

Казанский государственный университет

На правах рукописи

РИЗВАНОВ Альберт Анатольевич

ВИРУСНЫЕ И НЕВИРУСНЫЕ МЕТОДЫ ВВЕДЕНИЯ В ОРГАНИЗМ
РЕКОМБИНАНТНЫХ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

03.01.04 - биохимия

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
доктора биологических наук

Казань 2010

Работа выполнена в Казанском государственном университете им В.И. Ульянова-Ленина

Научный консультант: доктор медицинских наук,
профессор Исламов Р.Р.

Официальные оппоненты: доктор биологических наук,
профессор Чернов В.М.

доктор медицинских наук,
профессор Скороходкина А.В.

доктор биологических наук,
профессор Купраш Д.В.

Ведущее учреждение: Учреждение Российской Академии Наук
Институт общей генетики им. Н.И.
Вавилова РАН г. Москва

Защита состоится 14 октября 2010 г. в 13⁰⁰ часов на заседании диссертационного Совета по защите диссертаций на соискание учёной степени доктора биологических наук Д 212.081.08 в Казанском государственном университете им В.И. Ульянова-Ленина по адресу: г. Казань, ул. Кремлевская, 18.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке им. Н.И. Лобачевского Казанского государственного университета.

Автореферат разослан «___» _____ 2010 г.

Учёный секретарь
диссертационного Совета,
доктор биологических наук, профессор З.И. Абрамова



ВВЕДЕНИЕ

Одна из актуальных задач современной биологии — направленный контроль экспрессии генов с изменением отдельных признаков организма. Перспективным направлением для решения этой задачи считают генную терапию, т.е. введение в организм рекомбинантных генов с заданными свойствами. Актуальность генной терапии для практического применения очевидна, но существующие на сегодняшний день методы генетической модификации клеток имеют ряд существенных недостатков, связанных с биобезопасностью и малой эффективностью классических технологий.

Принцип генной терапии состоит во введении рекомбинантного генетического материала для коррекции генетического дефекта (мутации) или для влияния на отдельные свойства клетки, такие как синтез биомолекул. Методы генной терапии позволяют экспрессировать рекомбинантные гены, кодирующие терапевтические белки для лечения различных заболеваний либо с целью иммунизации организма, снижать уровень экспрессии или полностью подавлять экспрессию генов (нокдаун и нокаут, соответственно от «knokdown» и «knockout») при генетических или соматических заболеваниях, таких как онкологические, нейродегенеративные и инфекционные (Seow and Wood 2009). Первые клинические исследования по генной терапии были проведены в девяностые годы прошлого столетия (Anderson 1990). С тех пор в мире зарегистрировано более 1537 клинических исследований с применением методов генной терапии (<http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/>).

Существует два основных методических подхода для введения генетического материала в клетку-мишень — вирусный и невирусный. Вирусный подход основан на способности вирусов взаимодействовать с клетками организма, что приводит к введению вирусной генетической информации внутрь клеток и экспрессии вирусных генов. Миллионы лет эволюции привели к тому, что процесс вирусного инфицирования стал чрезвычайно эффективным. Главный недостаток данного подхода — высокая биологическая опасность вирусной инфекции. Опасность может быть связана с особенностями жизненного цикла вирусов. Например, интеграция ретровирусов в геном клетки-хозяина несёт риск вставочного мутагенеза и изменения экспрессии клеточных протоонкогенов, что может привести к опухолевой трансформации клетки. Кроме того, многие вирусные белки обладают сильным иммуногенным действием, что может привести к нежелательным побочным эффектам и снизить эффективность применения подобных генетических векторов. Более того, многие вирусы не обладают выраженной видоспецифичностью, что может привести к попаданию рекомбинантных генов в биосистему с неконтролируемыми последствиями для экологии и здоровья.

Невирусные методы доставки генетического материала основаны на введении рекомбинантных генов в клетку-мишень с помощью различных

физических (электропорация, соникация, баллистика и т.д.) или химических (липофекция, катионные наночастицы и полимеры и т.д.) методов. Общий недостаток, присущий данным методам, — относительно низкие специфичность и эффективность введения генетической информации.

Цель работы: разработка биологически безопасных систем доставки нуклеиновых кислот для использования в генной терапии.

В соответствии с целью работы определены следующие **экспериментальные задачи:**

1. Разработка нового видоспецифичного вирусного вектора на основе цитомегаловируса для введения генетического материала в клетки оленых хомячков *Peromyscus maniculatus*.

2. Анализ экспрессии рекомбинантных белков с помощью цитомегаловируса *P. maniculatus in vitro* и анализ иммунного ответа у хомячков *P. maniculatus* при инфицировании рекомбинантным вирусом.

3. Анализ репликативной активности рекомбинантного цитомегаловируса *in vitro* и особенностей вирусной инфекции *in vivo* у хомячков *P. maniculatus*.

4. Анализ внутриклеточного взаимодействия и созревания гликопротеинов хантавирусов с помощью невирусных методов генной доставки.

5. Разработка плазмидных генетических конструкций, экспрессирующих различные терапевтические гены и их комбинации.

6. Разработка методов комбинированной генно-клеточной терапии на основе трансфицирования моноклеарных клеток пуповинной крови человека плазмидными векторами для лечения бокового амиотрофического склероза.

7. Разработка методов доставки короткой интерферирующей РНК (siRNA) для терапии бокового амиотрофического склероза и оценка эффективности подавления экспрессии мутантного гена с помощью РНК-интерференции у трансгенных мышей G93A.

Научная новизна. Впервые создан видоспецифичный вектор на основе цитомегаловируса из *Peromyscus maniculatus* для экспрессии рекомбинантных белков с целью исследования иммунного ответа в организме хомячков на хантавирусные антигены. Впервые исследован эффект делеции гена *p33* цитомегаловируса на вирусную инфекцию *in vitro* и *in vivo*. Впервые получены данные о взаимодействии гликопротеинов вирусной оболочки различных хантавирусов Южной и Северной Америки. Получены данные о внутриклеточном созревании хантавирусных белков. Впервые получены генетические конструкции, одновременно и независимо экспрессирующие нейротрофические терапевтические белки VEGF и L1CAM. Показано, что клетки моноклеарной фракции пуповинной крови человека (ядросодержащие клетки пуповинной крови, включая стволовые кроветворные клетки), генетически модифицированные

нейропротекторными генами, способны к миграции в очаги нейродегенерации у трансгенных мышей G93A (модель бокового амиотрофического склероза) и дифференцировке в эндотелиальные клетки, участвующие в формировании новых кровеносных капилляров. Впервые показано, что аппликация короткой интерферирующей РНК (специфичной к мутантной форме гена супероксиддисмутазы 1 человека) на центральный отрезок перерезанного седалищного нерва у трансгенных мышей G93A, экспрессирующих данный мутантный ген, приводит к снижению количества мРНК супероксиддисмутазы 1 в поясничном отделе спинного мозга мышей.

Положения, выносимые на защиту:

1. Цитомегаловирус хомячков *Peromyscus maniculatus* может служить эффективным вектором для создания генетических вакцин.
2. Внутриклеточная локализация и модификация гликопротеинов G1 и G2 хантавирусов зависит от характера экспрессии вирусных белков.
3. Невирусные методы генной и клеточной терапии эффективны для лечения бокового амиотрофического склероза.

Теоретическая и научная значимость. Создание видоспецифичного генетического вектора на основе цитомегаловируса из *Peromyscus maniculatus* позволяет исследовать механизмы иммунного ответа организма хозяина на компоненты вируса. Полученные данные создают основу для создания биологически безопасных вакцин против хантавирусной инфекции как для человека, так и для видоспецифичной иммунизации естественного носителя вируса. Исследование взаимодействия и внутриклеточной модификации хантавирусных гликопротеинов вирусной оболочки позволяет глубже понять биологию данного семейства вирусов и оценить возможность межвидового генетического обмена в природе, что может привести к появлению вирусов с новыми инфекционными свойствами. Создание невирусных генетических векторов и разработка методов их применения для генетической модификации клеток пуповинной крови человека позволяет получить новый класс биологически безопасных генно-клеточных препаратов для лечения широкого спектра заболеваний человека, в том числе нейродегенеративных. Демонстрация активирования механизмов РНК-интерференции при периферической аппликации siRNA на центральный отрезок перерезанного седалищного нерва у трансгенных мышей демонстрирует возможность ретроградного транспорта siRNA и открывает новые возможности в использовании генной терапии на основе siRNA для лечения наследственных форм нейродегенеративных заболеваний.

Связь работы с базовыми научными программами. Исследования по теме работы проведены в период с 1996 по 2009 г. в соответствии с НИР Казанского государственного университета 01200850995 и 01200952944. Работа поддерживалась грантами Национального Института Здоровья AI36418, HL63470, AI45059 и HLBI 63470. Работа поддерживалась грантами: молодёжный грант Академии Наук Республики Татарстан, №11-9/2009(Г)

«Разработка современных биомедицинских методов лечения хронической артериальной недостаточности нижних конечностей с использованием клеточных, генно-клеточных и генных технологий»; грант НАТО NR.RIG.983007 «Combination gene and stem cell therapy for treating neurodegenerative diseases»; грант РФФИ 07-04-00746-а «Стимулирование регенерации аксонов в центральной и периферической нервной системе с помощью гелевых носителей для стволовых клеток, супрамолекулярных систем с самосборкой, сосудистого эндотелиального фактора роста и ксимедона»; грант Правительства Республики Татарстан по подготовке и переподготовке кадров в зарубежных научных центрах; государственный контракт ФЦП Федерального Агентства по Науке и Инновациям 02.512.11.2052 «Клеточная терапия генетически модифицированными стволовыми клетками пуповинной крови трансгенных мышей G93A, экспрессирующих фенотип бокового амиотрофического склероза»; грант РФФИ 06-04-49396-а «Состояние аксонного транспорта и внутриаксонного синтеза белка в условиях гравитационной разгрузки»; молодёжный грант Академии Наук Республики Татарстан, №11-9/2009(Г) «Разработка современных биомедицинских методов лечения хронической артериальной недостаточности нижних конечностей с использованием клеточных, генно-клеточных и генных технологий»; государственный контракт ФЦП Федерального Агентства по Науке и Инновациям 02.740.11.0302 «Исследование фундаментальных механизмов патогенеза нейродегенеративных заболеваний и разработка современных технологий для их лечения»; грант РФФИ 09-04-05079-б «Развитие МТБ для проведения исследований по области знаний 04»; государственный контракт ФЦП Федерального Агентства по Науке и Инновациям 02.552.11.7088 «Проведение поисковых научно-исследовательских работ в области физико-химии наноматериалов и молекулярных систем, включая биологические, в центре коллективного пользования научным оборудованием «Федеральный центр коллективного пользования физико-химических исследований веществ и материалов»». В 2009 году работа на тему «Вирусные и невирусные методы генетической терапии» отмечена премией Правительства Республики Татарстан для государственной поддержки молодых учёных.

Апробация работы. Материалы диссертации представлены на American Society for Virology, 17th Annual Meeting (Ванкувер, Канада, 1998), на ежегодных естественно-научных конференциях Университета Штата Невада, г. Рено (Лейк Тахо, США, 1999, 2000, 2002, 2006), Keystone Symposia (Cellular and Molecular Biology — Genetics, Pathogenesis and Ecology of Emerging Viral Diseases) (Таос, США, 2000), 8th International Cytomegalovirus Conference (Monterey, США, 2001), American Society for Virology, 20th Annual Meeting (Мэдисон, США, 2001), 27th International Herpesvirus Workshop (Cairns Convention Centre, Австралия, 2002), American Society for Virology, 22nd Annual Meeting, (Дэвис, США, 2003), American Society for Virology, 23rd

Annual Meeting, (Монреаль, Канада, 2004), 6th International Conference on HFRS, HPS and Hantaviruses (Сеул, Южная Корея, 2004), American Society for Microbiology Meeting: Viral Immune Evasion (Акапулько, Мексика, 2005), Всероссийской научно-практической конференции «Молодые учёные в медицине» (Казань, 2007, 2008, 2009), Международной конференции «Фундаментальные науки — медицине» (Новосибирск, 2007), Gene Therapy Symposium (Стамбул, Турция, 2007), итоговой конференции по результатам выполнения мероприятий за 2007 год в рамках приоритетного направления «Живые системы» ФЦП "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2012 годы" (Москва, 2007), 14th International Biomedical Science and Technology Symposium (Мугла, Турция, 2008), IV съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (Новосибирск, 2008), II Международной научно-практической конференции «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии» (Казань, 2008), 3rd International Congress of Molecular Medicine (Стамбул, Турция, 2009), 13th Annual Symposium for Biology Students of Europe «SymBioSE 2009» (пленарная лекция, секционный доклад, ведущий круглого стола) (Казань, 2009), International conference on nanomaterials and nanosystems (NanoMats 2009) (Стамбул, Турция, 2009), Международной научной конференции по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии, посвящённой 75-летию со дня рождения академика Юрия Анатольевича Овчинникова (Москва, 2009), Пятом съезде Вавиловского общества генетиков и селекционеров (Москва, 2009).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 48 печатных работ, в том числе 16 отечественных и зарубежных работ в ведущих рецензируемых научных журналах и изданиях, рекомендованных ВАК для защиты докторских диссертаций, 32 тезисов докладов на Международных и Всероссийских конференциях и конгрессах.

Место выполнения работы. Основные экспериментальные данные получены автором за время работы в лабораториях профессора Стива Ст. Джоура в Университете штата Невада, г. Рено, США (1996–2006), на кафедре генетики биолого-почвенного факультета Казанского государственного университета (2006–2010) и в Казанском государственном медицинском университете (2006–2010).

Структура и объём работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, 3 глав, заключения, выводов, приложения и списка литературы (302 ссылки). Работа содержит 62 рисунка и 25 таблиц.

ГЛАВА 1. Новый вектор на основе цитомегаловируса из *Peromyscus maniculatus* для видоспецифичной экспрессии рекомбинантных белков хантавирусов

1.1 Выделение и филогенетический анализ цитомегаловируса из *Peromyscus maniculatus* (PCMV)

Во время экспериментов по выделению эндогенных вирусов из тканей *Peromyscus maniculatus* с помощью эмбриональных клеток *P. maniculatus* (РМЕС), мы наблюдали характерные патологические изменения в клетках, напоминающие инфекцию цитомегаловирусами (McAllister, Filbert et al. 1967). При электронной микроскопии найдены вирусные капсиды, напоминающие капсиды группы герпесвирусов (Berezesky, Grimley et al. 1971).

Для подтверждения принадлежности выделенного вируса к CMV, мы провели анализ тотальной ДНК, выделенной из инфицированных клеток, на присутствие гомологов ДНК-полимеразы и гена *ul33* вируса HCMV. Эти гены были выбраны потому, что ген полимеразы высоко консервативен среди герпесвирусов (Chadwick, Yogev et al. 1989; Langan, Gautier et al. 1989; Pardee 1989; Capps and Zuniga 1990), и гомологичные формы гена *ul33* HCMV описаны у многих вирусов CMV. UL33 не участвует в вирусной репликации в культуре клеток (Hartwell and Weinert 1989; Taylor 1989), что позволяет встраивать рекомбинантные гены в этот регион.

Амплификацию фрагмента гена *p33* (аналог гена *ul33* цитомегаловируса человека) вируса PCMV провели методом обратной транскрипции с последующей ПЦР-амплификацией с использованием в качестве матрицы общей мРНК, выделенной из инфицированных клеток РМЕС. Продукты ПЦР-амплификации клонировали в вектор pGEM-T Easy (Promega) в соответствии с инструкциями производителя. Секвенирование фрагмента гена *p33* в полученной рекомбинантной плазмиде показало отсутствие интронной области.

Частичную нуклеотидную последовательность гена *p33* использовали для синтеза короткой 31-мерной пробы для скрининга серии плазмидных клонов геномной библиотеки вирусной ДНК. Нуклеотидная последовательность, полученная в результате секвенирования геномного фрагмента BamHI размером 3000 п.н., содержала последовательность гомолога гена *ul33* цитомегаловируса человека. Сиквенс показал высокую степень гомологии к гену *m33* вируса MCMV и гена *r33* цитомегаловируса крысы (RCMV). Известно, что *ul33* и *r33* не содержат интронов, тогда как гомолог вируса MCMV — *m33* содержит один интрон в кодирующей последовательности (Davis-Poynter, Lynch et al. 1997). Анализ первичной нуклеотидной последовательности гена *p33* показал его прерывистую структуру, что предполагает необходимость сплайсинга. Обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция (ОТ-ПЦР) проведена с использованием праймеров на противоположных концах предполагаемого

донорного и акцепторного сайтов. Эксперимент подтвердил присутствие интрона размером 85 п.н. в составе гена размером 1333 п.н., состоящего из двух экзонов размером 33 и 1215 п.н. Когда тотальную РНК из инфицированных клеток РМЕС использовали в качестве матрицы для ОТ-ПЦР, были выявлены две полосы на геле, соответствующие процессированной и непроцессированной копиям мРНК гена *p33*. Гены *m33*, *r33* и *ul33* гомологичны рецептору, сопряжённому с G-белком (гомологичность аминокислотной последовательности 62,5, 59,9 и 39,1% соответственно). Транскрипционный анализ в присутствии фосфоромуравьиной кислоты (PFA) в концентрации 50 мкг/мл показал ингибирование транскрипции гена *p33*, что подтверждает его принадлежность к поздним генам.

Фрагмент гена ДНК-полимеразы ПЦР-амплифицировали с применением прямого праймера 5'-C/G-CG-C/T-GGCGTG-A/T-T-A/G-TA-C/TGA-C/T-GG-3' и обратного праймера 5'-GATCTG-C/T-TG-T/G-CC-C/G-TCGAAGATGAC-3'. Нуклеотидную последовательность гена ДНК-полимеразы сравнили с соответствующими регионами описанных ранее ДНК-полимераз других видоспецифичных вирусов CMV. Как и ожидалось, открытая рамка считывания ДНК-полимеразы наиболее близко соответствовала уже описанным вирусам CMV грызунов; при этом ДНК-полимераза вируса MCMV показала наибольшую степень гомологии, в то время как второй по уровню гомологии была ДНК-полимераза вируса RCMV. Иные гомологи ДНК-полимеразы были сгруппированы в других кластерах: HCMV и вирус CMV макаки резус (RhCMV) в одной группе, а вирус CMV морской свинки и два других герпесвируса рода тупайи — в другой группе. Этот анализ и тот факт, что RCMV не реплицировался в клетках NIH 3T3, подтверждают, что RCMV — новый вирус CMV, гомологичный вирусам MCMV и RCMV.

1.2 Получение рекомбинантного цитомегаловируса для экспрессии гликопротеинов хантавирусов

Клонирование фрагмента геномной ДНК цитомегаловируса *Peromyscus maniculatus*, содержащего ген *p33*. Вирус RCMV выращивали на эмбриональных клетках *Peromyscus maniculatus* (РМЕС). Вирусные маточные растворы получены инфицированием клеток РМЕС в роллерных бутылках со средой Дульбекко (модифицированная Исковым — IMDM). Вирусный титр определяли методом бляшек. Выделенную геномную ДНК вируса RCMV гидролизировали с помощью эндонуклеазы рестрикции (рестриктазы) NotI и полученные фрагменты ДНК клонировали в плазмиду pET29c.

Нуклеотидная последовательность, полученная в результате секвенирования одного из концов продукта ПЦР-амплификации гена *p33*, использовали для синтеза 31-мерного праймера 5'-TGGGACGTCACCTGCGAATCTATCAACAACA-3'. В олигонуклеотид ввели концевую метку [γ -32P]АТФ (NEN Life Sciences) с помощью T4-полинуклеотидкиназы (Life Technologies). Скрининг NotI-геномной

библиотеки PCMV на наличие гена *p33* провели с помощью Саузерн-блоттинга. На основании автордиографических результатов Саузерн-блота установлено, что NotI-клон №121 содержит ген *p33* PCMV. Плазмидную ДНК NotI-клона №121 гидролизovali ферментом BamHI и после очистки BamHI-фрагмент размером 3 т.п.н. клонировали в линейный вектор pPUR (Clontech), что привело к созданию плазмиды pPUR3kb. Ген *p33* секвенировали с помощью специфичных праймеров, созданных на основе нуклеотидной последовательности ранее секвенированного ПЦР-фрагмента *p33*. Полное секвенирование всего гена *p33* было проведено методом праймерной «прогулки» в обоих направлениях.

Создание рекомбинантного цитомегаловируса *Peromyscus maniculatus* (PCMV ΔP33:G1EGFP). Несмотря на то, что гомологи гена цитомегаловируса человека *ul33* у цитомегаловирусов крысы (*r33*) и мыши (*m33*) не играют значимой роли при репликации вируса в культуре клеток, рекомбинантные RCMV и MCMV, у которых отсутствовал гомолог гена *ul33*, демонстрировали аттенуированный фенотип, что выражалось в понижении тропизма к слюнным железам (Davis-Poynter, Lynch et al. 1997) и повышенной на 50% LD50 (Beisser, Vink et al. 1998). Таким образом, мы выбрали ген *p33* для гомологичной замены на экспрессионную кассету, кодирующую химерный белок, состоящий из полного гена гликопротеина G1 хантавируса Sin Nombre (*snv-g1*) (плюс нуклеотидная последовательность, кодирующая первые 50 аминокислот гена G2) с *egfp* на С-конце. Для этого фрагмент М-сегмента вируса Sin Nombre (SNV) длиной 2116 нуклеотидов ПЦР-амплифицировали с помощью Pwo-полимеразы. Полученный фрагмент перекрывал кодирующую область *snv-g1* и часть *snv-g2*. Продукт ПЦР-амплификации клонировали в плазмиду pCRII (Invitrogen) с последующим субклонированием в экспрессионный плазмидный вектор pEGFP-N1-BHI (Clontech) с использованием сайтов рестрикции EcoRI, помещая ПЦР-фрагмент *snv-g1* с 5'-конца по отношению к гену *egfp* с сохранением открытой рамки считывания. Правильность сборки конструкции, начиная с транскрипционного старта и захватывая всю область генов *snv-g1* и *egfp*, подтверждена секвенированием. Уникальный рестрикционный сайт AseI в плазмиде pEGFP-N1G1 конвертировали в EcoRV расщеплением AseI, достраиванием липких концов фрагментом Клёнова и лигации EcoRV-линкера (5'-GGGATATCCC-3') в плазмиду.

Ген *p33* расположен в середине BamHI-фрагмента размером 3 т.п.н. в клоне №121 геномной библиотеки PCMV и содержит два удобных сайта XhoI, расположенных в 575 нуклеотидах друг от друга (со стартом трансляции в 378 нуклеотидов выше от первого сайта и стоп-кодоном в 376 нуклеотидах ниже второго сайта). Плазида pN1G1-fl получена вставкой XhoI-фрагмента, содержащего фланкирующие участки гена *p33*, в сайт EcoRV плазмиды pEGFP-N1G1.

Полученную плазмиду использовали для гомологичной рекомбинации с вирусом РСМВ дикого типа (wtPCMV). При этом XhoI-фрагмент гена *p33* размером 575 п.н. заменили с помощью гомологичной рекомбинации на экспрессионную кассету описанной выше плазмиды pN1G1-fl. Рекомбинантный вирус получили с помощью селекции в присутствии G418. Последующая очистка рекомбинантного вируса проведена с помощью флуоресцентно-активируемой клеточной сортировки (FACS) (Beckman Coulter). ПЦР-анализ места вставки показал отсутствие загрязнения препарата рекомбинантного вируса вирусом дикого типа. Саузерн-блот анализ с применением *p33*-специфичной пробы показал увеличения геномного фрагмента с 3 т.п.н. у wtPCMV до 10 т.п.н. у рекомбинантного РСМВ. Рекомбинантный РСМВ получил название РСМВ (Δ P33:G1EGFP).

1.3 Анализ вирусной инфекции рекомбинантным цитомегаловирусом *Peromyscus maniculatus* (PCMV Δ P33:G1EGFP) *in vitro*

Анализ экспрессии рекомбинантных белков. Клетки, инфицированные рекомбинантным РСМВ, экспрессировали улучшенный ген зелёного флуоресцентного белка (EGFP), что показано флуоресцентной микроскопией. Для того, чтобы показать экспрессию G1 в инфицированных клетках, мы провели иммуноцитохимическую реакцию с помощью АТ к SNV-G1. Иммуноцитохимический анализ клеток РМЕС, инфицированных РСМВ, выявил положительную реакцию с рекомбинантными АТ человека к SNV-G1. Белковые лизаты клеток РМЕС, инфицированные РСМВ (Δ P33:G1EGFP), анализировали с помощью вестерн-блоттинга и моноклональных АТ к GFP. Интересно, что вестерн-блот обнаружил выраженную полосу, соответствующую ожидаемой молекулярной массе EGFP (27 кДа). Полученная молекулярная масса белковой полосы была меньше, чем ожидаемая молекулярная масса химерного белка G1-EGFP (>106 кДа). Анализ экспрессии EGFP с помощью вестерн-блоттинга в клетках РМЕС, инфицированных рекомбинантным РСМВ, показал экспрессию низкомолекулярной формы EGFP через 72 часа после добавления вируса к клеткам. Анти-пептидные АТ к SNV-G1 выявили наличие белка размером 75 кДа на поздних сроках после инфицирования клеток. Экспрессионная кассета G1-EGFP находится под транскрипционным контролем непосредственно-раннего промотора HCMV, но экспрессия EGFP не установлена на ранних (до 48 часов) стадиях после инфицирования клеток.

Анализ репликации рекомбинантного цитомегаловируса. Накопление инфекционных вирусных частиц в культуральной среде определяли титрованием вируса методом бляшек. Результаты титрования вируса показывают, что wtPCMV присутствует в культуральной среде через 48 часов после инфицирования клеток. По мере протекания инфекции титр wtPCMV в культуральной среде возрастал и достигал $1,8 \times 10^8$ PFU/мл через 192 часа после инфицирования клеток. Присутствие рекомбинантного вируса

PCMV наблюдали в культуральной среде через 144 часа после инфицирования. Титр рекомбинантного PCMV в культуральной среде возрастал по мере протекания инфекции, достигая 6×10^8 PFU/мл через 192 часа после инфицирования клеток.

Количественный анализ репликации рекомбинантного PCMV ($\Delta P33:G1EGFP$) проводили с помощью ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Общую ДНК выделили из клеток РМЕС, инфицированных wtPCMV или рекомбинантным PCMV. ПЦР-РВ с применением TaqMan MGB-проб проводили для определения количества копий геномов PCMV в клетках. Количество копий гена интерферона INF- γ *P. maniculatus* использовали для определения числа копий клеточных геномов *Peromyscus* в образце. Ген 18S рибосомной РНК применяли в качестве внутреннего контроля для подтверждения точности количественного определения с помощью гена INF- γ *P. maniculatus*. Количество геномной ДНК wtPCMV и рекомбинантного PCMV в культуральной среде через час после инфицирования клеток (фоновый уровень) составил приблизительно 1×10^4 геномов/мл. Первоначальное увеличение количества геномной ДНК wtPCMV в культуральной среде наблюдали через 48 часов после инфицирования клеток, в то время как рекомбинантный PCMV показал увеличение количества геномной ДНК через 72 часа после инфицирования. Внутриклеточное количество ДНК wtPCMV и рекомбинантного PCMV достигало плато через 144 часа после инфицирования, а через 192 часа количество геномной ДНК PCMV в культуральной среде достигло $9,2 \times 10^6$ геномов/мл для wtPCMV и $4,2 \times 10^6$ геномов/мл для рекомбинантного PCMV. Анализ ПЦР-РВ внутриклеточной ДНК PCMV показал сравнимые концентрации wtPCMV и рекомбинантного PCMV через 1 час после инфицирования. Мы наблюдали снижение внутриклеточного количества ДНК wtPCMV и рекомбинантного PCMV в 10-15 раз через 24 часа после инфицирования. Количество ДНК внутриклеточного wtPCMV значительно возросло через 48 часов после инфицирования, в то время как увеличение количества ДНК рекомбинантного PCMV наблюдалось через 72 часа после инфицирования. Внутриклеточное количество ДНК wtPCMV в клетках РМЕС достигло плато при 447 вирусных генома на клеточный геном (или $1,4 \times 10^4$ геномов PCMV/нг тотальной ДНК) через 96 часов после инфицирования, тогда как количество рекомбинантного PCMV достигало плато при 491 вирусных генома на клеточный геном через 120 часов после инфицирования. Мы не наблюдали существенных различий во внутриклеточном количестве ДНК wtPCMV и рекомбинантного PCMV на поздних этапах инфекции. Нормализация результатов ПЦР-РВ по отношению к количеству копий генов INF- γ и 18S рибосомной РНК *P. maniculatus* показали сопоставимые между собой результаты.

1.4 Анализ инфицирования хомячков *Peromyscus maniculatus* рекомбинантным цитомегаловирусом (PCMV ΔP33:G1EGFP)

Инфицирование хомячков рекомбинантным цитомегаловирусом *Peromyscus maniculatus* (PCMV ΔP33:G1EGFP): эксперимент 1.

Эксперименты на животных проводили в соответствии с разрешением этического комитета Университета штата Невада, г. Рино, США. Оленьи хомячки *Peromyscus maniculatus sonoriensis* (в возрасте 6–7,5 месяцев) приобретены в виварии Университета Штата Южная Каролина. Для того, чтобы определить, может ли рекомбинантный вирус PCMV (ΔP33:G1EGFP) инфицировать хомячков *P. maniculatus* и вызывать иммунный ответ к SNV-G1 и EGFP, двум группам хомячков сделали внутрибрюшинные инъекции 10 колониеобразующих единиц (PFU) wtPCMV (8 хомячков), либо 10 PFU рекомбинантного PCMV (ΔP33:G1EGFP) (8 хомячков). Через год 3 хомячкам из wtPCMV-инфицированной группы и 6 хомячкам из PCMV (ΔP33:G1EGFP)-инфицированной группы сделали повторную инъекцию 10 000 PFU PCMV (ΔP33:G1EGFP). У хомячков производили систематический отбор крови для определения серологического статуса методом иммуноферментного анализа (ИФА). Рисунок 1 демонстрирует ранний иммунный ответ (15 дней после инфицирования) к PCMV и EGFP у хомячков, инфицированных рекомбинантным вирусом PCMV. Через 4 недели после инфицирования рекомбинантным PCMV хомячки показали слабый, но статистически достоверный ($p=0,018$) иммунный ответ к PCMV, ответ увеличивался на протяжении 12 месяцев. Реинфицирование хомячков, предварительно инфицированных рекомбинантным PCMV, новой дозой рекомбинантного PCMV, привела к значительному увеличению титра АТ к PCMV- и SNV-антигенам. Можно предположить, что уровень экспрессии G1 рекомбинантным вирусом достаточен для индукции гуморального иммунного ответа. Кроме того, введение хомячкам, предварительно инфицированных wtPCMV, рекомбинантного PCMV привела к значительному содержанию АТ к SNV ($p=0,003$).

Инфицирование хомячков рекомбинантным цитомегаловирусом *Peromyscus maniculatus* (PCMV ΔP33:G1EGFP): эксперимент 2.

Хомячкам *P. maniculatus* делали внутрибрюшинные инъекции 5500 PFU wtPCMV (18 хомячков) или рекомбинантного PCMV (10 хомячков). Повторное инфицирование тем же количеством вируса провели через 130 дней после первичного инфицирования. Группа животных, инфицированных только wtPCMV, состояла из 7 особей, рекомбинантным PCMV — 10 особей, и группа животных, одновременно инфицированная вирусами wtPCMV и рекомбинантным PCMV, — 11 особей. При этом 11 из 18 хомячков, первоначально инфицированных wtPCMV, реинфицировали рекомбинантным PCMV. Образцы крови инфицированных хомячков получены из ретроорбитального венозного синуса. Все животные были ИФА-серонегативны по PCMV перед проведением экспериментов.

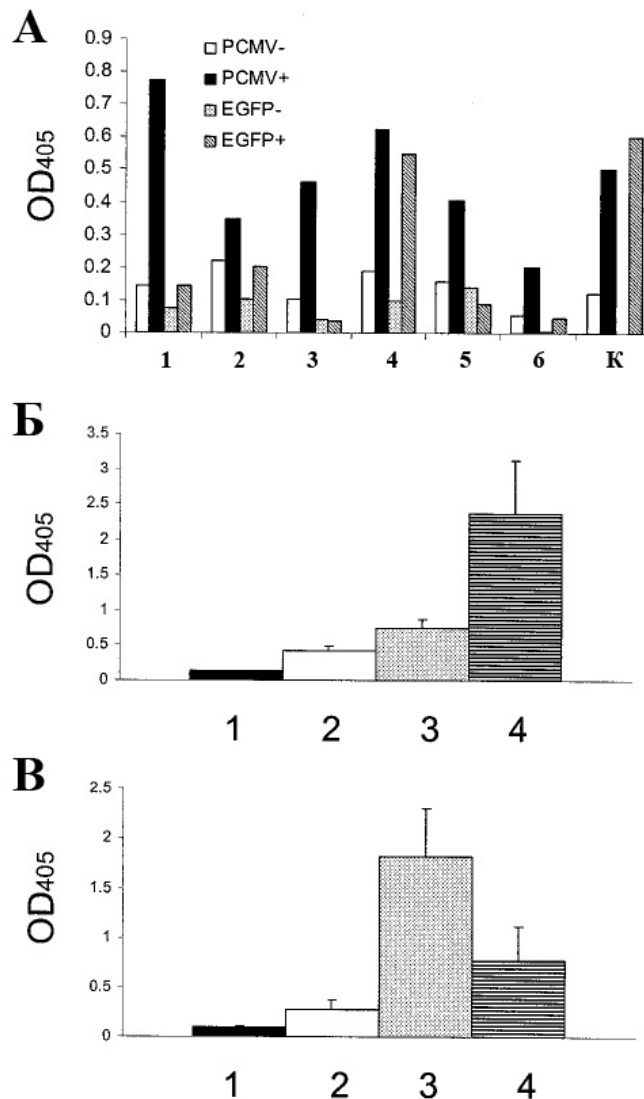


Рис. 1. Титр антител против вирусных и рекомбинантных антигенов у инфицированных цитомегаловирусами хомячков *Peromyscus maniculatus*. Панель А. Титр АТ к РСМВ и EGFP у 6 хомячков, 15 дней после инфицирования рекомбинантным РСМВ ($\Delta P33:G1EGFP$). Группы столбцов от 1 до 6 — сыворотка крови индивидуальных животных. **К** — контроль, моноклональные АТ к GFP и смесь сывороток инфицированных в естественных условиях диких хомячков. **Панель Б.** Титр АТ к РСМВ-антигенам. **1** — неинфицированный контроль (n=3); **2** — 4 недели после инфицирования рекомбинантным РСМВ (n=8); **3** — 12 недель после инфицирования рекомбинантным РСМВ (n=6); **4** — 12 недель после инфицирования wtРСМВ (n=5). **Панель В.** Титр АТ к SNV-G1. Разведение сывороток крови хомячков 1:100. **1** — неинфицированный контроль (n=3); **2** — 12 недель после инфицирования рекомбинантным РСМВ (n=6); **3** — 3 недели после инфицирования рекомбинантным РСМВ и реинфицирования рекомбинантным РСМВ (n=6); **4** — 3 недели после инфицирования wtРСМВ и реинфицирования рекомбинантным РСМВ (n=3).

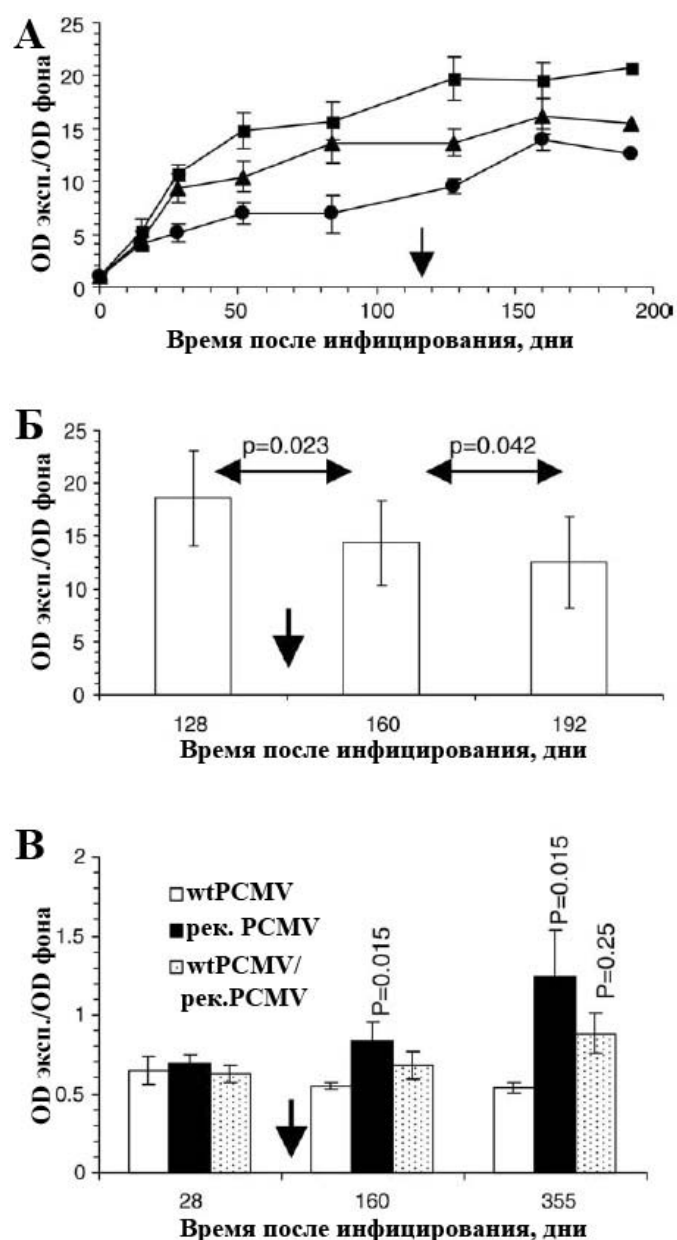


Рис. 2. Иммуноферментный анализ титра антител против рекомбинантных белков у хомячков, инфицированных цитомегаловирусом *Peromyscus maniculatus*. Стрелкой отмечено повторное инфицирование через 131 день после первичного. **Панель А.** Титр АТ к РСМВ у инфицированных хомячков. ■ — wtPCMV (n=7); ● — рекомбинантный РСМВ (n=10); ▲ — животные, инфицированные wtPCMV и реинфицированные рекомбинантным РСМВ. **Панель Б.** Титр АТ к EGFP у хомячков, инфицированных рекомбинантным РСМВ. Р-значения даны для изменения титра АТ к EGFP между 128-160, и между 160- 192 днями после инфицирования. **Панель В.** Титр АТ к SNV-G1 у хомячков, инфицированных wtPCMV (n=7), рекомбинантным РСМВ (n=8) или wtPCMV с реинфицированием рекомбинантным РСМВ (n=11). Р-значения даны для изменения титра АТ к SNV-G1 по отношению к соответствующему wtPCMV контролю.

Для исследования иммунного ответа у *P. maniculatus*, инфицированных wtPCMV или рекомбинантным PCMV, мы применили ИФА с антигенами PCMV, EGFP и SNV. АТ к PCMV обнаружены у хомячков, инфицированных как wtPCMV, так и рекомбинантным PCMV (Рис. 2). Кроме того, АТ к EGFP обнаружены у 7 из 10 животных, инфицированных рекомбинантным PCMV через 128 дней после инфицирования. Реинфицирование этих животных рекомбинантным PCMV не привело к увеличению титра АТ к EGFP в сыворотке крови. Наоборот, титр АТ к EGFP уменьшался со временем.

Животные, первоначально инфицированные wtPCMV, но не инфицированные рекомбинантным PCMV, не показали наличия АТ к EGFP. Анализ титра специфичных АТ к SNV-G1 в сыворотке проводили через 28, 160 и 355 дней после инфицирования. ИФА не обнаружил присутствия АТ к SNV-G1 через 28 дней после инфицирования рекомбинантным PCMV, но мы наблюдали значительное увеличение титра АТ к SNV-G1 в сыворотке через 160 и 355 дней после инфицирования по сравнению с контролем (через 160 дней после инфицирования $p=0,0015$; через 355 дней $p=0,015$). Интересно, что животные, первоначально инфицированные wtPCMV и реинфицированные рекомбинантным PCMV, показали наличие АТ к SNV-G1, что свидетельствует о том, что предварительная инфекция wtPCMV не предотвратила реинфицирования рекомбинантным вирусом (Рис. 2).

Другой показатель вирусной инфекции — накопление вирусного генетического материала в различных органах хозяина. Общую ДНК из разных органов хомячков (4 особи из каждой группы) выделили через 355 дней после инфицирования. Количественный анализ вирусной ДНК проводили методом ПЦР-РВ. Статистически достоверных различий количества вирусной ДНК в разных органах хомячков, инфицированных wtPCMV или рекомбинантным PCMV, не выявлено. Исключением стало повышение количества вирусной ДНК в сердечной ткани у животных, инфицированных рекомбинантным PCMV ($p=0,04$), и более высокое количество вирусной ДНК в селезёнке животных, инфицированных wtPCMV ($p=0,05$).

Реактивация латентного вируса *Peromyscus maniculatus*. Важным признаком цитомегаловирусов служит их способность к установлению латентной инфекции. Иммуносупрессия зачастую вызывает реактивацию CMV, что может привести к серьёзным последствиям у пациентов с ослабленной иммунной системой (Peschman 1991). Чтобы определить, может ли проходить реактивация рекомбинантного PCMV у латентно инфицированных животных, мы подвергли хомячков (3 особи) сублетальному гамма-облучению (Geginat, Ruppert et al. 1997). Тотальную ДНК из образцов крови до и через 12 дней после облучения анализировали с помощью ПЦР-РВ. Все 3 хомячка (одна особь, первоначально инфицированная wtPCMV и реинфицированная рекомбинантным PCMV, и

две особи, инфицированные рекомбинантным РСМВ) показали значительное увеличение (в 6–68 раз) количества вирусной ДНК в крови после облучения.

1.5 Обсуждение

В данной работе мы описываем новооткрытый цитомегаловирус (СМВ) из *P. maniculatus*. Вирус классифицирован как СМВ на основании следующих критериев: (i) цитопатология, типичная для СМВ; (ii) электронная микроскопия, характерная для СМВ; (iii) ДНК-полимераза и ген *ul33* гомологичны МСМВ; (iv) репликация вируса проходит исключительно в клетках, выделенных из *P. maniculatus*. Филогенетический анализ показал принадлежность данного вируса к группе, включающей МСМВ и РСМВ. ДНК-полимераза гомологична по аминокислотной последовательности на 60,2% и 56,9% соответствующим регионам ДНК-полимераз МСМВ и РСМВ.

Эволюционное родство РСМВ с МСМВ подтверждает наличие 85-нуклеотидного интрона, разделяющего 5'-конец кодирующей области первого экзона от 1215-нуклеотидного второго экзона, в гене *p33* (гомолог гена *ul33* вируса СМВ человека). Для гена *m33* сайт сплайсинга описан в той же позиции. Подобную структуру гена не описана у РСМВ (ген *r33*) и НСМВ (ген *ul33*), для которых характерна безинтронная структура генов. Ген *p33* принадлежит к группе настоящих поздних генов, отличительная особенность которых – отсутствие транскрипции в присутствии РФА (ингибитора репликации вирусной ДНК, блокирующего экспрессию ICP36) (Everett and Dunlop 1984). Несмотря на то, что эти гомологи сопряжённого с G-белком рецептора не критичны для вирусной репликации в культуре клеток, они явно играют ключевую роль в патогенезе вируса, что видно из уменьшения тропизма к слюнным железам (Davis-Poynter, Lynch et al. 1997; Beisser, Vink et al. 1998) и увеличения на 50% LD50 вирусов СМВ, дефектных по *ul33*.

Рекомбинантный вирус РСМВ получен путём вставки экспрессионной кассеты, содержащей ген химерного белка SNV-G1 и EGFP, в ген *p33*. Химерный белок создан таким образом, что он сохраняет сайт расщепления G1-G2 между кодирующими регионами генов G1 и *egfp*. Подобный подход применён для достижения экспрессии G1 в его нативной форме, что может быть важным фактором для получения адекватного иммунного ответа против G1, в тоже время позволяя проводить детекцию белка EGFP для наблюдения за экспрессией рекомбинантных белков и селекции рекомбинантного вируса. Экспрессия EGFP подтверждена с помощью флуоресцентной микроскопии. Иммуноцитохимический анализ с применением специфичных рекомбинантных АТ человека к SNV-G1 подтвердил экспрессию SNV-G1 в клетках РМЕС, инфицированных рекомбинантным РСМВ. Анализ лизатов инфицированных клеток методом вестерн-блотинга показал присутствие на ранних стадиях инфекции значительного количества белка с молекулярной массой 27 кДа, что соответствует мономерному EGFP. Вестерн-блотинг тех

же образцов с использованием анти-пептидных АТ к SNV-G1 показал наличие белка G1 (75 кДа) на более поздних стадиях инфекции. Эти результаты подтверждают экспрессию и расщепление G1 и EGFP в результате процессинга пребелковой формы. Эффективная экспрессия G1-EGFP-кассеты происходила только на поздних этапах инфекции, что также наблюдалось при экспрессии EGFP-G1 с плазмиды при транзиторийной трансфекции. Несмотря на то, что промотор HCMV принадлежит к группе непосредственно-ранних промоторов, этот процесс происходит в контексте жизненного цикла CMV и его позиции в вирусной ДНК. Вероятно, когда промотор присутствует в геноме PCMV и клетках из *P. maniculatus*, его временная регуляция претерпевает изменение. Экспрессия белков G1 и EGFP происходит в виде независимых полипептидных цепей, при этом в инфицированных клетках не обнаружен химерный белок G1-EGFP. Это свидетельствует об эффективном процессинге пребелка, скорее всего в районе сайта расщепления между G1 и G2 в гликопротеине SNV, сохранённым в химерной конструкции G1-EGFP.

Для инфицирования *P. maniculatus* вирусом PCMV ($\Delta P33$:G1EGFP) было достаточно внутрибрюшинного введения 10 PFU вируса на животное. Когда хомячков инфицировали рекомбинантным вирусом, мы наблюдали иммунный гуморальный ответ на SNV-G1 и EGFP, что служит доказательством того, что экспрессируемые формы G1 и EGFP способны вызывать иммунный ответ с образованием АТ, реагирующих с SNV-G1 и EGFP в инфицированных клеточных лизатах Vero-E6 (Рис. 1). Интересно, что существующий иммунный ответ против wtPCMV не мешает индукции иммунного ответа против рекомбинантного белка, экспрессируемого с рекомбинантного вектора.

Данные наблюдения согласуются с исследованиями, показывающими возможность одновременного инфицирования диких мышей множественными штаммами MCMV (Moro, Lloyd et al. 1999). Подобное не наблюдают при HCMV-инфекции у людей. Показано, что предварительное инфицирование здоровых людей вирусом HCMV дикого типа или вакцинным штаммом вызывает, по крайней мере частичную, защиту от последующих инфекций (Adler, Hempfling et al. 1998; Plotkin 1999; Plotkin 1999). Полученные нами данные демонстрируют преимущество системы на основе цитомегаловируса *P. maniculatus*, для которого иммунный ответ против вирусного вектора скорее всего не повлияет на эффективность экспрессии трансгена *in vivo* при многократном введении в организм, что происходит у других часто используемых вирусных систем генной доставки (Engelhardt, Litzky et al. 1994; Smith, White et al. 1996). Тот факт, что титр АТ у хомячков, инфицированных wtPCMV, выше, чем у животных, инфицированных рекомбинантным PCMV, можно объяснить тем, что последний имеет аттенуированный фенотип. По-видимому, делеция гена *p33* и вставка экспрессионной кассеты G1-EGFP приводит к аттенуации

рекомбинантного РСМV. Несмотря на аттенуацию, вирус был способен инфицировать хомячков при малых дозах порядка 10 PFU на животное. Однако, иммунный ответ против РСМV у хомячков, инфицированных рекомбинантным РСМV, был ниже, чем у животных, инфицированных wtРСМV.

Наши эксперименты показали, что РСМV не приводит к выраженной патологии у инфицированных животных и, по всей видимости, не оказывает эффекта на продолжительность их жизни, так как животные, инфицированные wtРСМV или рекомбинантным РСМV, выживали более 12 месяцев после инфицирования. Дальнейшие эксперименты определили характер распределения рекомбинантного РСМV и wtРСМV в различных тканях инфицированных хомячков *P. maniculatus*. Мы подтвердили, что иммунный ответ против рекомбинантного РСМV не так сильно выражен, как против wtРСМV. Мы провели дополнительные эксперименты по изучению аттенуации рекомбинантного вируса. Накопление внутриклеточной ДНК РСМV, а также накопление инфекционных вирусных частиц и накопление ДНК рекомбинантного РСМV в культуральной среде шли с задержкой по сравнению с wtРСМV. Эти данные свидетельствуют о том, что рекомбинантный РСМV имеет замедленный репликационный цикл по сравнению с wtРСМV. Однако, несмотря на более медленную репликацию рекомбинантного РСМV, он достигал приблизительно одинакового плато количества внутриклеточной вирусной ДНК на поздних этапах инфекции.

Механизмы аттенуации вирусной репликации могут иметь мультифакторную основу. Ген *p33* — гомолог гена *ul33* HCMV, следовательно — гомолог сопряжённых с G-белком рецепторов. Ранее было показано, что этот ген не участвует в вирусной репликации в культуре клеток, но может играть важную роль в тропизме вируса к слюнным железам (Davis-Poynter, Lynch et al. 1997; Beisser, Vink et al. 1998). Недавно была предложена гипотеза, что белок M33 HCMV может играть роль в раннем репрограммировании клеток хозяина для поддержания CMV-репликации во время вирусной инфекции (Waldhoer, Kledal et al. 2002). Одним из возможных функциональных гомологов P33 служит белок US28 HCMV — трансмембранный рецептор, сопряжённый с G-белком. Было показано, что US28 играет роль в слиянии клеток, демонстрируя свою потенциальную важность в межклеточном распространении CMV (Pleskoff, Treboute et al. 1998). Делеция гена *p33* может привести к нарушению межклеточного распространения РСМV, приводя в конечном итоге к развитию более медленно прогрессирующей инфекции. Дополнительным фактором, оказывающим негативное влияние на вирусную репликацию, служит присутствие экспрессионной кассеты SNV-G1-EGFP, конститутивно экспрессирующей рекомбинантные белки под контролем сильного промотора цитомегаловируса человека.

Для определения эффективности использования РСМВ в качестве экспрессионного вектора, мы изучили иммунный ответ против РСМВ и рекомбинантных антигенов у оленьих хомячков. Животные, инфицированные wtРСМВ или рекомбинантным РСМВ, демонстрировали иммунный ответ против антигенов РСМВ уже через 2 недели после первоначального инфицирования (Рис. 2). Титр АТ против wtРСМВ и рекомбинантного РСМВ продолжал расти по мере развития инфекции. Реинфицирование хомячков соответствующим вирусом привело к увеличению титра АТ к РСМВ у животных, инфицированных рекомбинантным РСМВ ($p=0,041$), но это не влияло на титр АТ к РСМВ у хомячков, инфицированных wtРСМВ, что можно объяснить тем, что высокий титр АТ к РСМВ у инфицированных wtРСМВ животных предотвращал дополнительную репликацию вируса. Хотя мы наблюдали статистически значимое увеличение титра АТ к РСМВ у хомячков, инфицированных рекомбинантным РСМВ, после реинфицирования, это обстоятельство можно также объяснить продолжением развития иммунного ответа на первоначальное инфицирование wtРСМВ. При этом рекомбинантный РСМВ имеет аттенуированный фенотип, что может приводить к менее выраженному иммунному ответу против РСМВ-антигенов. Отличие в иммунном ответе между EGFP и SNV-G1 можно объяснить различной иммуногенностью этих белков и более высоким уровнем экспрессии EGFP.

Наши данные свидетельствуют о том, что цитомегаловирус *P. maniculatus* – эффективный метод доставки рекомбинантных генов с целью иммунизации организма хозяина. Несмотря на обнадеживающие результаты, необходимы дополнительные исследования для определения эффективности вектора на основе РСМВ в защите *P. maniculatus* от инфицирования патогенным SNV. В настоящее время мало что известно о значимости гуморального или клеточного иммунных ответов в защите от SNV-инфекции. Кроме того, неизвестна роль белков G1, G2 и нуклеокапсидного белка в создании иммунитета против SNV. Информация, полученная ранее в нашей лаборатории, показывает, что материнские АТ могут защищать молодняк *P. maniculatus* при инфицировании вирусом SNV (Borucki, Boone et al. 2000).

Известно, что слюнные железы выступают органом-мишенью для репликации цитомегаловируса мыши (MCMV) (Cheung and Lang 1977; Mims and Gould 1979). Вирус можно обнаружить в слюнных железах животных на протяжении первых 3 месяцев после инфицирования. В крови, селезёнке, лёгких и костном мозге локализация вируса происходит в течение первых нескольких недель после инфицирования. Исследование по персистенции вируса и определению количества вируса в различных органах было в основном ограничено ко-инкубацией суспензии органов с культурами клеток.

Наши результаты показывают, что wtPCMV и рекомбинантный PCMV присутствуют в относительно малых количествах во всех исследованных органах (за исключением крови и мозга). Наибольшие отличия в количестве wtPCMV от рекомбинантного PCMV выявлены в сердце (повышенный уровень рекомбинантного PCMV), в почках и селезёнке (повышенный уровень wtPCMV). Только следовые количества геномов PCMV обнаружены в слюнных железах. Предварительные результаты, полученные с использованием 2 хомячков на сроках 3 и 4 недели после инфицирования wtPCMV, показывают присутствие высокого количества PCMV в слюнных железах, в то время как вирус не обнаруживали у хомячков спустя 3 месяца после инфицирования рекомбинантным PCMV. Наши результаты согласуются с сообщениями о том, что MCMV присутствует в высоких концентрациях в слюнных железах только на ранних стадиях инфекции и не обнаруживается через несколько месяцев после инфицирования (Mims and Gould 1979), а делеция гена *m33* вируса MCMV снижает тропизм MCMV к слюнным железам (Davis-Poynter, Lynch et al. 1997).

Известно, что MCMV может устанавливать латентную инфекцию у мышей (Reddehase, Podlech et al. 2002). В ответ на определённые раздражители может происходить реактивация вируса. Генотоксичный стресс в результате гамма-облучения — один из методов исследования латентности у мышей (Baltesen, Messerle et al. 1993). Мы решили применить гамма-облучение для определения возможной реактивации PCMV у латентно-инфицированных хомячков *P. maniculatus*. Мы наблюдали значительное увеличение количества вируса в крови облучённых (4,12 Gy) животных, одновременно инфицированных вирусами wtPCMV и рекомбинантным PCMV или инфицированных только рекомбинантным PCMV. Эти наблюдения подтверждают предположение о том, что PCMV способен устанавливать латентную инфекцию у *P. maniculatus* наподобие латентной инфекции MCMV у мышей, и что делеция гена *p33* вируса PCMV не влияет на способность устанавливать латентную инфекцию с последующей реактивацией после генотоксического стресса организма хозяина.

Итак, в ходе работы из хомячков *P. maniculatus* выделен новый цитомегаловирус, получивший обозначение PCMV. Проведён морфологический и молекулярно-генетический анализ PCMV. Молекулярно-генетическими методами создан рекомбинантный PCMV, экспрессирующий рекомбинантные белки SNV-G1 и EGFP. Полученные результаты свидетельствуют о том, что wtPCMV и рекомбинантный PCMV устанавливают латентную инфекцию у *P. maniculatus*. Рекомбинантный PCMV имеет аттенуированный фенотип в культуре клеток и вызывает более слабый иммунный ответ против PCMV-антигенов у хомячков по сравнению с wtPCMV. Однако мы не наблюдали статистически достоверных различий в

титре или количестве геномной ДНК вируса между wtPCMV и рекомбинантным PCMV у персистентно инфицированных животных. Нами показано, что гамма-облучение хомячков, инфицированных PCMV, приводило к реактивации рекомбинантного PCMV у персистентно инфицированных хомячков. Инфицирование рекомбинантным PCMV приводило к сильному иммунному ответу против рекомбинантных белков EGFP и SNV-G1. Предварительный иммунный ответ против wtPCMV не предотвращал реинфицирование хомячков рекомбинантным PCMV и приводил к иммунному ответу против SNV-G1, что показывает перспективность применения векторов на основе PCMV для создания видоспецифичных генетических вакцин.

ГЛАВА 2. Особенности локализации и взаимодействия рекомбинантных гликопротеинов хантавирусов

Создание рекомбинантных плазмид для экспрессии гликопротеинов хантавирусов. Гены гликопротеинов G1 и G2 хантавирусов Andes (ANDV) и Sin Nombre (SNV) амплифицировали методом ОТ-ПЦР и клонировали в плазмиду pcDNA3 (Invitrogen) с помощью специфичных праймеров. Открытая рамка считывания (ORF) сегмента М вируса ANDV получена асимметричным ПЦР из независимо клонированных генов G1 и G2 и клонирована в плазмиду pcDNA3. Далее гены гликопротеинов субклонировали в экспрессионный вектор pTM-1 (Fuerst, Niles, Studier and Moss, 1986). В результате были получены плазмиды pTM-1-AndG1, pTM-1-AndG2, pTM-1-SNVG1, pTM-1-SNVG2 и pTM1-AndM. Также была создана плазида pTM-1-SNVG1tr, кодирующая урезанную форму гликопротеина SNV-G1 без цитоплазматического хвоста. Анализ полученных плазмид проводили методами рестрикционного анализа и ДНК-секвенирования.

Локализация хантавирусных гликопротеинов при независимой экспрессии. Первый этап работы был направлен на выяснение возможности независимой экспрессии гликопротеинов G1 и G2 с применением вектора pTM1 (Fuerst, Niles et al. 1986). Клетки CV-1 инфицировали рекомбинантным вирусом вакцинии vTF7-3 и трансфицировали плазмидами pTM-1, экспрессирующими гликопротеины G1 или G2. В установленное время клетки собирали, ресуспензировали в буфере для нанесения проб в системе Лэмли и наносили на 10% SDS-PAGE. Анализ экспрессии проводили методом вестерн-блоттинга с применением специфичных АТ. Полученные данные показывает экспрессию SNV-G2 в клетках через 6, 12, 24 и 48 часов после трансфекции. Рекомбинантный SNV-G2 мигрирует в геле так же, как и нативный белок в инфицированных SNV клетках Vero-E6. Неинфицированные и инфицированные только вирусом vTF7-3 клетки CV-1 применяли в качестве отрицательного контроля. Показана экспрессия усечённого белка SNV-G1tr, лишённого трансмембранного и цитоплазматического доменов, которые, как считалось, содержат сигнал

транспорта комплекса G1/G2 в аппарат Гольджи (АГ). АТ к SNV-G1 окрашивали 2 полосы с различными молекулярными массами. Похожую картину наблюдали ранее и для других хантавирусов (Spiroroulou 2001). Гликопротеин G1 содержит 3 потенциальных сайта гликозилирования. Для подтверждения того, что две полосы соответствуют различным гликозилированным формам SNV-G1, клетки обработали различными концентрациями тунакомицина перед трансдукцией и трансфекцией плазмидой pTM1-SNV-G1tr. Согласно вестерн-блоттингу, негликозилированная форма SNVG1Tr имеет меньшую молекулярную массу (49 кДа) в отличие от гликозилированной формы (57 кДа).

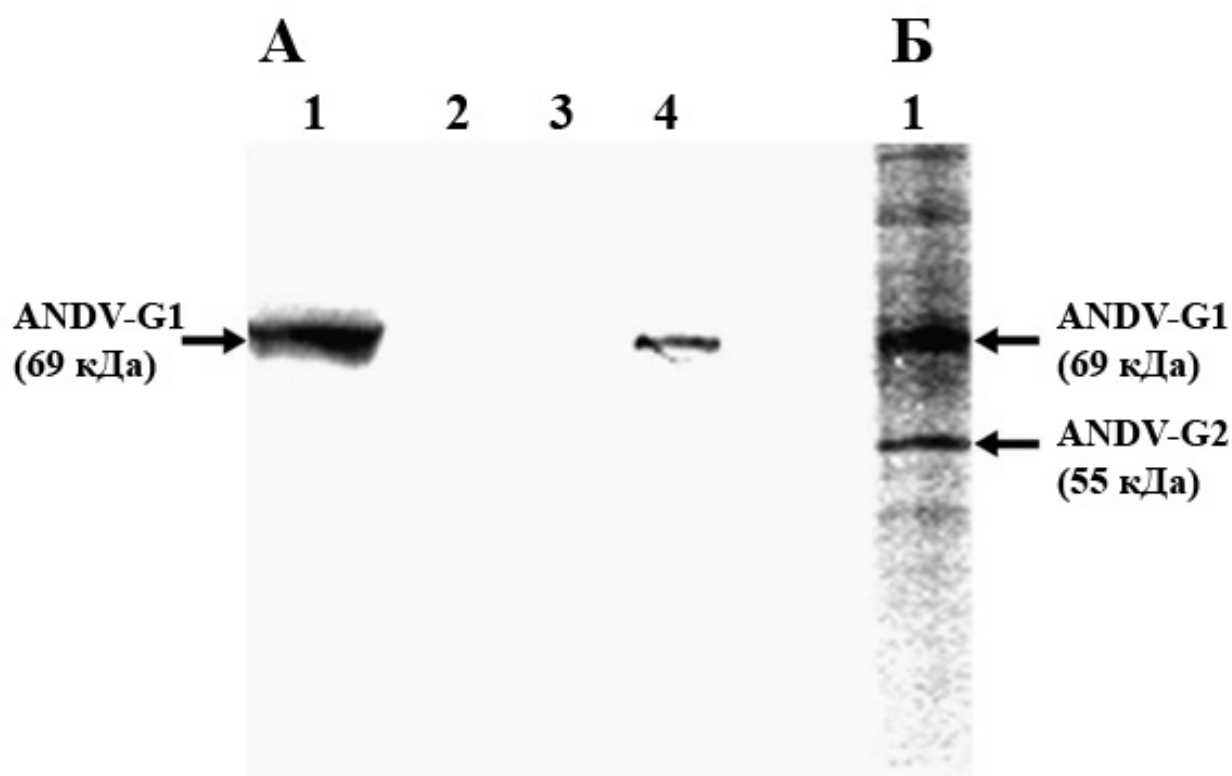


Рис. 3. Ко-иммунопреципитация гликопротеинов хантавирусов. Клетки Vero-E6 инфицировали вирусом вакцинии vTF7-3 и трансфицировали плазмидами pTM1, экспрессирующими ANDV-G1 и SNV-G2. Клеточные лизаты использовали для иммунопреципитации с помощью анти-пептидных АТ кролика к SNV-G2, мембраны инкубировали с моноклональными АТ мыши к ANDV-G1. **Панель А.** 1 — ANDV-G1 и SNV-G2 ко-трансфицированные клетки; 2 — клетки, инфицированные только вирусом вакцинии vTF7-3; 3 — клетки, трансфецированные плазмидой pTM1, не кодирующей рекомбинантных белков; 4 — клеточные иммунопреципитаты с помощью АТ кролика к ANDV-G2 и визуализированными на мембране моноклональными АТ к ANDV-G1. **Панель Б.** Авторадиография иммунопреципитата с помощью моноклональных АТ мыши к ANDV-G1 из лизата радиоактивно меченых клеток, инфицированных ANDV.

Чтобы показать, что G1 и G2 из двух различных штаммов хантавирусов обладают нативной конформацией и взаимодействуют друг с другом при ко-экспрессии, мы провели эксперименты по ко-иммунопреципитации гликопротеинов. Результаты иммунопреципитации и вестерн-блоттинга показывают прочные взаимодействия между молекулами гликопротеинов из различных вирусов (Рис. 3).

Клеточная локализация гликопротеинов G1 и G2 хантавирусов при независимой экспрессии и ко-экспрессии. Мы исследовали внутриклеточную локализацию гликопротеинов ANDV и SNV с применением маркера АГ — зоны Гольджи, и маркера ЭР — кальнексина. Иммунофлуоресцентный анализ показал, что при независимой экспрессии локализация G1 и G2 происходит не в АГ, а преимущественно в ЭР. При ко-экспрессии гликопротеинов с применением двух плазмид или плазмиды, экспрессирующей GPC, локализация гликопротеинов происходит в АГ. Аналогичную картину наблюдали и для внутриклеточной локализации гликопротеинов SNV. Полученные данные свидетельствуют о том, что транспорт и локализация гликопротеинов ANDV происходят по аналогии с вирусами HNTV и SNV и что экспрессия обоих гликопротеинов необходима для их правильной транспортировки в АГ (Pensiero, Jennings et al. 1988; Pensiero and Hay 1992).

Ко-экспрессия гликопротеинов хантавирусов. Предыдущие результаты показывают, что для правильного транспорта хантавирусных гликопротеинов и для формирования гетеродимера необходимы их одновременная экспрессия и функциональное взаимодействие. Таким образом, у нас появился инструмент, позволяющий оценить взаимодействие гликопротеинов из различных хантавирусов. Мы провели ко-трансфекцию плазмид, экспрессирующих гликопротеины SNV-G1+ANDV-G2 и ANDV-G1+SNV-G2. Аминокислотная гомология гликопротеинов G1 вирусов ANDV и SNV составляет 72%, а гликопротеинов G2 — 85%. На рисунке 4 показаны результаты иммуногистохимического анализа внутриклеточной локализации гликопротеинов из различных хантавирусов при их ко-экспрессии. На рисунке видно, что обе комбинации гликопротеинов приводят к правильной внутриклеточной локализации, а именно — в АГ. Полученные данные подтверждают ранее высказанные предположения Shi and Elliott и Spiropoulou et al., что сигнал локализации хантавирусных гликопротеинов в АГ, скорее всего, носит конформационный характер и строго не зависит от специфичной аминокислотной последовательности (Shi and Elliott 2002; Spiropoulou, Goldsmith et al. 2003).

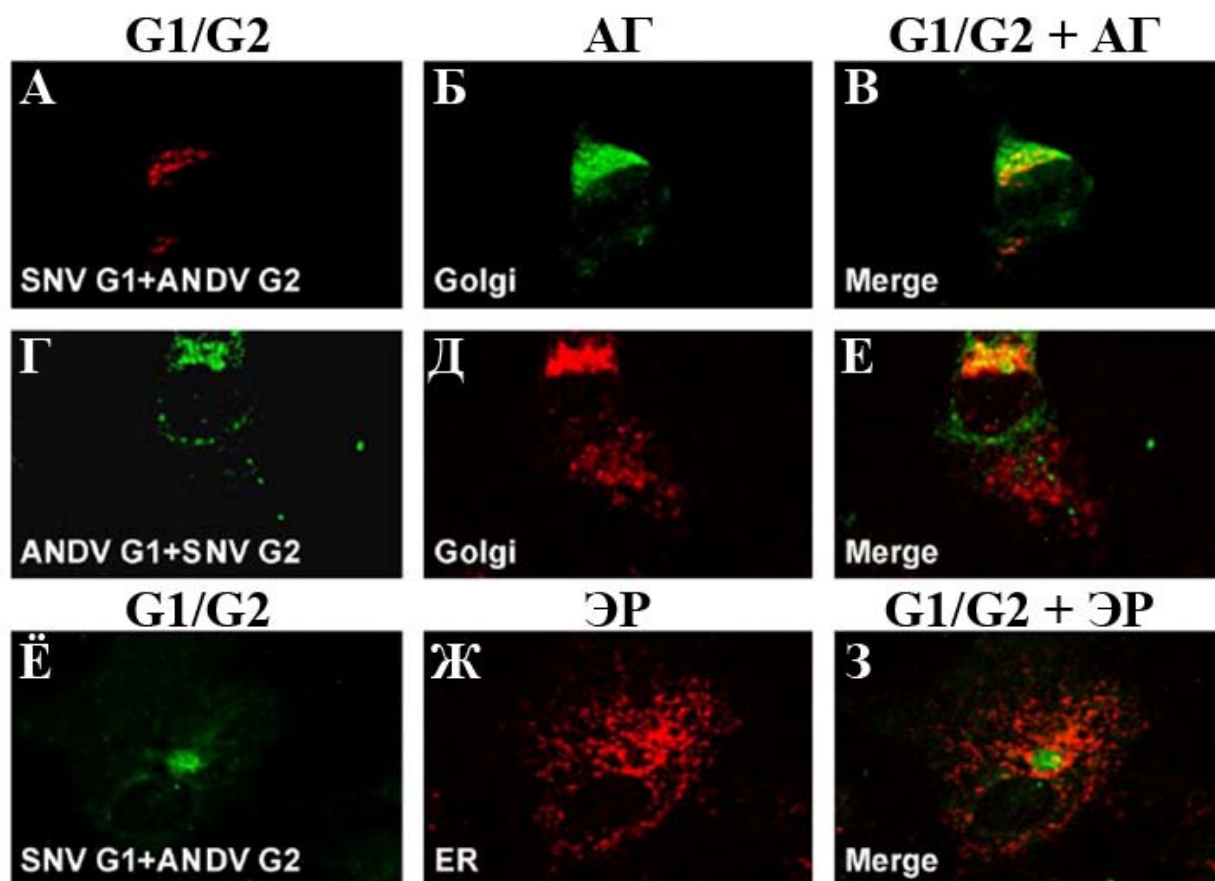


Рис. 4. Ко-экспрессия и внутриклеточная локализация рекомбинантных белков разных хантавирусов. Гликопротеины хантавирусов окрашены зелёным, специфичные антигены АГ и ЭР — красным цветом. Ряды АБВ, ЁЖЗ — клетки, ко-трансфицированные плазмидами рТМ1-SNV-G1 и рТМ1-ANDV-G2. Ряд ГДЕ — клетки, ко-трансфицированные плазмидами рТМ1-ANDV-G1 и рТМ1-SNV-G2.

Обсуждение. Цель работы — исследование процессирования и транспорта гликопротеинов хантавирусов Нового Света. Также проведено исследование взаимодействия гликопротеинов G1 и G2 и роль конформационных взаимодействий при их транспортировке в АГ. В работе применяли гликопротеины G1 и G2 двух различных хантавирусов для доказательства гипотезы, что транспорт комплекса G1/G2 из ЭР в АГ зависит от конформации гликопротеинового комплекса. Для начала мы исследовали характер локализации гликопротеинов при экспрессии с отдельных кДНК. Иммунофлуоресцентный анализ с применением АГ к хантавирусным антигенам и АГ к специфичным антигенам ЭР и АГ показал локализацию обоих гликопротеинов G1 и G2 хантавирусов ANDV и SNV при их независимой экспрессии в ЭР и отсутствие их дальнейшего транспорта в АГ. При одновременной экспрессии двух гликопротеинов в результате ко-трансфекции двух экспрессионных плазмид (для вирусов ANDV и SNV) или

в результате экспрессии полного предшественника гликопротеинов GPC, кодирующего оба гликопротеина (для вируса ANDV), гликопротеины обнаружены в АГ. В общем, наши результаты исследования внутриклеточной локализации гликопротеинов ANDV и SNV подтвердили опубликованные ранее данные для вирусов SNV и HNTV (Ruusala, Persson et al. 1992; Shi and Elliott 2002; Spiropoulou, Goldsmith et al. 2003).

Большинство вирусов семейства *Bunyaviridae* созревают в АГ, но до сих пор нет согласия о типе сигнала локализации в АГ у данного семейства вирусов, хотя и достигнут значительный прогресс в картировании сигнальной последовательности для некоторых представителей семейства. В ранних работах, посвящённых транспорту гликопротеинов G1 и G2 вируса *Bunyamwera*, было выдвинуто предположение, что сигнал локализации в АГ находится в N-концевом участке GPC, соответствующего в данном случае G2 (Lappin, Nakitare et al. 1994). Та же сигнальная последовательность локализации в АГ обнаружена в трансмембранном домене и первых 10 аминокислотных остатках цитоплазматического хвоста G1 вируса *Punta Toro* (Matsuoka, Chen et al. 1994). Для вируса *Uukuniemi* АГ-сигнал был картирован в первых 50 аминокислотных остатках цитоплазматического хвоста G1 (Andersson, Melin et al. 1997). Относительно недавно для вируса *Hantaan* было показано, что транспорт гетеродимера G1/G2 в АГ, по-видимому, зависит от конформационных взаимодействий этих гликопротеинов, а не от специфичной аминокислотной последовательности (Shi and Elliott 2002).

Так как в дальнейшем мы планируем получение сегментных геномных гибридов (реассортантов) между патогенными и непатогенными хантавирусами с целью изучения механизмов, обуславливающих их патогенность, мы решили выяснить, могут ли гликопротеины из разных хантавирусов (ANDV и SNV) взаимодействовать и замещать друг друга. Гомология аминокислотных последовательностей гликопротеинов G1 исследуемых вирусов составляет 72,2%, а гликопротеинов G2 — 85%. Мы показали, что гликопротеины G1 и G2 этих хантавирусов могут взаимодействовать в любых комбинациях с образованием транспортируемых в АГ комплексов (Рис. 4). Полученные данные свидетельствуют о том, что конформация образуемого комплекса G1/G2, скорее всего, отвечает за правильную транспортировку и удержанию комплекса в АГ. Важно, что транспорт и локализация гликопротеинов G1 и G2 при экспрессии с различных плазмид соответствует локализации гликопротеинов ANDV и SNV в инфицированных клетках Vero-E6, обычно применяемых для культивирования хантавирусов (Zaki, Greer et al. 1995), а также в первичной культуре клеток эндотелия лёгких человека.

Итак, присутствие обоих гликопротеинов G1 и G2 необходимо для их транспорта и накопления в АГ. Показано, что экспрессия отдельных

гликопротеинов приводит к их локализации в ЭР, что подтверждает данные, опубликованные ранее Spiropoulou et al. (Spiropoulou, Goldsmith et al. 2003). Впервые показано, что гликопротеины разных хантавирусов (ANDV-G1 + SNV-G2 или SNV-G1 + ANDV-G2) при ко-экспрессии могут взаимодействовать между собой с последующим транспортом в АГ, что свидетельствует об их конформационном взаимодействии. Полученные данные могут быть использованы при создании рекомбинантных вирусов, содержащих компоненты хантавирусов.

ГЛАВА 3. Невирусные системы доставки нуклеиновых кислот для терапии бокового амиотрофического склероза

3.1 Разработка рекомбинантных генетических конструкций

Клонирование генов в экспрессионные плазмидные векторы. Исходя из нуклеотидных последовательностей, полученных из базы данных GeneBank (<http://ncbi.gov/GeneBank>), были разработаны специфические праймеры для ПЦР-амплификации полных открытых рамок считывания генов сосудистого эндотелиального фактора роста человека (*vegf*), нейральной адгезии L1 мыши (*mL1cam*) и *egfp*. 5'- и 3'-праймеры содержат адаптерные участки с уникальными сайтами рестрикции, применяемые при клонировании генов в экспрессионный плазмидный вектор pcDNA3.1 (Invitrogen). Сайты рестрикции выбраны на основе анализа последовательностей кДНК, полученных из GeneBank. В результате клонирования были получены плазмиды pcDNA-mL1CAM, pcDNA-VEGF и pcDNA-EGFP. Фрагменты ДНК, содержащие кДНК генов *vegf*, *mL1cam* и *egfp* субклонировали в двукассетный экспрессионный вектор pBudCE4.1 (Invitrogen). Отличительной особенностью этой плазмиды служит наличие двух независимых экспрессионных кассет, каждая под контролем эффективного конституционно активного промотора (промотор цитомегаловируса человека CMV и промотор фактора транскрипции человека EF1 α), позволяющих одновременно и независимо экспрессировать два рекомбинантных гена с одного плазмидного вектора. В результате субклонирования получены плазмиды pBud-EGFP-mL1CAM, pBud-VEGF-EGFP и pBud-VEGF-mL1CAM (Рис. 3). Конечное подтверждение получения интересующих нас плазмид осуществляли с помощью секвенирования.

Приготовление образцов siRNA. Последовательность siRNA, специфичная для гена супероксиддисмутазы 1 человека (*sod1*), и соответствующий неспецифичный контроль созданы на основе результатов Raoul с соавторами (Raoul, Abbas-Terki et al. 2005). Синтез рибоолигонуклеотидов был проведён фирмой Синтол (г. Москва). Отжиг рибоолигонуклеотидов проводили в буфере (10 мМ Трис с pH 8,0, 10 мМ NaCl) инкубацией 1 мин при 90 °С с последующей инкубацией 1 час при 37 °С. Полученные дуплексы siRNA хранили при -20 °С.

3.2 Получение генетически модифицированных клеток мононуклеарной фракции пуповинной крови человека

Выделение клеток мононуклеарной фракции из пуповинной крови человека. Заготовку пуповинной крови (ПК) проводили после получения информированного согласия у беременной и после тщательного дородового скрининга на наличие противопоказаний к донорству пуповинных клеток (в соответствии с Приказом Минздрава РФ от 14.09.2001 №364 об утверждении порядка медицинского обследования доноров крови и её компонентов). Проведен сравнительный анализ выделения клеток мононуклеарной фракции ПК человека с помощью седиментации гидроксипропилоксил крахмалом по Рубинштейну (Rubinstein, Dobrila et al. 1995), седиментация в градиенте плотности фиколла (Hawley, Hawley et al. 2004) и автоматическим выделением на сепараторе клеток “Serax” фирмы Biosafe в соответствии с инструкциями производителя.

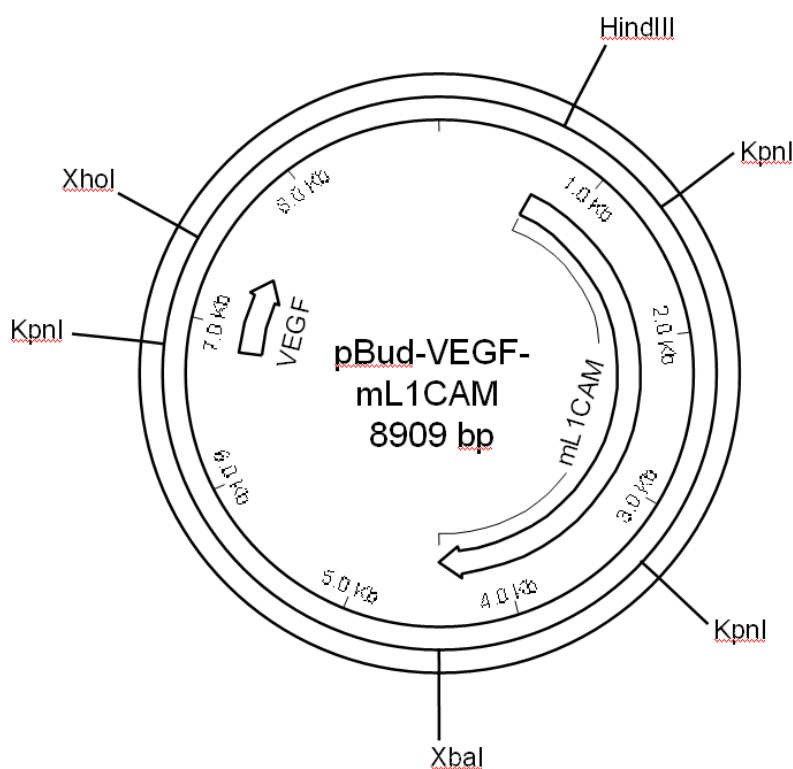


Рис. 3. Рестрикционная карта плазмиды pBud-VEGF-mL1CAM.

Во всех полученных образцах количество жизнеспособных клеток было не менее 97%. При исследовании образцов ПК (n=15) средним объёмом $67,8 \pm 8,5$ мл мы установили, что количественный выход ядросодержащих клеток, выделенных методом седиментации гидроксипропилоксил крахмалом, в среднем составил $4,4 \times 10^8$, а эритроцитов 4×10^{10} в образце. Количество ядросодержащих клеток при выделении методом седиментации в градиенте плотности фиколла (n=15, средний объём ПК $73,4 \pm 9,6$ мл) в среднем составил $1,2 \times 10^7$, а эритроцитов 4×10^6 в образце. Количество ядросодержащих клеток при выделении автоматическим методом (n=15,

средний объём ПК $70,1 \pm 10,4$ мл) в среднем составил $5,6 \times 10^8$, а эритроцитов 2×10^{10} в образце.

Исходя из полученных нами данных, можно заключить, что — несмотря на то, что все три метода процессинга пуповинной крови широко применяют в банках пуповинной крови при заготовке концентрата стволовых клеток — для дальнейшего применения этих клеток в генной терапии лучше применять метод получения фракции моноклеаров в градиенте плотности фиколла. В этом случае мы получали минимальное количество эритроцитов, присутствие которых может снизить эффективность трансфекции.

Выбор метода трансфекции клеток моноклеарной фракции пуповинной крови человека. Для выявления оптимальных условий генетической модификации стволовых клеток пуповинной крови нами были оценены 3 принципиально разных метода трансфекции.

1. Escort V (Sigma) трансфекционный реагент представляет собой полиэтилениминный (PEI) препарат, сорбирующий молекулы ДНК на поверхности положительно заряженных PEI наночастиц (Godbey, Wu and Mikos, 1999).

2. TransFast (Promega) трансфекционный реагент — представитель липосомного метода трансфекции, при котором молекулы плазмидной ДНК упаковываются в липидные везикулы (Felgner, Holm and Chan, 1989, Felgner and Ringold, 1989). При контакте ДНК-содержащих липосом с клеточной мембраной происходит слияние липидных слоев и внедрение генетического материала внутрь клетки.

3. Электропорация служит одним из физических методов трансфекции клетки (Shigekawa and Dower, 1988). При пропускании электрического разряда через среду, содержащую смесь клеток и ДНК, происходит образование временных пор в клеточной мембране и транслокация генетического материала. В работе применяли прибор Gene Pulser Xcell Total System (BioRad, USA).

Оптимизацию трансфекции моноклеарных клеток ПК проводили в соответствии инструкциями производителей для суспензионных культур. Во всех проверенных методах процент выхода трансфицированных клеток был в диапазоне от 20 до 30%. В связи с тем, что электропорация не требует применения дополнительных химических препаратов и является наиболее биологически безопасным методом трансфекции клеток, применяемым в клинических приложениях, мы приняли решение использовать этот метод для дальнейшей работы по генетической модификации моноклеарных клеток ПК человека.

3.3 Трансплантация генетически модифицированных клеток моноклеарной фракции ПК человека трансгенным мышам G93A

Трансгенные мыши. Линия мышей B6SJL-Tg(SOD1-G93A)dl1Gur/J создана в лаборатории Mark E. Gurney при Северо-западном университете США (Northwestern University, USA). B6SJL-TG(SOD1-G93A)dl1Gur/J (далее

трансгенные мыши G93A) приобретены у компании Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). По договору с Казанским государственным медицинским университетом питомник «Пушино» при филиале института биоорганической химии им. академика М.М. Шемякина и академика Ю.А. Овчинникова РАН (филиал ИБХ РАН) отвечает за поддержание линии и производство трансгенных мышей B6SJL-Tg(SOD1-G93A)dl1Gur/J в РФ. Ветеринарное свидетельство, выданное питомником лабораторных животных «Пушино», подтверждает качество полученных животных и их пригодность для экспериментальных исследований. Полугодовых пресимптоматических мышей доставляли в Казанский государственный медицинский университет и содержали в стандартных условиях.

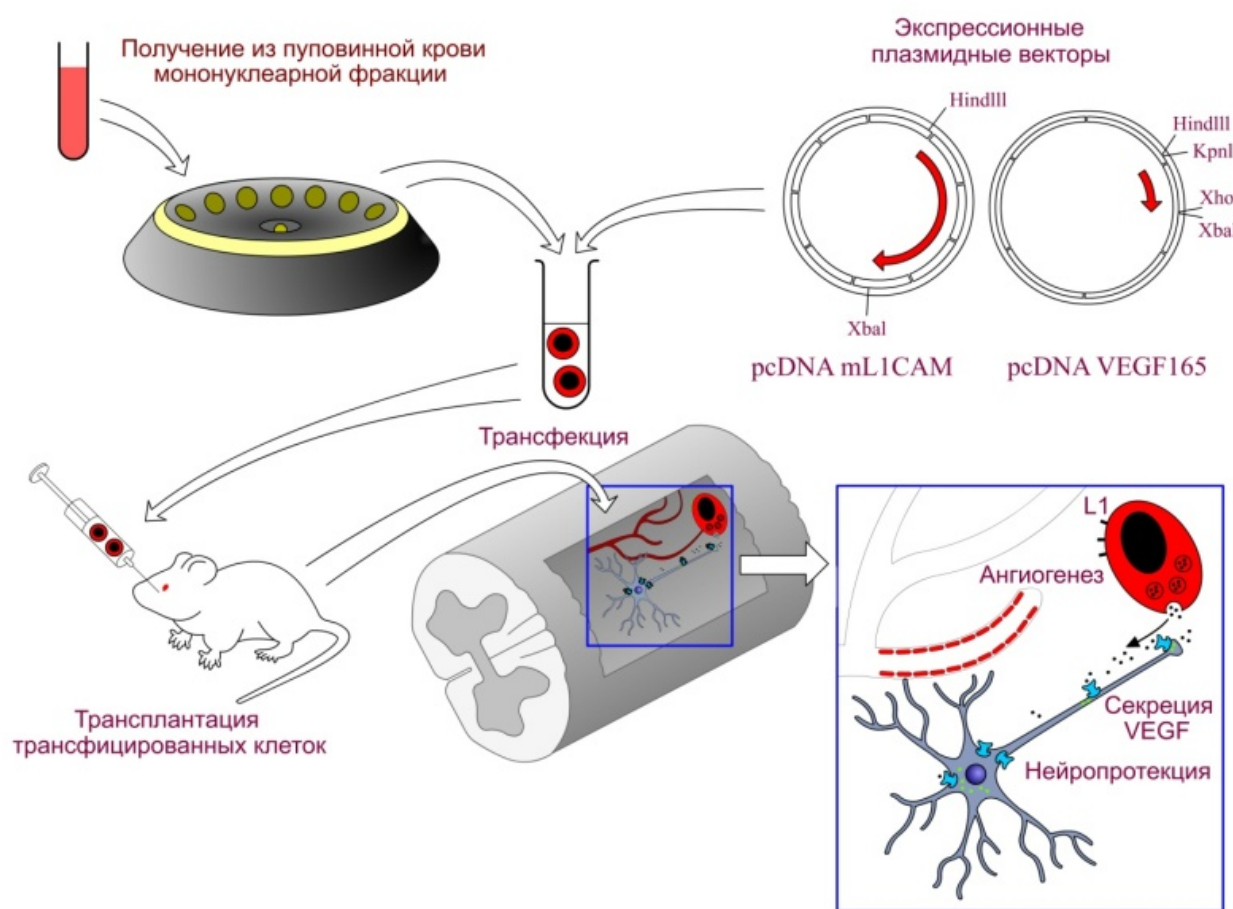


Рис. 5. Схема эксперимента по генетической модификации и трансплантации клеток пуповинной крови человека трансгенным мышам.

Трансплантация генетически модифицированных клеток мононуклеарной фракции пуповинной крови человека трансгенным мышам G93A. Трансгенным животным (самки и самцы) на начальном этапе развития заболевания в стерильных условиях путём ретроорбитальной инъекции (1 миллион клеток в 200 мкл среды RPMI 1640) трансплантировали клетки пуповинной крови человека. Группе 1 вводили нетрансфицированные

клетки моноклеарной фракции из пуповинной крови человека; группе 2 вводили моноклеарную фракцию клеток из пуповинной крови человека, трансфицированную плазмидой pEGFP-N2; группе 3 вводили моноклеарную фракцию клеток из пуповинной крови человека, трансфицированную плазмидами, экспрессирующими нейрональную молекулу адгезии L1 и сосудистый эндотелиальный фактор роста VEGF. Общая схема эксперимента представлена на рисунке 5.

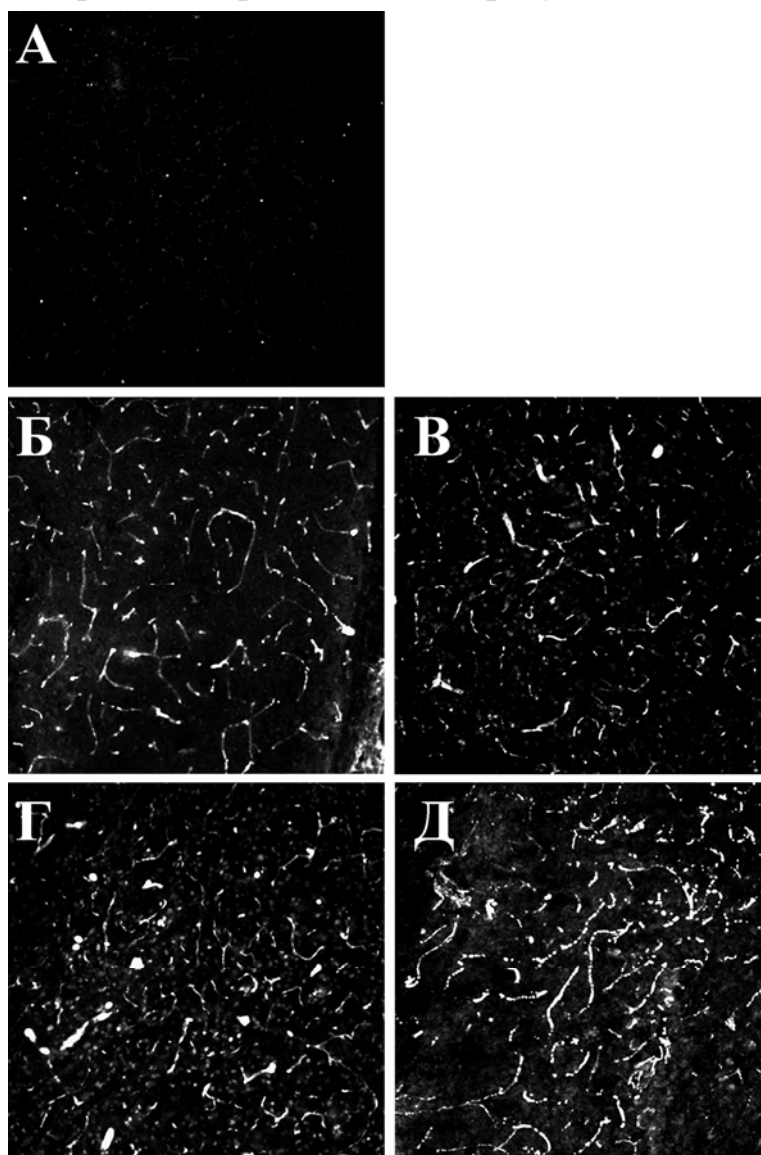


Рис. 6. Иммуногистохимический анализ тканей поясничного отдела спинного мозга трансгенных мышей G93A. Иммуногистохимическая реакция с АТ к HN. **А** — контрольная группа мышей через 2 недели; **Б** — группа мышей через 2 недели после трансплантации генетически модифицированных клеток; **В** — группа мышей через 2 месяца после трансплантации генетически немодифицированных клеток; **Г** — группа мышей через 2 месяца после трансплантации генетически модифицированных клеток; **Д** — группа мышей через 3 месяца после трансплантации генетически модифицированных клеток.

Гистологические исследования тканей трансгенных животных. Перед проведением иммуногистохимического анализа мышей наркотизировали и перфузировали через большой круг кровообращения сначала холодным фосфатно-солевым буфером (PBS), а затем — холодным 4% раствором параформальдегида, растворённого в PBS. Далее был проведён забор головного мозга, поясничного отдела спинного мозга и чувствительных ганглиев. Для гистологического исследования ткани мышцы фиксировали в растворе параформальдегида. Препараты для иммуногистохимических исследований приготовили 2 методами: заливали в парафин и готовили фронтальные срезы головного мозга и продольные срезы поясничного отдела спинного мозга толщиной 10 мкм; насыщали 30% раствором сахарозы, замораживали в заливочной среде TBS (Triangle Biomedical Science, Durham, NC) и готовили продольные срезы (25 мкм) поясничного отдела спинного мозга мышей на криостате при температуре -25 °С. Для исследования трансплантированных клеток применяли АТ к HLA ABC (HLA ABC, DAKO, Denmark), моноклональные АТ мыши к ядерному антигену человека (англ. human nuclei, HN) и к антигену CD34 человека (Novocastra). Результаты окрашивания показали присутствие клеток человека в головном и спинном мозге мышей. Иммунопозитивные клетки преимущественно локализовались в эндотелии сосудов. Однако часть клеток мигрировала через сосудистую стенку в нервную ткань.

В ходе иммуногистохимического анализа поясничного отдела спинного мозга были изучены процессы миграции, пролиферации, а также фенотипические характеристики трансплантированных клеток. С этой целью применяли АТ к HN, маркёру клеток человека, и к антигену CD34, маркёру эндотелиальных клеток. Иммунопозитивные по HN клетки были обнаружены вдоль стенок кровеносных сосудов поясничного отдела спинного мозга. При этом плотность HN-позитивных клеток была выше при трансплантации генетически модифицированных клеток, по сравнению с трансплантацией генетически немодифицированных клеток. Более того, через 2 и 3 месяца после приживления трансплантированных клеток плотность HN-позитивных клеток значительно возрастала по сравнению с плотностью клеток, отмеченной на сроке 2 недель после трансплантации (Рис. 6).

Иммуногистохимическая реакция с АТ к CD34 выявила, что HN-позитивные клетки, локализованные в стенке кровеносных сосудов, экспрессируют молекулы CD34, что свидетельствует о дифференцировке генетически модифицированных клеток в эндотелиальные клетки.

Клиническая оценка трансгенных животных. Тест силы хватки (англ. grip strength test) проводили по описанной методике (Weydt, Hong et al. 2003). Мышам, удерживая их за хвост, позволяют вцепиться всеми лапками в горизонтально расположенную металлическую решётку. После этого решётку медленно переворачивают таким образом, что мыши оказываются перевёрнутыми вниз головой, и фиксируют период времени до тех пор, пока

животное не отцепится от решётки. Тест состоит из трёх попыток, из которых выбирают наибольший результат. Каждую мышь тестируют 2 раза в неделю с момента трансплантации до окончания эксперимента. Перед тестированием животных обучали проведению теста в течение двух недель.

В течение первых двух недель тестирования по результатам теста силы хватки не было выявлено различий в показателях экспериментальной (трансплантация нетрансфицированных клеток и трансплантация трансфицированных VEGF +L1 клеток) и контрольной групп животных. На данном этапе исследования анализ теста выявил уменьшение мышечной силы животных по сравнению с первоначальной на 34% в группе контрольных, на 41,4% в группе мышей с трансплантацией трансфицированных VEGF+L1 клеток, и на 36% в группе мышей с трансплантацией нетрансфицированных клеток.

3.4 Трансфекция siRNA в аксоны седалищного нерва трансгенных мышей G93A

Эксперименты проводили на 36-недельных мышях с признаками паралича задних конечностей. Хирургические процедуры проводили под общим наркозом. Мышам перерезали левый седалищный нерв в средней трети бедра и на центральный отрезок нерва надевали силиконовую трубку длиной 5 мм. Трубку заполняли siRNA (специфичной к мРНК гена *sod1* человека или соответствующей контрольной siRNA), а свободный конец трубки запечатывали вазелином. Трубку приклеивали к окружающим мышцам при помощи биологического клея (3M Vetbond), а затем рану зашивали. Экспериментальной группе мышей (n=3) вводили siRNA, специфичную к мРНК гена *sod1* человека. Контрольной группе мышей (n=3) вводили неспецифичную siRNA, содержащую 2 нуклеотидные замены по отношению к последовательности гена *sod1* человека. Схема эксперимента представлена на рисунке 7.

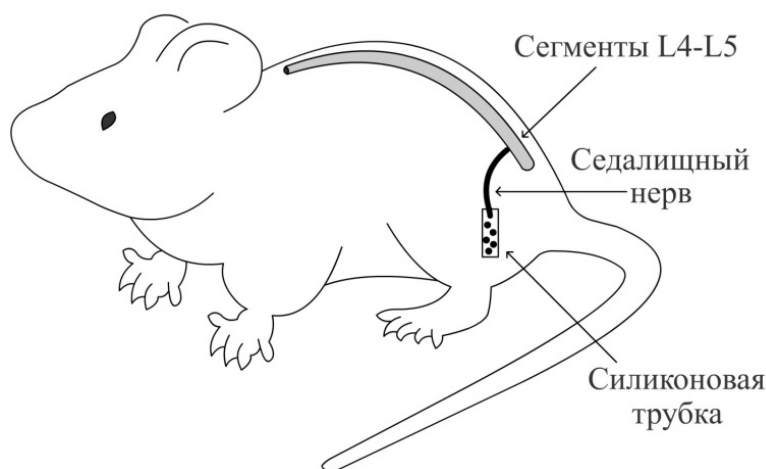


Рис. 7. Схема эксперимента по перерезке седалищного нерва мышей и введения препарата siRNA.

Через 24 часа после операции поясничный отдел спинного мозга извлекали для количественного анализа экспрессии генов с помощью ПЦР-РВ. Аппликация *sod1*-специфичной siRNA приводила к снижению количества матричной РНК *sod1* в соответствующей части спинного мозга на 48% в сравнении с контралатеральной (контрольной) стороной ($n=3$, $p=0,032$) (Рис. 8). Подавление экспрессии мРНК гена *sod1* человека не оказывало влияния на экспрессию генов *chat* и *snap25*. После аппликации контрольной siRNA количество мРНК *sod1* на оперированной и контралатеральной стороне не отличался.

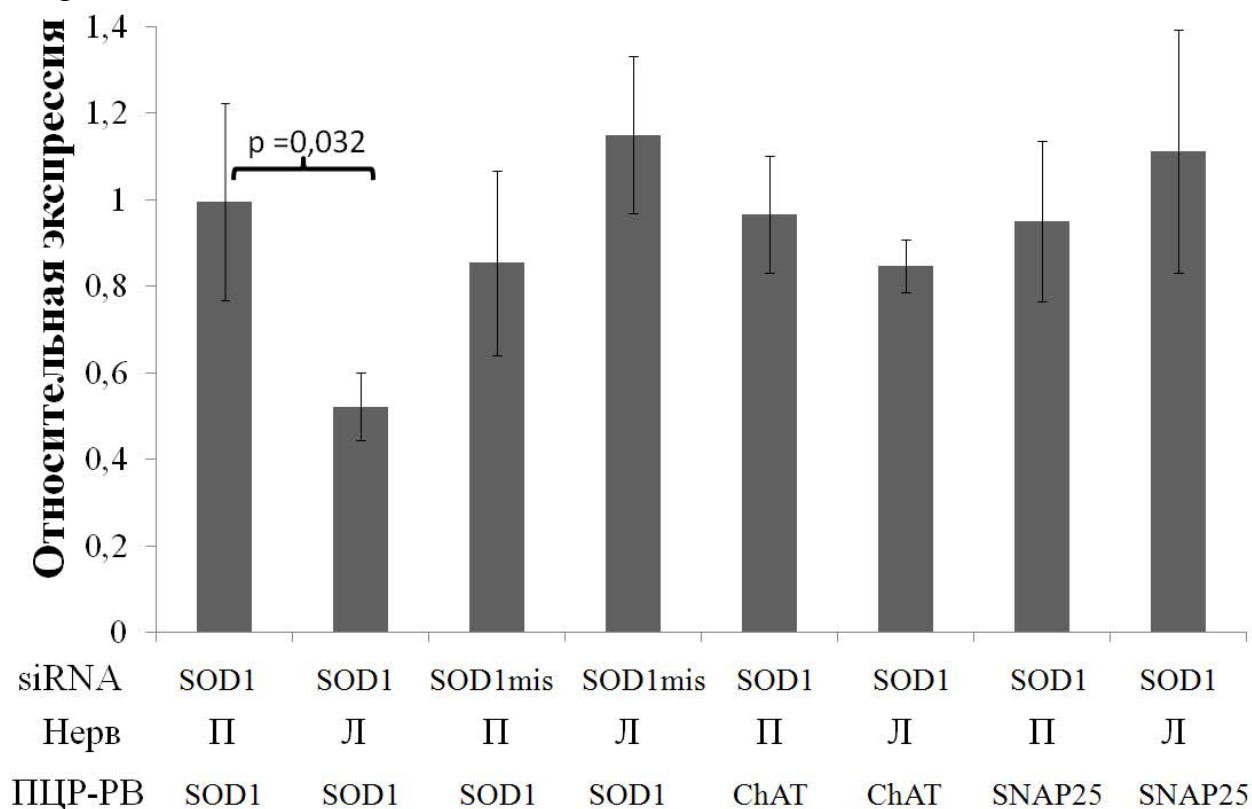


Рис. 8. Количественный анализ экспрессии мРНК различных генов в правом и левом седалищных нервах оперированных трансгенных мышей G93A. siRNA: SOD1 — специфичная siRNA, подавляющая экспрессию гена *sod1* человека; **SOD1mis** — неспецифическая siRNA, содержащая 2 нуклеотидных замены относительно последовательности гена *sod1* человека. Анализ проводили для правого (П) и левого (Л) фрагментов седалищного нерва. **ПЦР-РВ** проводили с применением праймеров и проб TaqMan, специфичных к мРНК гена *sod1* человека, а также генов *chat* и *snap25* мыши. Уровень экспрессии специфичных мРНК приведён по отношению к уровню экспрессии в правом седалищном нерве трансгенных мышей.

3.5 Обсуждение

Нейротравма, ишемические инсульты, нейродегенеративные заболевания сопровождаются гибелью нейронов, дегенерацией аксонов, нарушением коммуникаций в нейронных сетях и контролируемых ими функций. Молекулярно-генетические и клеточные технологии — перспективные направления для предотвращения вторичной дегенерации и поддержания роста нервных волокон. Вирусные векторы широко применяют для доставки нейротрофических факторов для стимулирования нейрорегенерации. В настоящее время для повышения эффективности доставки в область повреждения нервной ткани факторов, поддерживающих выживание нейронов и стимулирующих рост нервных волокон, активно исследуют возможность применения генетически модифицированных клеток, трансфицированных генами нейротрофических факторов (BDNF, NT-3, GDNF), эритропоэтина и молекул адгезии (Chen, Hung et al. 2005). Трансплантированные клетки, экспрессирующие клонированный ген, могут значительно усилить регенераторный потенциал органа-мишени. Основанием для трансплантации моноклеарных клеток пуповинной крови для стимуляции регенерации нервной ткани служит их пригодность как для алло-, так и для аутотрансплантации у человека, их низкая иммуногенность, доступность, простота получения и хранения. Кроме того, в пуповинной крови присутствуют стволовые клетки, способные давать начало специализированным клеткам разных тканей. Так, стволовая кроветворная клетка может выходить из красного костного мозга, присутствовать в общем кровотоке и заселять, например, сердце, головной мозг, печень или скелетные мышцы. Далее, в зависимости от микроокружения, стволовая кроветворная клетка может дифференцироваться в миобласты скелетной и сердечной мышечной ткани, гепатоциты, эндотелиальные клетки сосудов, нейроны, олигодендроциты, астроциты. Эффективность внутривенной инъекции клеток крови пуповины была исследована на модели бокового амиотрофического склероза у мышей. Клетки были обнаружены в местах дегенерации мотонейронов в спинном и головном мозге, при этом трансплантированные клетки экспрессировали нейральный фенотип (Garbuzova-Davis, Willing et al. 2003). Анализ первых клинических исследований по трансплантации больным боковым амиотрофическим склерозом стволовых клеток, выделенных из периферической крови, показал безопасность трансплантации и толерантность больных к трансплантированным клеткам (Mazzini, Fagioli et al. 2003). Следует, однако, отметить, что предварительные клинические испытания по трансплантации кроветворных стволовых клеток больным с боковым амиотрофическим склерозом не выявили явного терапевтического эффекта. В настоящее время существуют единичные экспериментальные работы по трансплантации генетически модифицированных клеток пуповинной крови для стимуляции регенерации сердечной мышцы и сосудов.

Наибольшее внимание уделяется возможности трансплантации клеток крови, генетически модифицированных геном *veg*f. Например, трансплантация клеток пуповинной крови, трансфицированных геном *veg*f человека, стимулирует ангиогенез в тканях при моделировании хронической ишемии конечностей у крысы (Ikeda, Fukuda et al. 2004) и инфаркта миокарда у мышей (Chen, Hung et al. 2005).

Таким образом, с целью нейропротекции и стимулирования нейрорегенерации, получение и испытание генетически модифицированных клеток крови пуповины можно считать перспективным направлением генно-клеточной терапии. При этом возможно тестирование множества конкретных подходов — применение различных клеточных популяций пуповинной крови, разные генетические модификации клеток перед трансплантацией, варианты по срокам, количеству и способу введения клеток (непосредственно в область травмы, в кровоток, в составе биоматрикса). Данная работа была связана с получением генетически модифицированных моноклеональных клеток крови пуповины человека для лечения трансгенных B6SJL-Tg(SOD1-G93A)dl1Gur/J мышей, экспрессирующих фенотип бокового амиотрофического склероза.

Для усиления терапевтического эффекта моноклеональные клетки пуповинной крови были подвергнуты генетической модификации путём трансфекции плазмидными векторами, экспрессирующими гены нейральной молекулы адгезии L1 и сосудистого эндотелиального фактора роста VEGF. Усиление экспрессии генов, кодирующих синтез данных молекул, позволяет рассчитывать на более выраженный нейротрофический эффект генетически модифицированных клеток на мотонейроны при боковом амиотрофическом склерозе. Известно, что молекула адгезии L1 поддерживает выживание нейронов и рост аксонов. Для VEGF его нейротрофический эффект оказался новым и неожиданным, и применение этого фактора обоснованно считают одним из наиболее перспективных направлений. Фактор поддерживает выживание нейронов, что, согласно нашим данным, происходит через рецептор Flk-1. На модели экспериментальной травмы спинного мозга VEGF существенно поддерживает васкуляризацию и рост аксонов (Facchiano, Fernandez et al. 2002). Выбор именно этого фактора роста обусловлен также его выраженным стимулирующим влиянием на процесс неоваскуляризации, что может оказаться важным для скорейшего устранения цитотоксичности.

Для доставки рекомбинантных нуклеиновых кислот в клетки одним из перспективных методов служит электропорация — проверенная, нехимическая, невирусная технология доставки экзогенных макромолекул в клетки (Chang and Reese, 1990). Основным преимуществом электропорации служит сведение биологической вредности к минимуму по сравнению с вирус-опосредованной и химической передачей гена. Электропорация служит перспективным методом передачи гена в ГСК для применения в

клинике, т.к. минимизирует возможность биологического обсеменения и иммунных реакций.

В ходе проведённых исследований нами были получены плазмидные конструкции, экспрессирующие клонированные гены *veg*f и *L1*cam. При помощи электропорации данные плазмиды были трансфицированы в свежевыделенные клетки моноклеарной фракции пуповинной крови человека. Далее генетически модифицированные клетки были трансплантированы трансгенным G93A мышам (Рис. 5).

Предварительные результаты по трансплантации клеток пуповинной крови, трансфицированных плазмидами, экспрессирующими EGFP, показали, что трансплантированные клетки мигрируют в нервную ткань спинного и головного мозга и сохраняют способность к экспрессии рекомбинантных генов (Рис. 6). Оценка клинической эффективности введения моноклеарной фракции клеток, трансфицированных плазмидными векторами, экспрессирующими клонированные нейральную молекулу адгезии L1 и сосудистый эндотелиальный фактор роста VEGF, подтвердила правильность предположений о возможной эффективности предлагаемого метода при лечении бокового амиотрофического склероза на модели трансгенных мышей, экспрессирующих мутантный ген *sod1* человека. Анализ предварительных результатов свидетельствует о положительном терапевтическом эффекте трансплантированных клеток. Вывод основан на положительных данных поведенческого теста у подопытных животных, которым трансплантировали генетически модифицированные клетки, и хоуминга трансплантированных клеток, экспрессирующих терапевтические гены (*veg*f и *L1*), в спинной мозг.

Таким образом, в ходе нашего исследования было установлено, что генетически модифицированные моноклеарные клетки крови пуповины человека, экспрессирующие сосудистый эндотелиальный фактор роста VEGF человека и нейральную молекулу адгезии L1 мыши, мигрируют в места нейродегенерации, пролиферируют и дифференцируются в эндотелиальные клетки с образованием новых кровеносных сосудов. Остальные HN-позитивные, но при этом CD34-негативные, клетки могут дифференцироваться в других направлениях или могут оставаться на стадии прогениторных клеток в стенке кровеносных сосудов. Подобные результаты были получены при трансплантации стволовых клеток костного мозга крысам с инфарктом миокарда. При этом наблюдался рост эндотелиальных клеток в участке поражённого миокарда (Zhang, Ge et al. 2006).

В 2006 году за открытие РНК-интерференции Andrew Z. Fire из Станфордского университета и Craig C. Mello из Массачусетского университета были удостоены Нобелевской премии. РНК-интерференция — эволюционно консервативный механизм посттранскрипционной блокады синтеза белка. Комплементарное взаимодействие короткой интерферирующей РНК (от англ. small interfering Ribonucleic Acid, siRNA) в

составе комплекса белков с мРНК–мишенью приводит к деградации мРНК и, как следствие, к прекращению синтеза белка. Способность siRNA инициировать посттранскрипционное «молчание» генов, ассоциированных с конкретными заболеваниями, в культуре клеток и на моделях болезней человека у животных определила новое направление в генной терапии. Совершенствование способов доставки молекулы siRNA в клетку и потенциальная возможность лабораторного синтеза siRNA, комплементарной любой известной мРНК, открывает широкие перспективы применения РНК–интерференции в лечении инфекционных, онкологических и нейродегенеративных заболеваний. У трансгенных мышей SCA1 со спинально-мозжечковой атаксией после внутримозжечковой инъекции вирусного вектора, экспрессирующего siRNA, комплементарной мутантному гену *atx1* (атаксин 1), значительно улучшалась координация движений и восстанавливалась цитоархитектоника мозжечка (Xia, Mao et al. 2004). В другом случае, при скрещивании трансгенных SOD1–мышей с мышами, экспрессирующими анти-*sod1* siRNA, у полученного потомства транскрипция siRNA, комплементарной мРНК мутированного гена, предотвращала дегенерацию мотонейронов (Saito, Yokota et al. 2005). Внутримышечная (Ralph, Radcliffe et al. 2005) или интраспинальная (Raoul, Abbas-Terki et al. 2005) инъекция вирусного вектора, экспрессирующего siRNA (комплементарной мРНК мутированного *sod1*), трансгенным G93A–мышам отодвигали начало заболевания и значительно увеличивали время жизни трансгенных мышей G93A.

Полученные ранее результаты свидетельствуют о ретроградном транспорте siRNA по аксонам мотонейронов, что приводит к селективной блокаде экспрессии белка-мишени. В исследовании, проведенном нашим коллективом, были изучены внутриаксонный синтез тубулина и функциональное значение локальной трансляции белка в регуляции ретроградного аксонного транспорта *in vivo* при помощи siRNA, комплементарной мРНК нейрональной формы β -тубулина и ретроградного флуоресцентного зонда Fluorogold (Исламов Р.Р., Мурашов А.К. and Ю.А., 2005). Полученные данные указывали на то, что прямое апплицирование анти-*sod1* siRNA на периферический нерв приведет к индукции РНК интерференции с последующим снижением количества мРНК мутантного гена в мотонейроне.

В ходе нашего исследования нами впервые была выполнена трансфекция siRNA в аксоны мотонейронов поясничного отдела спинного мозга мышей G93A путём аппликации siRNA, комплементарной мРНК мутантного гена человека *sod1*, на центральный отрезок перерезанного седалищного нерва (Рис. 7). Аппликация *sod1*-специфичной siRNA приводила к снижению количества матричной РНК *sod1* в соответствующей части спинного мозга, однако не оказывало влияния на экспрессию мРНК генов *chat* и *snap25* крысы (Рис. 8). Таким образом, siRNA путём интернализации

попадает в аксоны мотонейронов, ретроградно транспортируется в перикарионы и блокирует трансляцию aberrантного SOD1. Для большей эффективности захвата и ретроградного транспорта siRNA может быть ковалентно связана (конъюгирована), например, с нейротрофином-3 или С-фрагментом столбнячного токсина. Далее путём инъекции в органы конъюгированная siRNA может быть целенаправленно доставлена в перикарионы нейронов, иннервирующих эти органы, что служит альтернативой векторной трансфекции нервных клеток.

Итак, разработаны невирусные биологически безопасные способы доставки рекомбинантных нуклеиновых кислот в организм трансгенных мышей G93A, экспрессирующих фенотип бокового амиотрофического склероза. Созданы плазмидные конструкции, экспрессирующие различные терапевтические гены. Разработаны методы выделения и трансфекции клеток моноклеарной фракции пуповинной кровичеловека. Показано, что трансплантация полученных генетически модифицированных клеток трансгенным мышам G93A приводила к их миграции в очаги нейродегенерации и стимуляции роста новых кровеносных сосудов, что может повысить выживаемость мотонейронов за счёт секреции нейропротекторных факторов и улучшения питания ткани. Впервые показана возможность адресной доставки коротких интерферирующих РНК в перикарионы мотонейронов в поясничном отделе мышей путём аппликации siRNA на центральный отрезок перерезанного седалищного нерва. Показано, что siRNA эффективно подавляла уровень мРНК мутантного гена *sod1*. Комбинация технологии РНК-интерференции с развивающимися методами доставки рекомбинантных нуклеиновых кислот могут лечь в основу новых эффективных, биологически безопасных методов лечения бокового амиотрофического склероза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В современном арсенале генной терапии есть различные способы доставки генетического материала в клетки-мишени. Существующие подходы можно условно классифицировать на вирусные и невирусные. В основе такого подразделения лежит способ доставки генетического материала. Вирусные методы основаны на применении естественного механизма доставки генетического материала в клетки-мишени, доведённого в процессе эволюции до весьма высокой эффективности. Вирусы — эффективные конструкции, способные к инфицированию различных клеточных типов, но существенным недостатком вирусных векторов для доставки генетического материала в клетки служит их низкая биологическая безопасность. В зависимости от вируса, на основе которого созданы генетические конструкции, возникают проблемы, связанные с мутационной и онкологической активностью вирусов, а также патологическими

иммунологическими процессами. В связи с этим остро встаёт вопрос о разработке новых биобезопасных вирусных векторов.

Ключевые параметры «идеального» вирусного вектора — отсутствие интеграции в геном клетки-хозяина, низкая иммуногенность, продолжительная экспрессия рекомбинантных генов. Один из перспективных вирусов, удовлетворяющий всем этим требованиям — цитомегаловирус. В данной работе проведено исследование ранее неохарактеризованного вируса CMV из *P. maniculatus*. С применением разнообразных вирусологических и молекулярно-генетических методов показана его видовая принадлежность и филогенетическое родство с другими известными цитомегаловирусами.

Рекомбинантный вирус PCMV получен нами путём вставки в ген *p33* экспрессионной кассеты, содержащей химерный ген из генов *snv-g1* и *egfp*, в котором сохранён нативный сайт расщепления G1-G2 между рекомбинантными белками. Подобный подход позволил экспрессировать G1 в его нативной форме, а также осуществить анализ экспрессии рекомбинантных белков по флуоресценции белка EGFP. Анализ экспрессии рекомбинантных белков проведён методами флуоресцентной микроскопии, иммуногистохимии и вестерн-блотингом.

Полученный рекомбинантный вирус PCMV (ΔP33:G1EGFP) способен инфицировать хомячков *P. maniculatus* даже в низких концентрациях (порядка 10 PFU вируса на животное). У инфицированных животных наблюдали иммунный гуморальный ответ на рекомбинантные белки SNV-G1 и EGFP. Отмечено, что существующий иммунный ответ против wtPCMV не мешает индукции иммунного ответа против рекомбинантных белков, экспрессируемых рекомбинантным вирусом. Это свойство разработанной векторной системы позволяет проводить вакцинацию организма-хозяина рекомбинантными вирусами (несмотря на наличие естественной инфекции и иммунного ответа на неё на момент вакцинации).

Показано, что инфицирование животных рекомбинантным PCMV не приводит к выраженной патологии и, по всей видимости, не влияет на продолжительность их жизни, так как животные, инфицированные wtPCMV или рекомбинантным PCMV, выживали более 12 месяцев. Несмотря на инфекционность рекомбинантного вируса, у хомячков, инфицированных рекомбинантным вирусом, отмечен менее выраженный иммунный ответ по сравнению с вирусом дикого типа. Предположительно это связано с инактивацией гена *p33*, приводящей к аттенуированному фенотипу цитомегаловируса. Делеция гена *p33* может вызвать нарушение межклеточного распространения PCMV, приводя в конечном итоге к более медленно прогрессирующей инфекции. Дополнительный фактор, оказывающий негативное влияние на вирусную репликацию, — присутствие конститутивно активной экспрессионной кассеты SNV-G1-EGFP.

Анализ вирусной инфекции *in vitro* показал, что накопление внутриклеточной ДНК РСМВ, выброс инфекционных вирусных частиц и аккумуляция ДНК рекомбинантного РСМВ в культуральной среде происходит с задержкой по сравнению с wtРСМВ. Это доказывает, что рекомбинантный РСМВ имеет замедленный репликационный цикл по сравнению с wtРСМВ. Однако, несмотря на более медленную репликацию рекомбинантного РСМВ, он достигал приблизительно одинакового уровня по количеству внутриклеточной вирусной ДНК на поздних стадиях инфекции.

В работе изучен иммунный ответ хомячков *P. maniculatus* против вирусных и рекомбинантных антигенов. Животные, инфицированные wtРСМВ или рекомбинантным РСМВ, показывали иммунный ответ против антигенов РСМВ уже на второй неделе после первоначального инфицирования. Титр АТ к wtРСМВ и рекомбинантному РСМВ продолжал расти по мере протекания инфекции. Реинфицирование мышей соответствующим вирусом вызывало увеличение титра АТ к антигенам РСМВ у животных, инфицированных рекомбинантным РСМВ, но не приводило к повышению титра АТ к РСМВ-антигенам у хомячков, инфицированных wtРСМВ. Этот факт может свидетельствовать о том, что высокий титр АТ к РСМВ-антигенам у инфицированных wtРСМВ хомячков предотвращал дополнительную вирусную репликацию. Хотя после реинфицирования мы наблюдали статистически значимое увеличение титра АТ к РСМВ-антигенам у хомячков, инфицированных рекомбинантным РСМВ, это может быть продолжением развития иммунного ответа на первоначальную инфекцию wtРСМВ. Поскольку рекомбинантный РСМВ имеет аттенуированный фенотип, то он может приводить к менее выраженному иммунному ответу против РСМВ-антигенов. Разницу в иммунном ответе между EGFP и SNV-G1 можно объяснить различной иммуногенностью этих белков и разницей во внутриклеточном количестве рекомбинантных белков.

В работе проведён анализ распределения цитомегаловируса в различных тканях хомячков *P. maniculatus* на разных стадиях инфекции. Показано, что wtРСМВ и рекомбинантный РСМВ присутствуют в относительно малых количествах во всех исследованных органах за исключением крови и мозга. Наибольшие отличия в количестве wtРСМВ от рекомбинантного РСМВ выявлены в сердце (повышенный уровень рекомбинантного РСМВ), в почках и селезёнке (повышенный уровень wtРСМВ). Только следовые количества геномов РСМВ были обнаружены в слюнных железах. Предварительные результаты, полученные на мышах (3 и 4 недели после инфицирования wtРСМВ) показывают присутствие большого количества ДНК вируса РСМВ в слюнных железах, в то время как вирус не обнаруживался спустя 3 месяца после инфицирования рекомбинантным РСМВ.

Основная задача латентной инфекции у вирусов — сохранение функционального вирусного генома в хозяине после завершения стадии первичной инфекции. Определённые сигнальные события могут вызвать реактивацию вируса. Генотоксичный стресс в результате гамма-облучения — один из методов исследования латентности MCMV у мышей (Balthesen, Messerle and Reddehase, 1993). Гамма-облучение (4,12 Gy) привело к значительному увеличению количества вируса в крови хомячков *P. maniculatus*, инфицированных рекомбинантным РСМV. Это показывает, что латентная инфекция РСМV хомячков *P. maniculatus* похожа на латентную инфекцию MCMV мышей, и что делеция гена *p33* не влияет на способность устанавливать латентную инфекцию с последующей реактивацией после генотоксичного стресса организма хозяина в ответ на гамма-облучение.

Методы генетического переноса, используемые в генной терапии, могут быть применены и в фундаментальных исследованиях. Изменение уровня экспрессии отдельно взятого гена или комбинации генов позволяет исследовать их биологическую роль в организме. Например, экспрессия рекомбинантных вирусных белков может быть применена для исследования их взаимодействия с белками клетки-хозяина и друг с другом.

В работе проведено исследование процессинга и транспорта гликопротеинов хантавирусов Нового Света. Большинство (если не все) вирусов семейства *Bunyaviridae* созревает в аппарате Гольджи (АГ). Однако до сих пор нет консенсуса по типу сигнала локализации в АГ у данного семейства вирусов, хотя достигнут значительный прогресс в картировании сигнальной последовательности для некоторых представителей семейства.

Созданы плазмидные векторы, экспрессирующие гликопротеины G1 и G2 хантавирусов Andes и Sin Nombre. Иммунофлуоресцентный анализ с применением специфичных АТ к антигенам хантавирусов и АТ к ЭР и АГ показал, что локализация обоих гликопротеинов (G1 и G2) хантавирусов ANDV и SNV происходит в ЭР клеток и что при их независимой экспрессии не происходит дальнейшего транспорта гликопротеинов в АГ. При экспрессии двух гликопротеинов в результате ко-трансфекции двух экспрессионных плазмид (для вирусов ANDV и SNV) или в результате экспрессии полного предшественника гликопротеинов GPC, содержащего оба гликопротеина (для вируса ANDV), характер внутриклеточного транспорта гликопротеинов напоминал их естественную локализацию в АГ.

Одна из перспективных задач вирусологии — предсказание возникновения новых штаммов вирусов вследствие естественных процессов обмена генетического материала. Возможные штаммы-реассортанты могут обладать новыми биологическими свойствами, в том числе повышенной патогенностью или способностью инфицировать виды, отличные от первоначальных естественных организмов-хозяев. Для оценки потенциальной возможности генетического реассортмента двух патогенных штаммов хантавирусов в работе проведён анализ взаимодействия

гликопротеинов разных хантавирусов (ANDV и SNV). Показано, что гликопротеины G1 и G2 хантавирусов могут взаимодействовать в любых комбинациях с образованием транспортируемых в АГ комплексов. Полученные данные свидетельствуют о том, что именно конформация образуемого комплекса G1/G2 скорее всего отвечает за правильную транспортировку и удержание комплекса в АГ. Транспорт и локализация гликопротеинов G1 и G2 при экспрессии с различных плазмид соответствует локализации гликопротеинов ANDV и SNV в инфицированных клетках Vero-E6 и первичной культуре клеток эндотелия лёгких человека.

Нейротравма, ишемические инсульты, нейродегенеративные заболевания сопровождаются гибелью нейронов, дегенерацией аксонов, нарушением коммуникаций в нейронных сетях и контролируемых ими функций. Для предотвращения вторичной дегенерации и поддержания роста нервных волокон возможно применение молекулярно-генетических и клеточных технологий. Молекулярно-генетические методы направлены на подавление или усиление экспрессии гена-мишени. Ранее плазмидные и вирусные векторы применяли преимущественно для экспрессии клонированных генов, продукт которых может оказать положительный терапевтический эффект при конкретном заболевании. В настоящее время для повышения эффективности доставки в область повреждения нервной ткани факторов, поддерживающих выживание нейронов и рост нервных волокон, активно исследуют возможность применения генетически модифицированных клеток, трансфицированных генами нейротрофических факторов. Стволовые клетки, экспрессирующие клонированный ген, могут значительно усилить терапевтический эффект трансплантированных клеток и регенераторный потенциал органа-мишени. Основанием для трансплантации стволовых клеток пуповинной крови для стимуляции регенерации нервной ткани служит их пригодность как для аллотрансплантации, так и для аутоотрансплантации у человека, их низкая иммуногенность, доступность, простота получения и хранения.

Данная работа связана с получением генетически модифицированных мононуклеарных клеток пуповинной крови для лечения трансгенных B6SJL-Tg(SOD1-G93A)dl1Gur/J мышей с фенотипом бокового амиотрофического склероза человека. Созданы плазмидные конструкции, экспрессирующие гены зелёного флуоресцентного белка EGFP, нейрональной молекулы адгезии L1 и сосудистого эндотелиального фактора роста VEGF. Мононуклеарные клетки крови пуповины были подвергнуты генной модификации путём трансфекции полученными плазмидными векторами.

Трансплантация клеток крови пуповины, трансфицированных плазмидами, экспрессирующими EGFP, показала, что трансплантированные клетки мигрируют в нервную ткань спинного и головного мозга и сохраняют способность к экспрессии клонированного гена. Оценка клинической эффективности введения мононуклеарной фракции клеток,

трансфицированных плазмидными векторами, экспрессирующими клонированные нейральную молекулу адгезии L1 и сосудистый эндотелиальный фактор роста VEGF, подтвердила правильность предположений о возможной эффективности предлагаемого метода в лечении бокового амиотрофического склероза на модели трансгенных мышей. Установлено, что генетически модифицированные моноклеарные клетки пуповинной крови человека, экспрессирующие сосудистый эндотелиальный фактор роста VEGF человека и нейрональную молекулу адгезии L1 мыши, мигрируют в места нейродегенерации, пролиферируют и дифференцируются в эндотелиальные клетки с образованием новых кровеносных сосудов. Остальные HN-позитивные, но при этом CD34-негативные клетки, по-видимому, могут дифференцироваться в других направлениях или существовать на стадии прогениторных клеток среди эндотелиальных клеток стенки кровеносных сосудов.

Лечение нейродегенеративных заболеваний, чей патогенез обусловлен мутациями конкретных генов, требует вмешательства в организм больного на генетическом уровне. Методы генной терапии позволяют снизить уровень экспрессии мутантного гена-мишени, что в теории должно привести к ремиссии. В настоящее время для коррекции экспрессии гена-мишени существует ряд подходов, таких как антисмысловые олигонуклеотиды и РНК-интерференция.

Нами впервые была выполнена трансфекция siRNA в аксоны мотонейронов поясничного отдела спинного мозга мышей G93A путём аппликации siRNA, комплементарной мРНК мутантного гена человека *sod1*, на центральный отрезок перерезанного седалищного нерва. Аппликация *sod1*-специфичной siRNA приводила к значительному снижению количества мРНК *sod1* в соответствующей части спинного мозга. Таким образом, siRNA путём интернализации попадает в аксоны мотонейронов, ретроградно транспортируется в перикарионы и блокирует трансляцию aberrантного SOD1.

Таким образом, нами разработаны различные вирусные и невирусные методы доставки в организм рекомбинантных нуклеиновых кислот. Методы генной терапии (в том числе предложенные нами подходы) позволяют решать широкий спектр задач, таких как иммунизация организма против вирусных инфекций, исследование молекулярных механизмов внутриклеточного цикла патогенных вирусов, регуляция экспрессии рекомбинантных белков, повышающих терапевтический потенциал генетически модифицированных клеток, и коррекцию наследственных заболеваний с помощью РНК-интерференции.

ВЫВОДЫ

1. Впервые на основе цитомегаловируса *Peromyscus maniculatus* (PCMV) создан видоспецифичный вектор для доставки генетического материала в клетки хомячков *in vivo*.

2. Экспрессия рекомбинантных белков (гликопротеина G1 хантавируса Sin nombre и зелёного флуоресцентного белка EGFP) вызывает иммунный ответ у хомячков *Peromyscus maniculatus*. При этом существующий естественный иммунный ответ против цитомегаловируса *P. maniculatus* (PCMV) дикого типа не препятствует инфицированию рекомбинантным вирусом.

3. Делеция гена *p33* приводит к снижению репликативной активности цитомегаловируса *Peromyscus maniculatus* (PCMV), но не влияет на способность рекомбинантного вируса инфицировать иммунокомпетентных животных и устанавливать латентную инфекцию.

4. Созданы генетические конструкции для экспрессии гликопротеинов хантавирусов ANDV и SNV в эукариотических клетках. Установлено, что раздельная экспрессии гликопротеинов приводит к их нехарактерной локализации в эндоплазматическом ретикулуме. В тоже время коэкспрессия гликопротеинов G1 и G2 вирусов ANDV или SNV приводила к их концентрации в аппарате Гольджи — естественном месте локализации при хантавирусной инфекции, а коэкспрессия гликопротеинов G1 и G2 разных хантавирусов в одной клетке приводит к функциональному взаимодействию гликопротеинов с образованием гетеродуплекса, обладающего способностью к естественному процессированию и локализации в аппарате Гольджи.

5. Впервые создана невирусная генетическая конструкция, одновременно и независимо экспрессирующая нейральную молекулу адгезии (L1CAM) и сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF).

6. Клетки мононуклеарной фракции пуповинной крови человека, генетически модифицированные плазмидными векторами, экспрессирующими гены нейральной молекулы адгезии (L1CAM) и сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), после трансплантации трансгенным мышам G93A дифференцируются в эндотелиальные клетки и участвуют в формировании новых кровеносных сосудов.

7. Впервые проведена операция по прямой аппликации препаратов siRNA на центральный участок перерезанного седалищного нерва трансгенных мышей, экспрессирующих фенотип бокового амиотрофического склероза, и показано, что siRNA приводит к специфическому снижению количества мРНК мутантного гена *sod1* человека в поясничном отделе спинного мозга трансгенных мышей G93A.

Список основных публикаций по теме диссертации в журналах, рекомендованных ВАК для защиты докторских диссертаций:

1. Rizvanov, A.A. Generation of a recombinant *Peromyscus maniculatis* cytomegalovirus for expression of a hantavirus glycoprotein / A.A. Rizvanov, A.G.M. Van Geelen, S.P. Morzunov, E.W. Otteson, G.S. Pari, M.C. Bohlman, S.C.St Jeor // Journal of Virology. – 2003. – V.77. – P.12203-12210.

2. Khaiboullina, S.F. Regulation of cellular gene expression in endothelial cells by sin nombre and prospect hill viruses / S.F. Khaiboullina, A.A. Rizvanov, E. Otteson, A. Miyazato, J. Maciejewski, S.St Jeor // Viral Immunology. – 2004. – V.17. – P.234-251.

3. Rizvanov, A.A. Development of reassortant viruses between pathogenic hantavirus strains / A.A. Rizvanov, S.F. Khaiboullina, S.St Jeor // Virology. – 2004. – V.327. – P.225-232.

4. Deyde, V. Identification of a monoclonal antibody from *Peromyscus maniculatus* (deer mouse) cytomegalovirus (PCMV) which binds to a protein with homology to the human CMV matrix protein HCMV pp71 / V. Deyde, A. Rizvanov, E. Otteson, S. Brandt, M. Bego, G. Pari, T. Kozel, S.St Jeor // Journal of Virological Methods. – 2005. – V.123. – P.9-15.

5. Khaiboullina, S.F. Andes virus stimulates interferon-inducible MxA protein expression in endothelial cells / S.F. Khaiboullina, A.A. Rizvanov, V.M. Deyde, S.C.St Jeor // Journal of Medical Virology. – 2005. – V.75. - P.267-275.

6. Deyde V.M., Interactions and trafficking of Andes and Sin Nombre Hantavirus glycoproteins G1 and G2 / V.M. Deyde, A.A. Rizvanov, J. Chase, E.W. Otteson, S.C.St Jeor // Virology. – 2005. – V.331. – P.307-315.

7. Khaiboullina, S.F. Yellow fever virus strains Asibi and 17d-204 infect human umbilical cord endothelial cells and induce novel changes in gene expression // S.F. Khaiboullina, A.A. Rizvanov, M.R. Holbrook, S. St Jeor // Virology. – 2005. – V.342. – P.167-176.

8. Rizvanov, A.A. Replication and immunoactivity of the recombinant *Peromyscus maniculatus* cytomegalovirus expressing hantavirus G1 glycoprotein in vivo and in vitro / A.A. Rizvanov, S.F. Khaiboullina, A.G. van Geelen, S.C.St Jeor // Vaccine. – 2006. – V.24. – P.327-334.

9. Исламов, Р.Р. РНК-интерференция в регуляции аксонного транспорта / Р.Р. Исламов, А.А. Ризванов, Ю.А. Челышев, А.К. Мурашов // Успехи физиологических наук. – 2007. – Т.38, №3. – С.47-56.

10. Исламов, Р.Р. Генная и клеточная терапия нейродегенеративных заболеваний / Р.Р. Исламов, А.А. Ризванов, Д.С. Гусева, А.П. Киясов // Клеточная Трансплантология и Тканевая Инженерия. – 2007. – Т.2, №3. – С.21-37.

11. Rizvanov, A.A. Human umbilical cord blood cells transfected with VEGF, L1CAM do not differentiate into neurons but transform into vascular endothelial cells and secrete neuro-trophic factors to support neuro-genesis – a novel approach in stem cell therapy/ A.A. Rizvanov, A.P. Kiyasov, I.M. Gaziziov,

T.S. Yilmaz, M.S. Kaligin, D.I. Andreeva, A.K. Shafigullina, D.S. Guseva, S.L. Kiselev, K. Martin, A. Palotás, R.R. Islamov // *Neurochemistry International*. – 2008. – V.53. – P.389-394.

12. Исламов, Р.Р. Боковой амиотрофический склероз: стратегия генно-клеточной терапии / Р.Р. Исламов, А.А. Ризванов, А.П. Киясов // *Неврологический вестник*. – 2008. – Т.40, №4. – С.91-101.

13. Yalvac, M.E. Comparison and optimisation of transfection of human dental follicle stem cells with different chemical methods and electro-poration / M.E. Yalvac, M. Ramazanoglu, Z.O. Gumru, F. Sahin, A. Palotás, A.A. Rizvanov // *Neurochemical Research*. - 2009. – V.34. – P.1272-1277.

14. Rizvanov, A.A. Retrogradely transported siRNA silences human mutant SOD(1) in spinal cord motor neurons / A.A. Rizvanov, M.A. Mukhamedyarov, A. Palotás, R.R. Islamov // *Experimental Brain Research*. – 2009. – V.195. – P.1-4.

15. Yalvac, M.E. Potential role of dental stem cells in the cellular therapy of cerebral ischemia / M.E. Yalvac, A.A. Rizvanov, E. Kilic, F. Sahin, M.A. Mukhamedyarov, R.R. Islamov, A. Palotás // *Current Pharmaceutical Design*. – 2009. – V.15. – P.3908-3916.

16. Ризванов, А. Адипоциты костного мозга являются ингибиторами гемопоэтического микроокружения / А. Ризванов // *Клеточная Трансплантология и Тканевая Инженерия*. – 2009. – Т.4, №3. – С.31-32.

Список основных докладов и материалов конференций:

1. Van Geelen, A.G.M. The Deer Mouse-Specific Cytomegalovirus as a Vector for In Vivo Expression of Sin Nombre Virus Glycoproteins / A.G.M. Van Geelen, M.C. Bohlman, A.A. Rizvanov, S.P. Morzunov and S.C. St Jeor // *American Society for Virology, 17th Annual Meeting*. – Vancouver, B.C., Canada, 1998. – P.71.

2. Rizvanov, A. Cloning Of Sin Nombre Hantavirus Glycoproteins / A. Rizvanov, S. Morzunov, S. St. Jeor // *The University of Nevada, Reno, Life Sciences Research Retreat*. – Granlibakken, Lake Tahoe, California. 1999. – P.7.

3. Rizvanov, A.A. In Vitro and In Vivo Expression of Sin Nobre Virus glycoprotein G1 Using A Peromyscus Cytomegalovirus (PCMV) expression system / A.A. Rizvanov and S.C. St. Jeor // *The University of Nevada, Reno, Life Sciences Research Retreat*. – Granlibakken, Lake Tahoe, California. 2000. – P.11.

4. Van Geelen, A.G.M. Expression of Hantavirus Glycoproteins in Deer Mice / A.G.M. van Geelen, A.A. Rizvanov, S.P. Morzunov, M.C. Bohlman, G.S. Pari and S.C. St. Jeor // *Keystone Sumposia (Cellular and Molecular Biology - Genetics, Pathogenesis and Ecology of Emerging Viral Diseases)*. – Taos, NV, 2000. – P.88.

5. Immunization of Deer Mice with a Cytomegalovirus Vector Expressing Hantavirus Glycoproteins – Exposure to Wild Type Virus Does Not Protect Against Infection with Recombinant Virus / St Jeor, S., A. Rizvanov, A. van

Geelen and E. Otteson // 8th International Cytomegalovirus Conference. – Monterey, CA, 2001. – P.56.

6. Rizvanov, A.A. Expression of Sin Nombre Virus Glycoprotein Using a Peromyscus Cytomegalovirus (PCMV) expression system / A.A. Rizvanov, A.G.M. van Geelen, E. Otteson, S.P. Morzunov, M.C. Bohlman, G.S. Pari, S.C. St Jeor // American Society for Virology, 20th Annual Meeting. – Madison, Wisconsin, 2001. – P.103.

7. Rizvanov, A.A. Expression of Sin Nombre Virus Glycoprotein G1 Using A Peromyscus Cytomegalovirus (PCMV) Expression System / A.A. Rizvanov and S. St Jeor // The University of Nevada, Reno, Life Sciences Research Retreat. – Granlibakken, Lake Tahoe, California, 2002. – P.15.

8. St Jeor, S.C. Cytomegalovirus as a vector for expression and immunization against hantavirus glycoproteins / S.C. St Jeor, A. Rizvanov and A. vanGeelen // 27th International Herpesvirus Workshop. – Cairns Convention Centre, Australia, 2002. – P.65.

9. Deyde, V.M. Expression and localization of Andes and Sin Nombre viruses' glycoproteins G1 and G2 / V.M. Deyde, E. Otteson, A. Rizvanov, and S. St. Jeor // American Society for Virology, 22nd Annual Meeting. – UC Davis, Davis, California, 2003. – P.79.

10. Rizvanov, A.A. Cell type dependent differences in hantavirus replication / A.A. Rizvanov, S.F. Khaiboullina, and S. St. Jeor // American Society for Virology, 22nd Annual Meeting. – UC Davis, Davis, California, 2003. – P.87.

11. Deyde, V.M. Interactions and trafficking of Andes and Sin Nombre virus glycoproteins / V.M. Deyde, A.A. Rizvanov, J. Chase, E. Otteson, and S.C. St Jeor // The University of Nevada, Reno, Life Sciences Research Retreat. – Granlibakken, Lake Tahoe, California, 2003. – P.5.

12. Khaiboullina, S.F. Andes virus stimulated MxA protein expression in endothelial cells / S.F. Khaiboullina, V.M. Deyde, A.A. Rizvanov, and S St Jeor // In Abstracts of the Sixth International Conference on HFRS, HPS and Hantaviruses. – Seoul, Republic of Korea, 2004. – P.94.

13. Khaiboullina, S.F. Andes virus stimulated MxA protein expression in endothelial cells / S.F. Khaiboullina, V.M. Deyde, A.A. Rizvanov, and S St Jeor // In Abstracts of the ASM Meeting. Viral Immune Evasion. – Acapulco, Mexico, 2005. – P.52.

14. Bego, M. Study of human cytomegalovirus latency in hematopoietic cells / M. Bego, J. Maciejewski, S. Khaiboullina, A. Rizvanov, and S. St Jeor // 30th International Herpesvirus Workshop –Turku, Finland, 2005. – P.46.

15. Association of Hantavirus Glycoprotein (Gn) with Nucleocapsids in the final stages of viral assembly / D.M. Boudreaux, S.F. Khaiboullina, A. Rizvanov, S. C. St. Jeor. // The University of Nevada, Reno, Life Sciences Research Retreat at Granlibakken. – Tahoe City, 2006. – P.14.

16. Ризванов, А.А. Клеточная терапия генетически модифицированными стволовыми клетками пуповинной крови трансгенных G93A мышей,

экспрессирующих фенотип бокового амиотрофического склероза. / А.А. Ризванов, Т.М. Мазитов, Р.Р. Исламов // Всероссийская научно-практическая конференция "Молодые ученые в медицине". – Казань, 2007. – С.304-305.

17. Abdullin, T.I. Nanomaterials In Biomolecules Delivery: Characterization Of Nucleic Acids – Carbon Nanotubes Interactions. / T.I. Abdullin, I.I. Nikitina, O.V. Bondar, A.A. Ризванов // Gene Therapy Symposium. – Yeditipe University campus, Istanbul, Turkey, 2007. – P.31.

18. Киясов, А.П. Клеточная терапия генетически модифицированными стволовыми клетками пуповинной крови трансгенных G93A мышей, экспрессирующих фенотип бокового амиотрофического склероза. ГК_02.512.11.2052. / А.П. Киясов, Р.Р. Исламов, А.А. Ризванов, Д.С. Гусева, Н.В. Бойчук, А.А. Гумерова, М.А. Титова, С.Р. Абдулхаков, Р.Ф. Гайфуллина, М.С. Калигин, И.М. Газизов, Т.С. Йылмаз, Д.И. Андреева, О.А. Назарова, Д.А. Бикмухаметов, Г.Р. Бурганова, Г.О. Певнеев, Т.М. Мазитов, Н.И. Ланник, Н.В. Кудряшова, А.К. Шафигуллина, Д.Ш. Юнусов. // Итоговая конференция по результатам выполнения мероприятий за 2007 год в рамках приоритетного направления "Живые системы" ФЦП "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы". – Москва, 2007. – С.65-66.

19. Газизов, И.М. Пути миграции и дифференцировки генетически модифицированных стволовых клеток пуповинной крови человека после трансплантации G93A мышам. / И.М. Газизов, М.С. Калигин, Т.С. Йылмаз, И.М., Д.И. Андреева, А.А. Ризванов. // XIII Всероссийская научно-практическая конференция «Молодые ученые в медицине». – Казань, 2008. – С.197-198.

20. Шафигуллина, А.К. Генная и клеточная терапия бокового амиотрофического склероза. / А.К. Шафигуллина, Д.Ш. Юнусов, Н.И. Ланник, А.А. Ризванов. // Первая городская студенческая конференция «Междисциплинарные исследования в области естественных наук»: Сборник тезисов. – Казань, 2008. – С.15.

21. Yalvac, M.E. Transfection Optimisation of Human Dental Follicle Cells With Different Lipofection Methods and Electroporation. / M.E. Yalvac, M. Ramazanoglu, F. Sahin, R.I. Zhdanov, A.A. Rizvanov. // 14th International Biomedical Science and Technology Symposium. – Mugla, Turkey, 2008. – P.117.

22. Rizvanov, A.A. Human Umbilical Cord Blood Cells Genetically Modified With VEGF and L1CAM Differentiate Into Endothelial Cells Upon Transplantation In Mouse ALS Model. / A.A. Rizvanov, M.E. Yalvac, I.M. Gaziziov, T.S. Yilmaz, M.S. Kaligin, A.K. Shafigullina, D.S. Guseva, F. Sahin, R.I. Zhdanov, S.L. Kiselev, A. Palotas, A.P. Kiyasov, R.R. Islamov // 14th International Biomedical Science and Technology Symposium. – Mugla, Turkey, 2008. – P.122-124.

23. Шафигуллина, А.К. Генетически модифицированные клетки пуповинной крови дифференцируют в клетки эндотелия после трансплантации трансгенным мышам, экспрессирующим фенотип бокового амиотрофического склероза. /А.К. Шафигуллина, Д.И. Андреева, И.М. Газизов, Т.С. Йылмаз, М.С. Калигин, Д.С. Гусева, Д.Ш. Юнусов, Н.И. Ланник, И.И. Салафутдинов, А.П. Киясов, А.А. Ризванов, Р.Р. Исламов // I Всероссийский конгресс студентов и аспирантов биологов “Симбиоз-Россия 2008”: Сборник статей. – Казань, 2008. – С.123-125.

24. Ризванов, А.А. Трансфекция siRNA в аксоны мотонейронов поясничного отдела спинного мозга G93A трансгенных мышей селективно блокирует экспрессию мутантного гена SOD1 / А.А. Ризванов, М.А. Мухамедьяров, Н.И. Ланник, Р.Р. Исламов // Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии: Материалы II Международной научно-практической конференции. – Казань, 2008. – С.110.

25. Юнусов, Д.Ш. Трансфекция и Экспрессия изоформ сосудистого эндотелиального фактора роста человека VEGF121, VEGF165, VEGF189 в культуре мезенхимальных стволовых клеток / Д.Ш. Юнусов, И.И. Салафутдинов, А.К. Шафигуллина, М.Э. Ялвач, Н.И. Ланник, А.П. Киясов, Р.Р. Исламов, А.А. Ризванов // Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии: Материалы II Международной научно-практической конференции. – Казань, 2008. – С.144.

26. Челышев, Ю.А. Восстановление двигательной функции при трансплантации в область гемисекции спинного мозга крысы клеток обонятельной выстилки или моноклеарных клеток крови пуповины человека / Ю.А. Челышев, Г.Ф. Шаймарданова, Г.А. Масгутова, И.В. Викторов, Е.А. Савченко, А.А. Ризванов, Р.Р. Исламов, А.П. Киясов, И.М. Газизов, Т.С. Йылмаз, М.С. Калигин, А.К. Шафигуллина, Н.И. Ланник, Д.И. Андреева // Инновационные технологии в трансплантации органов, тканей и клеток. – Самара, 2008. – С. 232-234.

27. Мухамедьяров, М.А. Нанотехнологии в медицине: применение РНК-интерференции для лечения нейродегенеративных заболеваний. / М.А. Мухамедьяров, А.А. Ризванов, А.Л. Зефилов, Р.Р. Исламов // Материалы Международного Форума по нанотехнологиям'08: Сборник тезисов докладов участников Международного конкурса научных работ молодых ученых в области нанотехнологий. – Москва, 2008. – С.598-600.

28. Салафутдинов, И.И. Трансфекция и экспрессия ангиогенного и нейротрофического фактора VEGF и нейтральной молекулы адгезии L1CAM в клетки моноклеарной фракции пуповинной крови человека / И.И. Салафутдинов, А.К. Шафигуллина, Д.Ш. Юнусов, А.П. Киясов, А.А. Ризванов // XIV Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молодые ученые в медицине». – Казань, 2009. – С.174

29. Шафигуллина, А.К. Морфологический и молекулярно-генетический анализ мезенхимальных стволовых клеток, выделенных из зачатков зубов мудрости человека / А.К. Шафигуллина, М.Э. Ялвач, Р.Р. Исламов, А.П. Киясов, Ф.Шахин, А.А. Ризванов // II Всероссийский с международным участием конгресс студентов и аспирантов-биологов Симбиоз Россия 2009. – Казань, 2009. – С. 324-325

30. Rizvanov A.A. Current trends in Gene and Stem Cell Therapy applications / A.A. Rizvanov, A.P. Kiyasov // The 13th annual Symposium for Biology Students of Europe «SymBioSE 2009» «Biology: Expansion of Borders». – Kazan, 2009. - P.41.

31. Челышев Ю.А. Клеточные технологии стимулирования посттравматической регенерации спинного мозга / Ю.А. Челышев, Г.Ф. Шаймарданова, Р.Ф. Масгутов, Г.А. Масгутова, А.А. Ризванов, Я.О. Рубашкина // РАМН Международная ассоциация морфологов. VI съезд анатомов гистологов и эмбриологов России.– Морфология. – Саратов, 23-25 сентября 2009г. – Т.136, № 4. – С.150-151.

32. Ризванов А.А. Генная и клеточная терапия бокового амиотрофического склероза / А.А. Ризванов, М.А. Мухамедьяров, А.П. Киясов, Р.Р. Исламов // Международная научная конференция по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии, посвященная 75-летию со дня рождения академика Юрия Анатольевича Овчинникова, 28 сентября – 1 октября. – г.Москва – Пущино, 2009г. – С.202-203.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выделение, создание и анализ рекомбинантного цитомегаловируса из *Peromyscus maniculatus* выполнено совместно с Альбертом ван Гиленом (Университет штата Невада, г. Рено, США). Филогенетический анализ цитомегаловируса из *Peromyscus maniculatus* выполнен совместно с д.б.н. Морзуновым С.П. (Университет штата Невада, г. Рено, США). Исследование влияния вирусной инфекции на клеточные процессы проводили совместно с к.б.н. Хабибуллиной С.Ф. (Университет штата Невада, г. Рено, США). Исследования по взаимодействию и созреванию хантавирусных гликопротеинов проводили совместно с Деид В.М. (Университет штата Невада, г. Рено, США). Исследования по трансплантации генетически модифицированных клеток животным и последующий функциональный и гистологический анализ проводили на кафедре нормальной анатомии Казанского государственного медицинского университета (КГМУ) под руководством зав. каф. д.м.н., профессора Киясова А.П. и на кафедре гистологии КГМУ под руководством д.м.н., профессора Исламова Р.Р. Хирургические операции на седалищном нерве мышей и введение siRNA проводили совместно с ассистентом кафедры нормальной физиологии КГМУ к.м.н. Мухамедьяровым М.А.

Автор выражает глубокую благодарность профессору Андрею Павловичу Киясову, профессору Владимиру Алексеевичу Анохину, а также научному консультанту профессору Рустему Робертовичу Исламову за постоянную поддержку и наставничество; профессору Анатолию Ивановичу Голубеву и профессору Борису Ивановичу Барабанщикову за активное участие в выборе жизненного пути и в становлении, как учёного.

Автор тепло благодарит семью, супругу Фариду и дочурку Карину за поддержку и любовь. Автор посвящает работу своей матери Зайнаб Шамилевне Ризвановой, в которой он всегда находил поддержку и понимание, а также светлой памяти дау-ани (бабушки) Кафии Гаязовны Мансуровой, чьё самопожертвование и любовь не имели границ.