для синтеза провируса)

4. Два небольших частично инвертированных повтора (att-сайты), расположенных на внешних концах обоих LTR провируса, необходимых для интеграции провируса в геном зараженной клетки.

Естественно, что все эти элементы обязательно должны быть включены в состав всех ретровирусных векторов.

К *транс*-элементам относятся все кодирующие области ретровирусного генома - гены *gag*, *pol* и *env*. Именно эти области генома ретровируса могут быть заменены другими генами по выбору экспериментатора. Вируссpezifические белки, необходимые для репликации такого искусственно созданного дефектного ретровируса, которым, по сути, является ретровирусный вектор, могут быть предоставлены природным репликационно-компетентным вирусом-помощником при смешанном заражении, подобно тому, как это имеет место в жизненном цикле репликационно-некомпетентных онкогенных ретровирусов.

Как правило, типичный ретровирусный вектор в своей вирусной части наряду с *цис*-элементами генома содержит: 1) ген, позволяющий проводить отбор клеток с интегрированным вектором на селективной среде. Чаще всего для этого используют гены, сообщающие клеткам устойчивость к антибиотикам; 2) фрагмент ДНК, содержащий уникальные участки узнавания различных рестриктаз, по которым осуществляется клонирование необходимых генов.

Наряду с вирусной компонентой ретровирусный вектор должен содержать элементы бактериальной плазмиды, обеспечивающие возможность проведения основных геноинженерных манипуляций в клетках *E. coli*, подобно тому, как это осуществляют с обычными плазмидными векторами, - ген, необходимый для проведения селекции (в качестве селективных генов для проведения генно-инженерных манипуляций в клетках *E. coli* в настоящее время чаще всего используют гены, кодирующие ферменты, сообщающие устойчивость к антибиотикам ампицилину, канамицину или тетрациклину) и участок начала репликации бактериальной ДНК.

На рис. 5 приведена схема типичного ретровирусного вектора семейства рPS-нео, сконструированного в институте молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН, в состав которого входят все необходимые элементы, о которых шла речь выше [11]. Указаны бактериальная и собственно ретровирусная компоненты вектора.

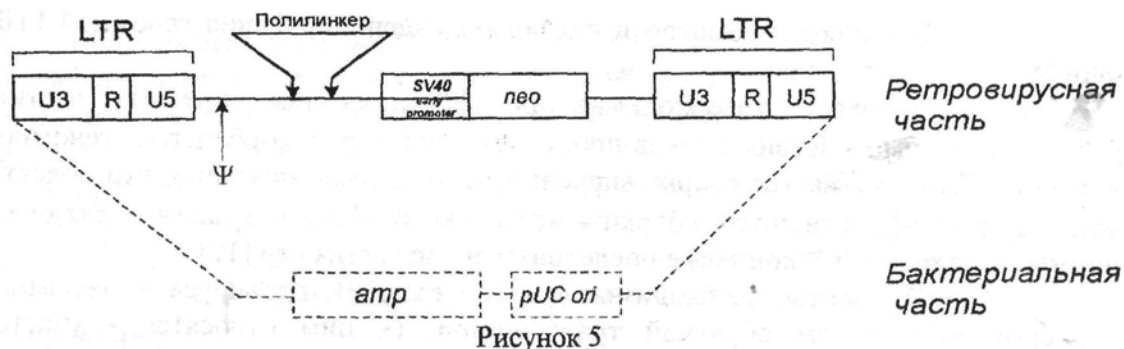


Рисунок 5
Схема ретровирусного вектора *amp* - ген устойчивости к ампициллину *pUC ori* - участок инициации репликации прокариотической ДНК *neo* - ген устойчивости к неомицину/
G-418 пунктиром обозначена бактериальная часть вектора

На рис. 6 приведены схематические изображения наиболее распространенных типов ретровирусных векторов. Показаны только собственно ретровирусные части векторов.

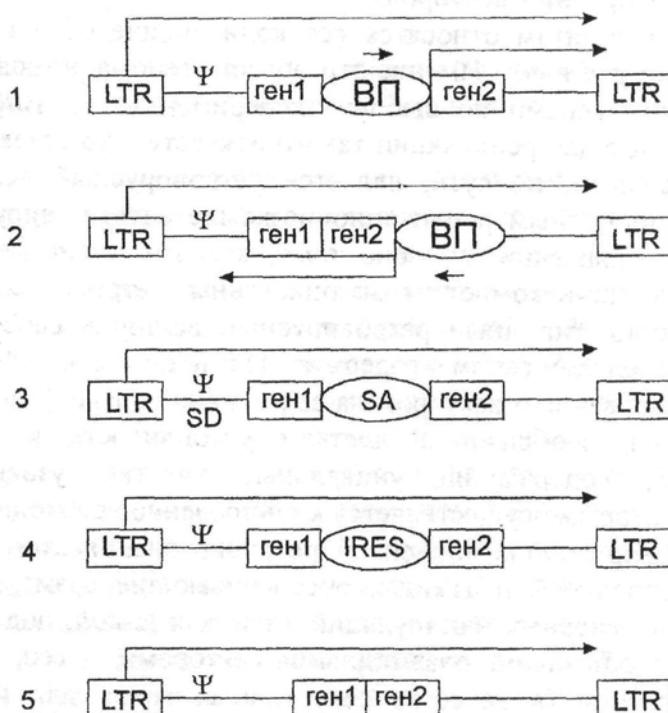


Рисунок 6

Схематическое изображение ретровирусных векторов (в виде ДНК-провирусов)

- 1,2 - использование разных промоторов для экспрессии двух генов
- 3 - использование для экспрессии двух генов типичной для ретровирусов системы сплайсинга, 4 - использование IRES (internal ribosome entry site) последовательности, которая обеспечивает трансляцию полицистронных мРНК, 5 - вектор, кодирующий "fusion"-белок, нужен только один промотор
- Ψ- пси-область, ВП - внутренний промотор, SD, SA - донорный и акцепторный сайты сплайсинга, Стрелками показано направление транскрипции

В конструкциях 1-го и 2-го типа каждый из экспрессируемых генов находится под контролем собственного промотора. В обеих конструкциях один

из генов (первый - расположенный ближе к 5'-LTR) находится под контролем промотора 5'-концевого LTR, а второй - под контролем внутреннего промотора (ВП). Причем в конструкции 1 направления транскрипции обоих генов совпадают, а в конструкциях 2-го типа транскрипция осуществляется в противоположных направлениях (см. рис. 6) Использование нескольких промоторов приводит к их "конкуренции", из-за чего может меняться соотношение уровней экспрессии разных генов и снижаться общий уровень экспрессии. Если транскрипция осуществляется в противоположных направлениях, возможно образование гибридов РНК-РНК, которые не могут служить матрицей для трансляции.

В векторах 3-го типа оба гена находятся под контролем промотора 5'-концевого LTR, между генами находится акцепторный сайт (SA) сплайсинга. В результате процессинга образуются два типа транскриптов. Несплайсированная РНК является матрицей для синтеза белка, кодируемого геном 1, сплайсированная - матрицей для синтеза белка, кодируемого геном 2. Таким образом, реализуется ситуация, подобная той, которая имеет место и в природе при экспрессии генов *gag*, *pol* и *env* у вирусов лейкоза мышей. Использование системы сплайсинга не всегда приводит к оптимальным результатам, т.к. на ее эффективность влияют нуклеотидные последовательности самих генов, и поэтому возможна весьма значительная разница в уровнях их экспрессии. Кроме того, используемые гены не должны содержать "скрытых" сигналов сплайсинга.

Конструкции 4-го типа содержат IRES (internal ribosome entry site) - специфическую последовательность длиной в несколько сотен пар оснований, впервые обнаруженную в геноме пикорнавирусов. IRES-последовательность позволяет эукариотической рибосоме осуществлять трансляцию полицистронных мРНК. Рибосома может присоединиться к IRES-последовательности во внутренних районах мРНК и начать трансляцию. Использование IRES позволяет использовать не только би-, но и олиго-цистронные векторы. На эффективность функционирования IRES-последовательности влияют последовательности нуклеотидов клонированных генов. Наличие IRES-последовательности в РНК может приводить к уменьшению ее стабильности, и, как следствие, к уменьшению уровня экспрессии гена.

При необходимости получения "fusion"-белков, последовательности соответствующих генов (или их частей) объединяют таким образом, чтобы каждый из них сохранял свою собственную рамку считывания (5 тип).

При работе с ретровирусными векторами следует учитывать ряд ограничений, определяемых размерами генома и особенностями жизненного цикла ретровирусов семейства MuLV. Как уже упоминалось выше, эти векторы могут быть использованы только для работы с делящимися клетками. Второе ограничение связано с максимальной величиной геномной РНК, способной к включению в состав вирусной частицы. Как правило, эта величина не должна превышать 10 - 12 т. п. н. Учитывая долю *cis*-элементов генома, можно рассчитывать на включение в ретровирусный вектор кДНК суммарной величиной до 7 т. п. н.

Последовательности нуклеотидов, включаемые в ретровирусные векторы, не должны препятствовать осуществлению полного жизненного цикла ретровируса, в особенности синтезу полноразмерной геномной РНК. Поэтому фрагменты ДНК, клонированные в векторе, не должны содержать сигнал(ы) полиаденилирования в ориентации, совпадающей с направлением транскрипции.

Так как репликация ретровирусных векторов, также как и природных ретровирусов, осуществляется с чередованием пребывания генома в виде ДНК (провирус) и РНК (геном вирусных частиц), при клонировании в векторе фрагментов ДНК, содержащих интроны, последние, как правило, утрачиваются в результате сплайсинга.

Клонирование в векторе некоторых генов может существенно снижать титр рекомбинантных ретровирусных частиц. Так, при включении в состав вектора кДНК фактора VIII свертывания крови, титр уменьшается на 2 порядка за счет адекватного уменьшения уровня содержания геномной РНК вектора.

Известно, что интеграция провируса может привести к активации клеточных генов, расположенных по соседству с провирусом в направлении транскрипции провируса [12]. Запуск транскрипции осуществляется энхансерно-промоторной областью 3'-концевого LTR (это явление получило название инсерционного мутагенеза). Активации могут подвергаться протоонкогены, что приводит к изменению статуса клетки, в том числе и к ее трансформации.

Для исключения такой возможности были созданы так называемые самоинактивирующиеся векторы. Для этого в 3' LTR векторной ДНК (провирус) вносят делецию, затрагивающую энхансерно-промоторную область (находится в U3 районе LTR). В результате транскрипции в упаковывающих клетках образуется геномная РНК вектора, способная к нормальной упаковке в ретровирусный вирион. После заражения клетки-мишени из-за особенностей процесса обратной транскрипции образующийся провирус оказывается лишенным промоторно-энхансерной области в обоих LTR (рис.7). Естественно, что экспрессия гена(ов), вошедших в состав такого вектора, должна обеспечиваться внутренним промотором (промоторами).

Необходимо отметить, что по непонятным причинам титр самоинактивирующихся векторов значительно ниже, чем у векторов без делеций в LTR.

В настоящее время в генной терапии используются в основном не самоинактивирующиеся векторы. Несмотря на это, сообщения об активации онкогенов в клетках пациентов пока отсутствуют.

Упаковывающие клетки

Подобно геномным РНК дефектных репликационно-некомпетентных ретровирусов, молекулы геномной РНК ретровирусных векторов, содержащие в своем составе ψ -область, могут быть включены в состав инфекционных ретровирусных частиц, все вирусспецифические белки которых предоставлены репликационно-компетентным вирусом-помощником.

Спектр клеток, в которые может быть перенесен геном ретровирусного вектора, определяется белком SU, который кодируется геном env вируса-помощника. Для этого в одной и той же клетке должна осуществляться экспрессия как вектора, так и вируса-помощника. Это достигается введением в геном клетки а) ДНК ретровирусного вектора путем стандартных методов введения ДНК в клетки (Са-фосфатной трансфекции или электропорации) и б) провируса ретровируса-помощника, путем обычного заражения или также Са-фосфатной трансфекцией клонированного провируса-помощника. Экспрессия обоих провирусов приводит к образованию в таких клетках двух типов инфекционных вирусных частиц: природных частиц вируса-помощника и рекомбинантных вирусных частиц, содержащих рекомбинантную РНК ретровирусного вектора с клонированными генами. Таким образом, культуральная среда таких клеток наряду с рекомбинантными ретровирусными

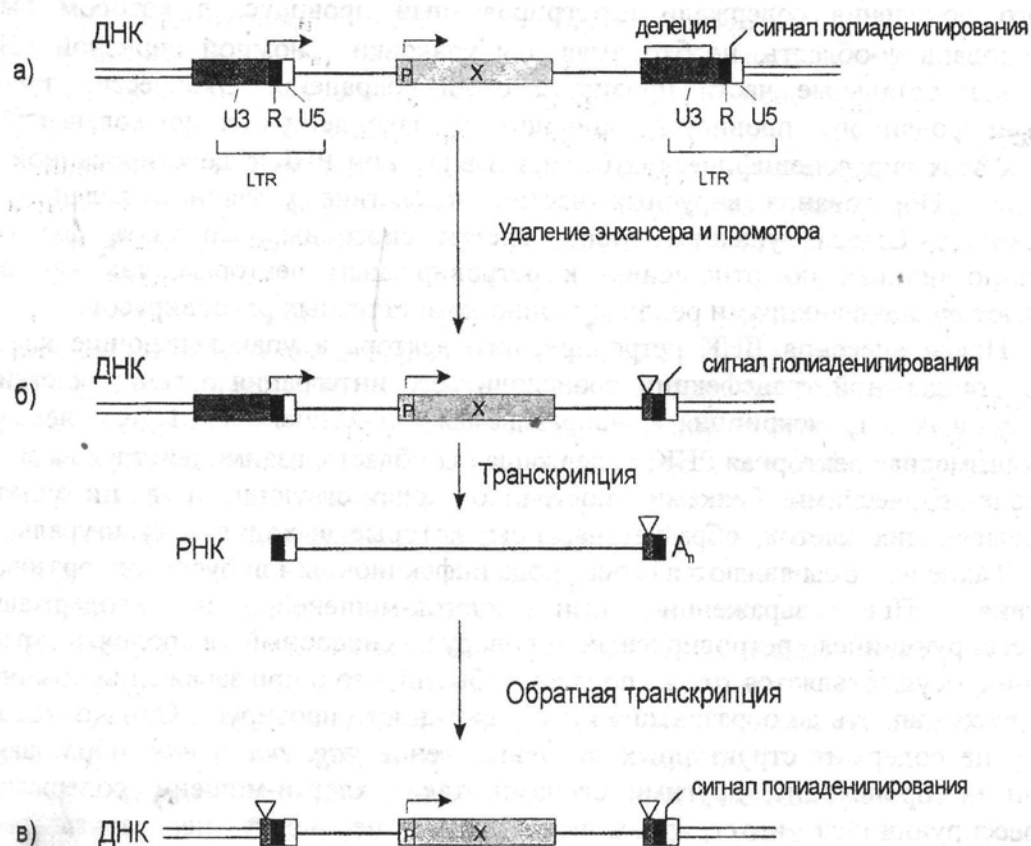


Рисунок 7

Схематическое изображение структурно-функциональных изменений ретровирусного вектора, приводящих к делециям в промоторно-энхансерных областях обоих LTR

- а) - ретровирусный вектор (оба LTR содержат энхансерно-промоторную область)
- б) - самоинактивирующийся вектор в виде провируса в геноме упаковывающей клетки
- в) - самоинактивирующийся вектор в виде провируса, интегрированного в геном клетки-мишени

▽ - делеция промоторно-энхансерной области
 → - направление транскрипции, задаваемое активным промотором
 Р - внутренний промотор, X - клонированные ген/гены

частицами (вектор), будет содержать частицы репликационно-компетентного вируса-помощника. Существует ряд приемов, позволяющих разделить эти частицы, однако они, как правило, довольно трудоемки и не гарантируют получения препарата рекомбинантных ретровирусных частиц, полностью свободного от частиц вируса-помощника, что во многих случаях абсолютно неприемлемо, в первую очередь при генной терапии.

Важным этапом в развитии ретровирусных систем переноса было создание так называемых упаковывающих клеток, что позволило, с одной стороны, избежать использования репликационно-компетентных вирусов-помощников для формирования частиц рекомбинантного вируса (вектора), и значительно упростило работу с векторами, с другой.

Упаковывающие клетки представляют собой перевиваемые клетки, в которых осуществляется синтез всех вирусспецифических белков, необходимых для формирования инфекционных ретровирусных частиц, при отсутствии

образования самих инфекционных вирусных частиц. Упаковывающие клетки первого поколения содержали интегрированный провирус, в котором была делетирована ψ -область, необходимая для упаковки геномной вирусной РНК, тогда как остальные части провируса были сохранены. Экспрессия такого модифицированного провируса приводит к накоплению в упаковывающих клетках всех вирусспецифических белков и вирусной РНК с делетированной ψ -областью. Образование вирусных частиц вследствие указанной делеции не происходит. Однако упаковывающие клетки способны выполнять функции вируса-помощника по отношению к ретровирусным векторам, так как они обладают *транс*-функциями репликационно-компетентных ретровирусов.

После внесения ДНК ретровирусного вектора в упаковывающие клетки путем стандартной трансфекции происходит его интеграция в геном клетки и последующая транскрипция, направляемая 5'-концевым LTR вектора. Полноразмерная векторная РНК, содержащая ψ -область, взаимодействуя вместе с вирусспецифическими белками, постоянно присутствующими в цитоплазме упаковывающих клеток, образует частицы, которые выходят в культуральную среду. Такие частицы являются своего рода инфекционным вирусом одноразового действия. При заражении ими клеток-мишеней, не содержащих экспрессирующийся ретровирусный провирус, способный выполнять транс-функции, осуществляется тот же порядок событий, что и при заражении обычным провирусом вплоть до образования интегрированного провируса. Однако, так как вектор не содержит структурных вирусных генов *gag*, *pol* и *env*, образования частиц не происходит; другими словами, такие клетки-мишени, содержащие экспрессирующийся интегрированный вектор, не могут передавать гены, приобретенные в составе вектора незараженным клеткам по горизонтали. В то же время интегрированный вектор передается дочерним клеткам по наследству, т.е. по вертикали. Поскольку процесс переноса генов с помощью рекомбинантных ретровирусных частиц заканчивается на клетках-мишенях, а не распространяется дальше, подобно тому, как это происходит в случае репликационно-компетентных вирусов, то принято говорить не об инфекционном переносе, а о трансдукции генов в составе вектора.

Следует, однако, отметить, что при внесении ДНК ретровирусных векторов в упаковывающие клетки первого поколения вследствие рекомбинации между ψ^- -провирусом, направляющим синтез структурных белков ретровируса в упаковывающих клетках, и внесенным ψ^+ -вектором, происходило образование репликационно-компетентного ретровируса, способного к распространению путем заражения все новых и новых клеток.

Репликационно-компетентные ретровирусы также могут возникать в результате рекомбинации любой из двух указанных конструкций (внесенные в упаковывающие клетки ψ^- -провирус и ψ^+ -вектор) с эндогенными ретровирусами, находящимися в геноме упаковывающих клеток.

Для предотвращения рекомбинаций, приводящих к образованию инфекционных репликационно-компетентных ретровирусов, при создании упаковывающих клеток второго и третьего поколения наряду с делецией ψ -области, дополнительно вносили ряд делеций [13], или создавали 2 независимых и пространственно разобщенных оперона, один из которых направлял экспрессию генов *gag* и *pol*, а другой - экспрессию гена *env* [14]. Таким образом были получены линии упаковывающих клеток, в которых вероятность реконструкции репликационно-компетентного ретровируса была значительно снижена или практически полностью исключалась.

Природа клеток, являющихся основой для создания упаковывающих клеток, в значительной степени определяет эффективность последних. Упаковывающие клетки первого поколения создавались на основе перевиваемых фибробластов мыши, тогда как в последнее время чаще используют клетки иной природы, в частности, перевиваемые клетки почки эмбриона человека линии 293. Эффективность трансфекции (введение ДНК ретровирусного вектора) в клетки линии 293 в сотни раз выше, чем в клетки фибробластов мыши, что приводит к соответствующему увеличению титра рекомбинантных ретровирусных частиц, который может достигать до 10^7 инфекционных вирусных частиц на мл.

Тропизм рекомбинантных ретровирусных частиц, продуцируемых упаковывающими клетками, определяется геном *env*, экспрессируемым в этих клетках. Поэтому для целей генной терапии (т.е. для внесения генов в клетки человека) используют упаковывающие клетки, в которых осуществляется синтез белков оболочки амфотропного MuLV или белков оболочки GALV (вирус лейкоза гиббонов). Рецептором для первого белка служит трансмембранный белок - продукт гена *Pit2*, а для второго белка - трансмембранный белок - продукт гена *Pit1*. Оба этих трансмембранных белка ответственны за перенос фосфатов из среды в клетку и широко представлены в клетках человека, а также других млекопитающих. В так называемых экотропных упаковывающих клетках, осуществляется синтез белка оболочки экотропного MuLV, поэтому рекомбинантные ретровирусные частицы, образуемые этими клетками способны переносить гены только в клетки грызунов (мышь, крыса),

Существенно что при использовании упаковывающих клеток в целях генной терапии необходимо быть уверенным в отсутствии репликационно-компетентных вирусов и постоянно проводить соответствующий контроль с помощью специальных тестов.

На схеме (рис.8) приведены основные этапы переноса чужеродных генов с помощью ретровирусных векторов:

1. Клонирование гена, представляющего интерес, в ДНК ретровирусного вектора, что осуществляется с помощью стандартных генноинженерных методов. На данном этапе вектор ведет себя как обычный плазмидный вектор. Затем следует амплификация ДНК вектора и селекция, которые осуществляются в клетках *E. coli*, с последующими выделением и очисткой ДНК ретровирусного вектора.

2. Перенос высокоочищенной ДНК ретровирусного вектора в упаковывающие клетки с помощью трансфекции или электропорации. Селекция упаковывающих клеток, содержащих интегрированный экспрессирующийся провирус и продуцирующих рекомбинантные ретровирусные частицы, в состав которых входит РНК-геном ретровирусного вектора с клонированными генами. Следует обратить внимание на то, что в состав вирусных частиц входит РНК, соответствующая собственно ретровирусной части вектора, тогда как бактериальная часть полностью отсутствует. Это происходит потому, что транскрипция осуществляется с промотора, локализованного в 5'-концевом LTR, а терминация происходит на 3'-концевом LTR. Если при интеграции в геном упаковывающей клетки разрыв ДНК вектора происходит в ретровирусной, а не бактериальной части вектора, то целостность вирусного оперона нарушается, и такие клетки не продуцируют ретровирусные частицы.

3. Сбор рекомбинантных ретровирусных частиц.

Собирают кондиционированную среду упаковывающих клеток, содержащую рекомбинантные ретровирусные частицы, которую используют для переноса ретровирусного вектора в клетки-мишени.

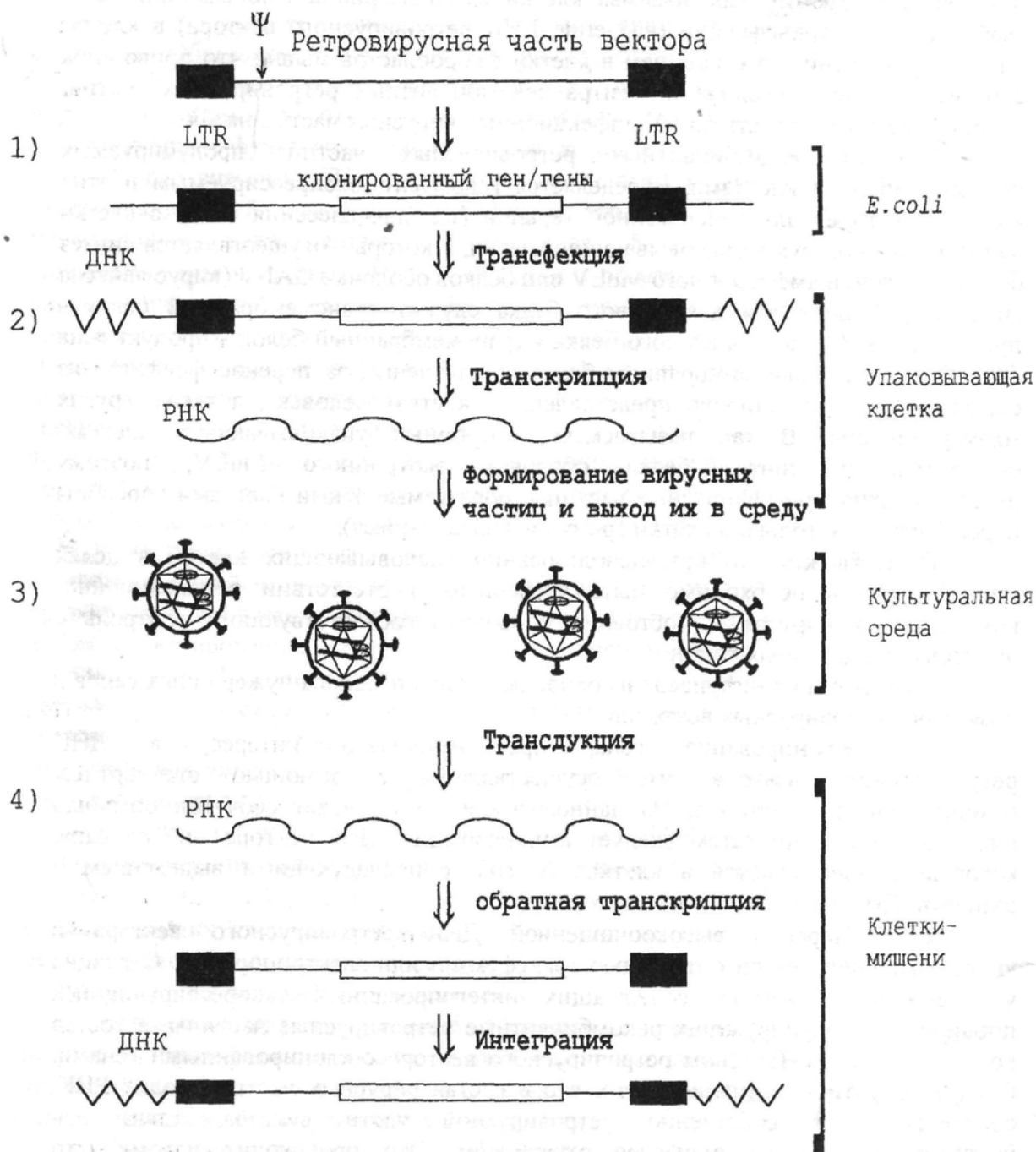


Рисунок 8

Схема переноса генов с использованием ретровирусных векторов

- Этапы переноса: 1. Клонирование гена (генов) в ДНК ретровирусного вектора
 2. Трансфекция ДНК вектора с клонированным геном в упаковывающие клетки
 3. Сбор культуральной среды упаковывающих клеток
 4. Трансдукция гена в составе вектора в клетки-мишени

4. Вслед за трансдукцией в клетках-мишенях на векторной РНК осуществляется синтез ДНК-провируса, который после интеграции в геном направляет экспрессию клонированных генов. Селекция клеток позволяет получить популяцию трансгенных клеток-мишеней, в которых осуществляется экспрессия генов интегрированного провируса ретровирусного вектора.

Ретровирусные векторы в генной терапии

Существует ряд подходов лечения как наследственных, так и приобретенных заболеваний, основанных на внесении в геном клеток больного разного рода генов и их последующей экспрессии [15]. В настоящее время для этих целей чаще всего используется система ретровирусного переноса, созданная на основе амфотропных MuLV. Определяющим для такого выбора была сравнительно высокая эффективность трансдукции генов и их стабильная интеграция в составе провируса в геном соматических клеток больного.

Впервые в клинике ретровирусные векторы были использованы для маркировки лимфоцитов [16]. Из тканей опухоли (меланомы), удаленных у больных на терминальной стадии, выделяли Т-лимфоциты, которые трансдуцировали ретровирусным вектором, несущим ген *neo* (ген неомифосфотрансферазы, сообщает клеткам устойчивость к антибиотику G-418), а затем, после наращивания клеток *in vitro*, их возвращали в организм больных, надеясь подавить рост неудаленных у больных злокачественных клеток. Было показано, что маркерный ген *neo* сохраняется в течение нескольких месяцев в таких модифицированных лимфоцитах, как циркулирующих в кровотоке, так и находящихся в метастатических узлах [17]. Эти результаты имели важное значение для развития генной терапии, так как свидетельствовали об отсутствии явного цитотоксического действия трансдуцированного ретровирусного вектора.

Позднее цитотоксические Т-лимфоциты, специфические к антигенам ВИЧ (HIV-1), пытались использовать для уничтожения клеток, зараженных ВИЧ. Эти Т-лимфоциты также метили с помощью ретровирусного вектора, с тем, чтобы проследить их судьбу после введения в организм пациента. Однако в данном исследовании у большей части пациентов было обнаружено развитие иммунного ответа на модифицированные лимфоциты [18].

В настоящее время аутологичная трансплантация костного мозга часто используется при химиотерапии, направленной на уничтожение злокачественных клеток. При этом костный мозг отбирается у больного до курса химиотерапии и возвращается в организм пациента после завершения курса лечения. Рецидивы могут возникать как из-за злокачественных клеток, сохранившихся в отобранном и возвращенном обратно костном мозге, или же из-за злокачественных клеток, переживших курс химиотерапии. Маркировка костного мозга перед аутологичной трансплантацией показала, что рецидивы могут возникать из-за присутствия злокачественных клеток в пунктате костного мозга. Это важное наблюдение указывает на необходимость тщательного отделения здоровых клеток костного мозга от злокачественных при аутологической трансплантации [19].

Геннотерапевтические подходы для лечения многих наследственных моногенных болезней, связанных с нарушением функции одного гена, основаны на внесении в геном больного и экспрессии нормального (так называемого "терапевтического") гена с помощью ретровирусных векторов. Впервые такой подход был использован при генной терапии тяжелого комбинированного иммунодефицита, вызванного недостаточностью ADA (аденозиндезаминазы) [20-22]. У больных с таким заболеванием резко снижено содержание Т- и В-лимфоцитов, что без лечения приводит к смерти в детстве от разного рода

инфекционных заболеваний. Для восполнения дефицита по ADA у пациентов выделяли лимфоциты, в которые с помощью ретровирусных векторов вводили ген ADA. Трансдуцированные лимфоциты наращивали *in vitro*, после чего возвращали в организм пациентов. Процедуру проводили неоднократно с интервалом в 1,5 месяца. В результате у одной из двух девочек, подвергшихся лечению, уровень ADA в циркулирующих Т-лимфоцитах поддерживался на высоком уровне в течении 2-х лет без дополнительных курсов генотерапии, и у обеих было отмечено улучшение иммунного статуса по сравнению с таковым до терапии.

Другой пример использования ретровирусных векторов в генной терапии моногенных заболеваний - лечение семейной гиперхолестеринемии, вызванной дефектами в белке-рецепторе липопротеинов низкой плотности (LDL). Процедура включала в себя удаление приблизительно 20% печени. Этот материал использовали для получения первичной культуры гепатоцитов, в клетки которой с помощью ретровирусных векторов *in vitro* вносили нормальный ген рецептора. Трансдуцированные гепатоциты вводили непосредственно в печень пациента, у которого после этого достоверно снижался уровень холестерина в крови [23].

Ретровирусные векторы нашли широкое применение в разрабатываемых генотерапевтических методах борьбы с онкологическими заболеваниями, основанными на стимуляции иммунного ответа, направленного против злокачественных клеток.

Один из таких подходов заключается в увеличении иммуногенности путем введения в изолированные злокачественные клетки генов, направляющих экспрессию новых антигенов, в надежде на то, что реимплантация этих модифицированных клеток в организм пациента приведет к развитию сильного иммунного ответа не только на новые антигены, но и на собственные антигены опухолевых клеток [24].

Другой подход предполагает экспрессию в опухолевых клетках иммуностимулирующих цитокинов. Для этого в выделенные из опухоли клетки осуществляют трансдукцию генов соответствующих цитокинов, после чего клетки облучают (с тем, чтобы предотвратить их рост в организме) и возвращают в опухоль. Наряду с опухолевыми клетками такая же процедура может быть осуществлена и с другими клетками, например, с фибробластами пациента, которые также можно имплантировать в опухоль [3,25].

В настоящее время одобрены генотерапевтические протоколы, основанные на имплантации упаковывающих клеток, продуцирующих рекомбинантные ретровирусные частицы, в ткань опухоли пациента [26].

Один из них предполагает введение и экспрессию в клетках опухоли так называемых "генов самоубийства". Так, в случае опухолей мозга (глиобластома), упаковывающие клетки, продуцирующие ретровирусные векторные частицы, содержащие ген тимидинкиназы вируса простого герпеса (HSV-tk), вводили непосредственно в опухоль. Так как трансдукция осуществляется только в делящиеся клетки, то перенос гена в составе вектора происходит только в активно делящиеся злокачественные клетки, но не в нормальные клетки мозга. При последующем лечении больного ганцикловиром, HSV-tk индуцирует его превращение в токсичный для клетки аналог. Клеточная тимидинкиназа не способна катализировать такую реакцию. Поэтому введение больному ганцикловира приводит к гибели только опухолевых клеток, в которых и происходит экспрессия гена HSV-tk. На настоящий момент осуществляются клинические испытания такого подхода [4].

Аналогичный подход разрабатывается и для борьбы с раком яичника и молочной железы [27].

Противоположный подход - введение в здоровые клетки генов, сообщающих им устойчивость к химиотерапевтическим препаратам, используемым в терапии онкологических заболеваний. Показано, что экспрессия гена *MDR1* в стволовых клетках крови придает им устойчивость ко многим используемым в клинике химиотерапевтическим препаратам, таким как винкристин и адриамицин, что позволяет значительно уменьшить риск подавления гемопоэза у пациента при проведении курса химиотерапии [28,29].

Способность ретровирусных векторов осуществлять перенос генов только в делящиеся клетки была использована при развитии генотерапевтических методов лечения таких аутоиммунных заболеваний, как ревматоидный артрит и рассеянный склероз. При этом предусматривается введение терапевтических генов только в лимфоциты, специфические к аутоантигену. Это достигается стимуляцией лимфоцитов, выделенных из селезенки, соответствующим антигеном (для ревматоидного артрита - это коллаген, для рассеянного склероза - миелин). Подобная процедура приводит к пролиферации только сенсibilизированных лимфоцитов, в которые и осуществляется перенос терапевтических генов [30-32].

Заключение

Ретровирусные системы переноса и экспрессии генов являются удобным и эффективным инструментом исследования во многих фундаментальных областях биологической науки. Уже сейчас они с успехом применяются для развития совершенно новых подходов к лечению наследственных, онкологических и некоторых вирусных заболеваний, - составляющих основу нового направления биомедицины - генной терапии.

Рамки настоящего обзора позволили остановиться только на некоторых основных принципах конструирования ретровирусных векторов и их использования.

Очевидны пути их дальнейшего совершенствования. В первую очередь это регулируемая, тканеспецифическая доставка и экспрессия, которые существенно расширят возможность применения ретровирусных векторов в биологии и медицине.

ЛИТЕРАТУРА

1. Seerogy C.M., Fathman C.G. (2000) *Gene Ther.*, 7, 9-13.
2. Kohn D.B., Bauer G., Rice C.R., Rothschild J.C., Carbonaro D.A., Valdez P., Hao Q.I., Zhou C., Bahner I., Kearns K., Brody K., Fox S., Haden E., Wilson K., Salata C., Dolan C., Wetter C., Aguilar-Cordova E., Church J. (1999) *Blood*, 94(1), 368-371.
3. Nemunaitis J., Fong T., Burrows F., Bruce J., Peters G., Ognoskie N., Meyer W., Wynne D., Kerr R., Pippen J., Oldham F., Ando D. (1999) *Hum. Gene Ther.*, 10(8), 1289-1298.
4. Shand N., Weber F., Mariani L., Bernstein M., Gianella-Borradori A., Long Z., Sorensen A.G., Barbier N. (1999) *Hum. Gene Ther.*, 10(14), 2325-2335.

5. Coffin J.M., Hughes S.H., Varmus H.E. (eds.) (1997), *Retroviruses*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
6. Hunter E., Swanstrom R. (1990) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **157**, 187-253.
7. Weiss R.A. (1993) In: *The Retroviridae* (Levi J.A. ed.), Plenum Press, New York, pp. 5-8.
8. Rohdewohld H., Weiher H., Reik W., Jaenisch R., Breindl M. (1987) *J. Virol.*, **61**, 336-343.
9. Baum C., Ostertag W., Stocking C., Laer D. (1999) in: *Gene Therapy of Cancer*, Academic Press, 51-76.
10. Bender M.A., Palmer T.D., Gelinas R.E., Miller A.D. (1987) *J. Virol.*, **61**, 1639-1646.
11. Прасолов В.С., Чумаков П.М. (1988) *Мол. биол.*, **22**, 1678-1687
12. Jonkers J., Berns A. (1996) *Biochim. Biophys. Acta*, **1287**, 29-57
13. Mann R., Mulligan R.C., Baltimore D. (1983) *Cell*, **33**, 153-159
14. Cosset FL, Takeuchi Y, Battini JL, Weiss RA, Collins MK (1995) *J. Virol.*, **69**, 7430-7436.
15. Зеленин А.В., Кайгородов В.А., Прасолов В.С. (1998) *Мол. биол.*, **32**(2), 219-228.
16. Rosenberg S.A., Blease R.M., Anderson W.F. (1990) *Hum. Gene Ther.*, **1**, 73-92.
17. Rosenberg S.A., Aebersold P., Cornetta K., Kasid A., Morgan R.A., Moen R., Karson E.M., Lotze M.T., Yang J.C., Topalian S.L., Merino M.J., Culver K., Miller A.D., Blaese R.M. (1990) *N. Engl. J. Med.*, **323**, 570-578.
18. Riddell S.R., Elliot M., Lewinsohn D.A., Gilbert M.J., Wilson L., Manley S.A., Lupton S.D., Overell R.W., Reynolds T.C., Corey L., Greenberg P.D. (1996) *Nat. Med.*, **2**, 216-223.
19. Rill D.R., Santana V.M., Roberts W.M., Nilson T., Bowman L.C., Krance R.A., Heslop H.E., Moen R.C., Ihle J.N., Brenner M.K. (1994) *Blood*, **84**, 380-383.
20. Anderson W.F. (1992) *Science*, **256**(5058), 808-813.
21. Culver K.W. (1994) *Gene Therapy. A Handbook for Physicians*, Mary Ann Liebert Inc. Publishers.
22. Blaese R.M., Culver K.W., Miller A.D., Carter C.S., Fleisher T., Clerici M., Shearer G., Chang L., Chiang Y., Tolstoshev P. (1995) *Science*, **270**(5235), 475-480.
23. Grossman M., Rapper S.E., Kozarsky K., Stein E.A., Engelhardt J.F., Miller D., Lupien P.J., Wilson J.M. (1994) *Nat. Genet.*, **6**, 335-341.
24. Nabel G.J., Nabel E.G., Yang Z.Y. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 11307-11311.
25. Tepper R.I., Mule J.J. (1994) *Hum. Gene Ther.*, **5**, 153-164.
26. Oldfield E.H., Ram Z., Culver K.W., Blaese R.M., DeVroom H.L., Anderson W.F. (1993) *Hum. Gene Ther.*, **4**, 39-69.
27. Ross G., Erickson R., Knorr D., Motulsky A.G., Parkman R., Samulski J., Strauss S.E., Smith B.R. (1996) *Hum. Gene Ther.*, **7**, 1781-1790.
28. Baum C., Margison G.P., Eckert H.G., Fairbairn L., Ostertag W. (1996) *Gene Ther.*, **3**, 1-3.
29. Omori F., Juopperi T., Chan C.K., Chang Y.N., Phipps S., Nanji S., Zhao Y., Stewart A.K., Dube I.D. (1999) *J. Hematother. Stem Cell Res.*, **8**, 503-514.
30. Chernajovsky Y., Adams G., Triantaphyllopoulos K., Ledda M.F., Podhajcer O.L. (1997) *Gene Ther.*, **4**, 553-559.

31. Croxford JL, Triantaphyllopoulos K, Podhajcer OL, Feldmann M, Baker D, Chernajovsky Y. (1998) *J. Immunol.*, **160**, 5181-5187.
32. Chen L.Z., Hochwald G.M., Huang C., Dakin G., Tao H., Cheng C., Simmons W.J., Dranoff G., Thorbecke G.J. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 1 2516-12521.

Поступила 3.04.00.

RETROVIRAL VECTORS FOR GENE THERAPY.

V.S. PRASSOLOV, D.S. IVANOV

Engelhardt Institute of Molecular Biology Russian Academy of Sciences MOSCOW

This review describes the systems of retroviral transfer and expression of the genes that are widely applied in basic biological research and in gene therapy. Unique features of retroviruses providing a background for construction of retroviral vectors and the methods to use these vectors are discussed.

Key words: gene therapy, retroviruses, retroviral vectors