

Хасанов Ш. А.,

Федеральное бюджетное учреждение науки
«Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии
и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере за-
щиты прав потребителей и благополучия человека
Санкт-Петербургский государственный университет
shokhrukhasanov@gmail.com

Волобуева А. С.,

Федеральное бюджетное учреждение науки
«Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии
и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере за-
щиты прав потребителей и благополучия человека
sasha-khrupina@mail.ru

Есаулкова Я. Л.,

Федеральное бюджетное учреждение науки
«Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии
и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере за-
щиты прав потребителей и благополучия человека
IanaEsaulkova@gmail.com

Khasanov S. A.,

Saint-Petersburg Pasteur Institute
Saint-Petersburg State University
shokhrukhasanov@gmail.com

Volobueva A. S.,

Saint-Petersburg Pasteur Institute
sasha-khrupina@mail.ru

Esaulkova I. L.,

Saint-Petersburg Pasteur Institute
IanaEsaulkova@gmail.com

ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ЛЕНТИВИРУСОВ, НЕСУЩИХ ГЕНЫ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ

PRODUCTION PROCESS OPTIMIZATION OF LENTIVIRUSES CARRYING FLUORESCENCE PROTEINS GENES

Аннотация. Перенос генетической информации в эукариотические клетки с использованием вирусных и невирусных векторов является известным методом генетической инженерии. Среди вирусных систем доставки трансгенов особое место занимают рекомбинантные лентивирусные частицы, полученные на основе ВИЧ-1. В данном исследовании путем трансфекции линии HEK293T лентивирусными плазмидами второго поколения были получены рекомбинантные псевдотипированные лентивирусные частицы с генами флуоресцентных белков eGFP и mCherry и изучена их трансдуцирующая способность *in vitro*. Анализ эффективности трансдукции выполняли с использованием мультимодального имаджера-ридера Cytation 5. Согласно полученным результатам, наибольшая трансдуцирующая активность была отмечена для лентивирусных векторов, отобранных в точке 48 часов после трансфекции. Результаты исследования могут быть использованы, в частности, для получения трансгенных клеточных линий, экспрессирующих флуоресцентные маркерные белки.

Ключевые слова: перенос генов, трансфекция, трансдукция, лентивирусы, eGFP, mCherry

Abstract. Gene transfer into eukaryotic cells using viral and non-viral vectors is a well-known method of genetic engineering. Among viral transgene delivery systems, recombinant lentiviral particles derived from HIV-1 are of special interest. In this study, recombinant lentiviral particles bearing genes of eGFP and mCherry were obtained by transfecting the HEK293T line with second-generation lentiviral plasmids and their transducing ability was analyzed *in vitro* using Cytation 5. According to the results obtained, the highest transducing activity was detected for lentiviral vectors, which were produced at 48 hours timepoint after

transfection. The results of the study can be used, in particular, in establishment of transgenic cell lines expressing fluorescent reporter proteins.

Keywords: gene transfer, transfection, transduction, lentivirus, eGFP, mCherry

Введение

Перенос генетической информации в эукариотические клетки с помощью вирусных и невирусных систем доставки — один из самых важных методов молекулярной и клеточной биологии. Среди вирусных систем доставки особое место занимают рекомбинантные псевдотипированные лентивирусы (ЛВ), несущие на своей липидной оболочке гликопротеин вируса везикулярного стоматита (VSV.G) и обладающие наибольшей способностью заражать эукариотические клетки. У ЛВ векторов есть несколько преимуществ: они могут включать генетические конструкции размером до 10 тысяч нуклеотидов [1], трансдуцировать как делящиеся, так и неделящиеся клетки и обеспечивать стабильную экспрессию трансгена благодаря способности интегрироваться в геном клетки, при этом они не могут реплицироваться в живых системах. Выделяют четыре поколения лентивирусных векторов, которые различаются количеством генетических конструкций, набором генов ВИЧ-1, а также количеством и типом регуляторных элементов, которые определяют титр и безопасность рекомбинантных ЛВ [2]. Первое поколение ЛВ используется редко, второе и третье поколения ЛВ активно применяются для научно-исследовательских целей. Четвертое поколение ЛВ может быть использовано для генной терапии благодаря неспособности интегрироваться в геном человека [3].

Представленное исследование было направлено на оптимизацию этапов получения рекомбинантных ЛВ. В исследовании были получены и охарактеризованы препараты псевдотипированных VSV.G ЛВ с генами флуоресцентных белков eGFP или mCherry посредством трансфекции клеточной линии НЕК293Т генетическими конструкциями второго поколения.

Результаты и обсуждение

Значения интенсивности флуоресценции и фотографии клеток HEK293T, трансдуцированных полученными ЛВ dHIV-VSV.G-eGFP и dHIV-VSV.G-mCherry, представлены на рис. 1 и рис. 2 ниже. Согласно полученным данным, наблюдается следующая динамика изменения эффективности трансдукции в зависимости от времени отбора ЛВ после трансфекции. Высокий уровень флуоресценции отмечается для клеток, трансдуцированных препаратами ЛВ dHIV-VSV.G-eGFP и dHIV-VSV.G-mCherry, которые были отобраны уже в точке 24 часа после трансфекции. Однако максимальная интенсивность флуоресценции достигается в клетках HEK293T после трансдукции препаратами dHIV-VSV.G-eGFP и dHIV-VSV.G-mCherry, полученными в точке 48 часов после трансфекции. Эффективность трансдукции клеток образцами ЛВ, отобранных в точках 72 и 96 часов после трансфекции, постепенно падает, что свидетельствует о снижении выхода ЛВ в культуральную жидкость позже 48 часов после выполнения процедуры трансфекции.

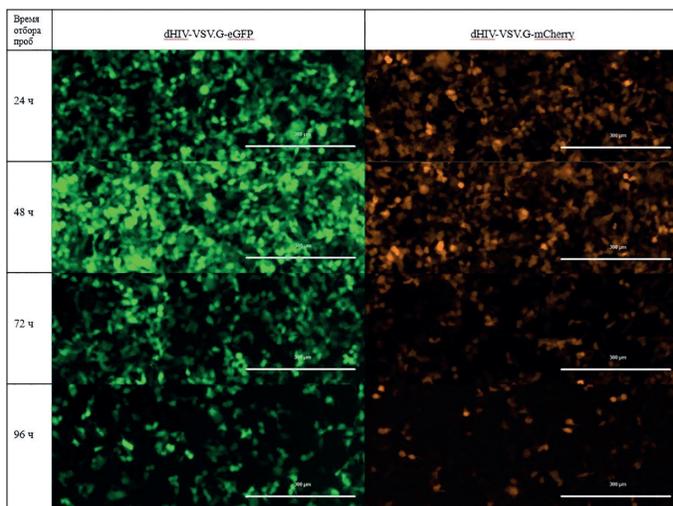


Рис. 1. Результаты анализа эффективности трансдукции методом флуоресцентной микроскопии клеток HEK293T, трансдуцированных рекомбинантными лентивирусами dHIV-

VSV.G-eGFP и dHIV-VSV.G-mCherry, отобранных в разные временные точки после трансфекции.

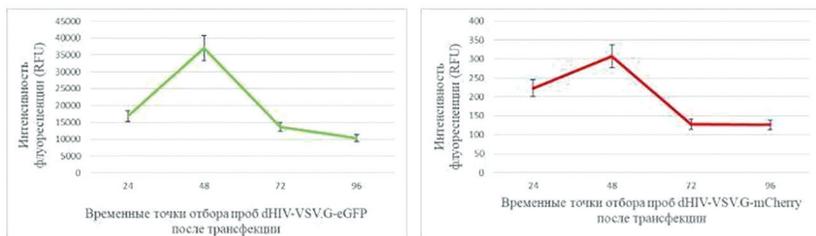


Рис. 2 Динамика изменения флуоресцентного сигнала в клетках HEK293T, трансдуцированных рекомбинантными лентивирусами dHIV-VSV.G-eGFP и dHIV-VSV.G-mCherry, отобранных в разные временные точки после трансфекции.

Результаты представлены в виде среднего \pm стандартного отклонения в трех независимых экспериментах за вычетом фоновой автофлуоресценции нетрансдуцированных клеток HEK293T.

ЛВ вектора являются незаменимым инструментом для технологии переноса генов в линии клеток эукариот. Псевдотипирование вирусных векторов гликопротеином вируса везикулярного стоматита (VSV-G) позволяет осуществить доставку трансгена в широкий спектр клеточных культур. Одним из показателей успешной сборки лентивирусных векторов являются результаты трансдукции собранными лентивирусами клеточных культур. В настоящей работе была проведена сборка лентивирусных векторов dHIV-VSV.G-eGFP и dHIV-VSV.G-mCherry с использованием плазмид второго поколения и выполнен анализ динамики интенсивности флуоресцентного сигнала после трансдукции этими векторами линии HEK293T. Показано, что наибольшая эффективность трансдукции обеспечивается при использовании вирусодержащего материала, полученного в точке 48 часов после трансфекции. Результаты исследования могут быть использованы для решения задач по переносу трансгенного белка в составе лентивирусных векторов в клетки-мишени, в частности, для получе-

ния трансгенных клеточных линий, экспрессирующих флуоресцентные маркерные белки.

Материалы и методы

За 24 часа до трансфекции рассевали клетки НЕК293Т (ATCC CRL-3216) на 6-луночный планшет по 800 тыс. клеток на лунку в объеме 2 мл среды DMEM с добавлением 10% FBS (ростовая среда). По достижении клетками конfluenceности 70% из лунок планшета отбирали ростовую среду и добавляли по 1 мл среды DMEM без FBS. Для приготовления смеси для трансфекции использовали среду DMEM и реагент GenJect-39 (1,5 мкл на каждую трансфицирующую смесь). Трансфекцию выполняли согласно инструкции производителя GenJect-39. Использовали следующие количества ДНК: по 500 нг плазмиды pMD2.G (Addgene plasmid # 12259), 1000 нг плазмиды psPAX2 (Addgene plasmid # 12260), 1250 нг плазмиды LeGO-iG2 (Addgene plasmid # 27341) для сборки dHIV-VSV.G-eGFP или 1250 нг pLV-mCherry (Addgene plasmid # 36084) для сборки dHIV-VSV.G-mCherry, соответственно. Через 5 часов после добавления трансфицирующей смеси в лунках планшета проводили замену среды для трансфекции на ростовую среду. Затем через 24, 48, 72 и 96 часов после трансфекции из каждой лунки планшета в индивидуальные пробирки отбирали весь объем среды с рекомбинантными ЛВ и в лунки планшета добавляли по 2 мл свежей ростовой среды. Осаждали клеточный дебрис путем центрифугирования (5 мин, 1000 об/мин), надосадочную жидкость, содержащую рекомбинантные ЛВ, пропускали через шприцевые фильтры (размер пор 0,22 мкм) для очистки препарата ЛВ перед трансдукцией.

За 24 часа до трансдукции клетки НЕК293Т рассевали на 24-луночный планшет по 150 тыс. клеток в объеме 1 мл ростовой среды на лунку. В день трансдукции из лунок планшета отбирали ростовую среду и добавляли к клеткам по 1 мл среды с очищенными препаратами ЛВ. Анализ эффективности трансдукции выполняли через 48 часов с использованием цифрового имажера/ридера Cytation 5 (Biotek). Эффективность трансдукции оценивали в режиме мультимодального ридера по интенсивно-

сти флуоресценции трансгенного белка при длине волны 520 нм (eGFP) или 616 нм (mCherry). В качестве негативного контроля (фон) использовали нетрансдуцированные ЛВ клетки НЕК293Т. Этапы эксперимента схематично представлены на рис. 3.

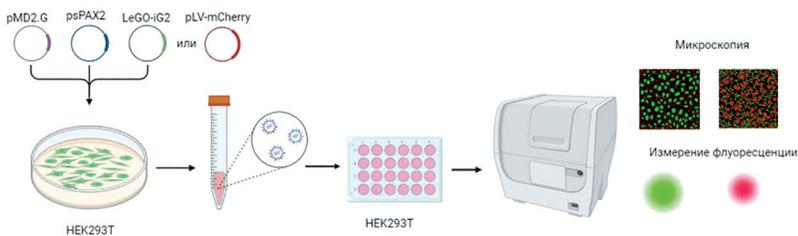


Рис. 3. Схема эксперимента по оптимизации протокола производства лентивирусов.

Заключение

В данном исследовании была проведена оптимизация этапов получения рекомбинантных ЛВ и были получены и охарактеризованы препараты псевдотипированных VSV.G ЛВ с генами флуоресцентных белков eGFP или mCherry. Согласно полученным результатам, использование в качестве трансгена eGFP в составе ЛВ обеспечивает более высокий уровень сигнала флуоресценции, чем использование mCherry. Показано, что наибольшая эффективность трансдукции обеспечивается при использовании вирусодержащего материала, полученного в точке 48 часов после трансфекции.

Литература

1. Kalidasan, V., Ng, W.H., Ishola, O.A. *et al.* A guide in lentiviral vector production for hard-to-transfect cells, using cardiac-derived c-kit expressing cells as a model system // *Sci Rep.* 2011 № 11 doi:10.1038/s41598-021-98657-7

2. Hélio A. Tomás, Ana F. Rodrigues, Paula M. Alves and Ana S. Coroadinha 2013. Lentiviral Gene Therapy Vectors: Challenges and Future Directions. // *Gene Therapy — Tools and Potential Applications*. 2013 doi: 10.5772/52534
3. Gurumoorthy N, Nordin F, Tye GJ, Wan Kamarul Zaman WS, Ng MH. Non-Integrating Lentiviral Vectors in Clinical Applications: A Glance Through. // *Biomedicines*. 2022 Jan 5;10(1):107. doi: 10.3390/biomedicines10010107