

КУЗЬМИЧ АЛЕКСЕЙ ИВАНОВИЧ

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НАТРИЙ-ЙОДИДНОГО СИМПОРТЕРА (NIS) ДЛЯ
ДЕТЕКЦИИ ДОСТАВКИ ГЕНОТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ АГЕНТОВ В
ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ**

03.01.03 – Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва-2015

Работа выполнена в лаборатории структуры и функций генов человека Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН)

Научный руководитель:

Свердлов Евгений Давидович, доктор химических наук, профессор, академик РАН

Официальные оппоненты:

Янковский Николай Казимирович, доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, директор Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук

Эльдаров Михаил Александрович, кандидат биологических наук, руководитель Группы генетической инженерии грибов Института биоинженерии Федерального государственного учреждения Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук

Защита состоится 2 марта 2016 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета Д002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, ГСП-7, г. Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая 16/10.

С текстом диссертации можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук и на сайте института www.ibch.ru

Автореферат разослан « »

Ученый секретарь
Диссертационного Совета,
доктор физ.-мат. наук



В.А. Олейников

ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Направленная доставка лекарственных средств в заданные ткани и органы имеет большое значение в современной медицине. Особенно актуальна проблема направленной доставки для препаратов на основе нуклеиновых кислот (в частности генно-терапевтических препаратов, ГТП), так как нуклеиновые кислоты крайне нестабильны в крови и плохо проникают через многочисленные биологические барьеры. Использование систем доставки позволяет значительно повысить стабильность ГТП в организме, а также придать им свойства, необходимые для попадания в адресный орган или ткань и проникновения в клетки.

Всё сказанное выше особенно актуально при разработке ГТП, нацеленных на узнавание и уничтожение злокачественных опухолей. Отсутствие эффективных и безопасных систем доставки терапевтических генов в опухоли в значительной степени ограничивает клиническое применение противоопухолевых ГТП.

Разработка систем адресной доставки нуклеиновых кислот невозможна без проведения испытаний *in vivo*, которые позволяют изучать эффективность доставки генетического материала в целевые ткани, а также распределение ГТП в организме модельного животного. Эффективность доставки ГТП характеризуется не только количеством генетического материала, попавшим в целевые клетки, но также и уровнем экспрессии доставленных генов и ее продолжительностью. Прямой способ изучения распределения ГТП заключается в анализе продуктов экспрессии доставляемых генов в биоматериалах, полученных с помощью биопсии или после умерщвления животного. Однако, такие исследования являются крайне трудоемкими и требуют использования большого количества животных при изучении кинетики экспрессии. Альтернативный подход, получивший название биовизуализация, заключается в использовании специальных репортерных генов, продукты экспрессии которых в модельном организме можно детектировать с помощью неинвазивных физических методов.

Большинство неинвазивных подходов для решения данной задачи основано на регистрации флуоресценции либо люминесценции соответствующих белков-репортеров. К сожалению, данный подход ограничен низкой проникающей способностью излучения таких белков, поэтому мало применим для испытаний препаратов на больших животных (а также для клинических испытаний). Преодолеть такое ограничение можно с помощью радионуклидной визуализации белков-репортеров, основанной на регистрации излучения радиофармпрепарата, взаимодействующего с соответствующим репортером. В рамках этого подхода можно выделить репортерные системы, основанные на применении ферментов, клеточных рецепторов и белков-транспортёров. К последней группе репортеров относится натрий-йодидный симпортер (NIS).

Натрий-йодидный симпортер – трансмембранный белок, осуществляющий перенос йодид-ионов из внеклеточной среды в цитоплазму. Данный белок обнаруживается в основном в тканях щитовидной железы млекопитающих, где обеспечивает концентрирование йодида для последующего его включения в состав тиреоидных гормонов. Симпортер способен транспортировать различные изотопы йода, а также многие другие анионы, например пертехнетат (TcO_4^-). Состояние щитовидной железы легко отслеживать путем введения в организм радиофармпрепаратов на основе радиоактивных изотопов йода или технеция с последующим их обнаружением методами ядерной медицины.

Ранее было показано, что доставка гена, кодирующего NIS, в клетки различного происхождения обеспечивает эффективное концентрирование йодид-ионов, и при использовании радиоактивных изотопов йода позволяет детектировать NIS-продуцирующие клетки в организме лабораторных животных. Такой подход применим для животных больших размеров, включая человека, в силу высокой проникающей способности излучения гамма-излучающих радиоактивных изотопов. Простая структура радиофармпрепаратов для NIS

значительно удешевляет и упрощает практическое применение данного подхода. Помимо неинвазивной детекции данный симпортер можно использовать в рамках терапевтического подхода, так как накопление короткоживущих изотопов в клетках может приводить к облучению и деструкции опухолевых тканей. Приведенные свойства делают NIS уникальным белком-репортером в рамках генотерапии опухолевых заболеваний.

В ходе данной работы была создана и охарактеризована система, обеспечивающая экспрессию репортерного гена *NIS* в клетках меланомного происхождения. Была изучена взаимосвязь активности промоторов, контролирующих транскрипцию *NIS*, с активностью захвата радиоiodида клетками. Разработанная система была успешно использована для изучения эффективности системы невирусной доставки генов на модели мышинной меланомы.

Цель работы

Целью диссертационной работы стало создание репортерной системы на основе гена *NIS* и изучение особенностей ее работы в клеточных и животных моделях.

В ходе работы были поставлены следующие **задачи**:

1. Получить экспрессионные конструкции, содержащие ген натрий-йодидного симпортера крысы (*rNIS*) под контролем различных промоторов.
2. Провести оценку активности NIS, образующегося при доставке различных экспрессионных конструкций в клетки меланомного происхождения *in vitro*.
3. В экспериментах *in vitro* исследовать кинетические параметры репортерной системы на основе NIS.
4. Получить линию клеток меланомного происхождения, стабильно продуцирующую натрий-йодидный симпортер, изучить параметры детекции модифицированных меланомных клеток в организме животных.
5. Провести оценку эффективности доставки гена *NIS* в опухоли меланомы при системном введении генопрепарата в организм животных.
6. Исследовать возможность задержки йодида в клетках с помощью экспрессионных конструкций, содержащих ген лактопероксидазы мыши (LPO) для усиления внутриклеточного окисления йодида.

Научная новизна и практическая значимость работы

Настоящая работа была направлена на создание репортерной системы на основе гена *NIS* и использование ее для изучения доставки нуклеиновых кислот на модели мышинной опухоли меланомы.

В рамках данной работы была создана репортерная система на основе гена натрий-йодидного симпортера крысы, позволяющая неинвазивными методами отслеживать эффективность доставки нуклеиновых кислот в ткань опухолей животных.

На клеточных моделях меланомы мыши и человека впервые была исследована связь активности промотора, контролирующего экспрессию *NIS*, с активностью образующегося в клетках натрий-йодидного симпортера. В работе проводилось сравнение промоторов трех типов: сильного неспецифического, умеренно активного меланомоспецифического и слабых опухолеспецифических промоторов, активных в широком спектре опухолевых клеток. Было показано, что при значительных различиях в промоторной активности функциональная активность натрий-йодидного симпортера, образующегося при использовании этих промоторов, изменялась слабо. Так, использование сравнительно слабого, но меланомоспецифического промотора обеспечивало высокий уровень активности натрий-йодидного симпортера в клетках меланомы. При этом более слабые опухолеспецифические промоторы обеспечивали высокий уровень активности данного репортера только в некоторых клетках меланомного происхождения.

На клеточных моделях были изучены кинетические параметры репортерной системы на основе *NIS*. Было показано, что трансфицированные клетки, накопившие радиийодид,

быстро теряют его в среде, не содержащей радиоизотоп. Попытки увеличить время удержания радиойодида в клетках путем коэкспрессии *NIS* с геном лактопероксидазы (*LPO*), способной катализировать окисление йодида, не привели к улучшению удержания захваченного радиойодида в клетках.

Созданная репортерная система была использована для изучения эффективности доставки нуклеиновых кислот в опухоли меланомы *in vivo* (данная работа была проведена совместно с лабораторией проф. А.С. Соболева, ИБГ РАН и биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова). В качестве средства доставки использовались полиплексы на основе блок-сополимера полиэтиленimina с полиэтиленгликолем (ПЭИ-ПЭГ), несущие пептидный лиганд MC1SP к меланокортиновым рецепторам 1 типа, сверхэкспрессированным на поверхности подавляющего большинства меланом человека и мыши. Лигандированные полиплексы продемонстрировали более высокую эффективность доставки гена *NIS* по сравнению с контрольными полиплексами без лиганда, что может быть связано с более высокой скоростью поступления лигандированных полиплексов в клетки меланомы. Достигнутого уровня экспрессии доставленного гена *NIS* было достаточно, чтобы визуализировать опухоль с помощью однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ).

Полученные данные закладывают основу для оценки возможности применения системы на основе натрий-йодидного симпортера в диагностических и терапевтических целях.

Апробация работы

Результаты работы были представлены на российских и международных конференциях: VIII Международной конференции «Молекулярная генетика соматических клеток» (Звенигород, 2011), 16-ой Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2012), IV съезде биофизиков России (Нижегород, 2012), 4th International Congress «Nanotechnology, Medicine & Biology» (Krems, Austria, 2013), 21st International Symposium «Nanostructures: Physics and Technology» (St.-Petersburg, Russia, 2013), 25th European Conference on Biomaterials (Madrid, Spain, 2013).

Объем работы

Диссертационная работа изложена на 101 странице и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, основных выводов и списка литературы из 94 наименований. Диссертация содержит 3 таблицы и 18 рисунков.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 3 статьи в рецензируемых журналах.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Создание экспрессионных векторов, несущих ген *rNIS* в качестве репортерного гена

На первом этапе работы необходимо было получить последовательность ДНК, кодирующую *NIS*. Анализ литературы показал, что среди последовательностей *NIS*, полученных из различных организмов, *NIS* серой крысы (*Rattus norvegicus*) наиболее соответствует поставленным задачам. Согласно ранее опубликованным данным натрий-йодидный симпортер крысы обеспечивает наиболее высокий уровень поглощения йодида в клетках крысы, человека и мыши. При этом большая доля белка достигает клеточной поверхности, т.е. активного состояния, по сравнению с симпортерами человека и мыши. Кроме того, *rNIS* обладает высокой степенью идентичности с мышинным белком, что снижает вероятность развития иммунных реакций при его использовании в мышинных моделях. Таким образом, в качестве источника кДНК *NIS* была выбрана серая крыса.

Согласно проведенному нами анализу наиболее высокий уровень экспрессии *rNIS* обнаруживался в тканях щитовидной железы крысы (данные приведены в диссертации), поэтому данный орган был использован в качестве источника мРНК. На базе полученной

кДНК был клонирован фрагмент, соответствующий полноразмерной открытой рамке считывания гена *rNIS* (NCBI Reference Sequence: NM_052983.2).

Для экспериментов с клетками млекопитающих было получено несколько экспрессионных конструкций, содержащих последовательность *rNIS*. В качестве базового вектора был выбран pGL3-BV («Promega»), из которого был удалён ген люциферазы светлячка. Создаваемые конструкции в контексте модифицированного вектора содержали: 1) промотор/промотор с энхансером, направляющий экспрессию гена *rNIS*; 2) последовательность синтетического интрона из вектора pCI («Promega»), так как ранее было показано, что данный интрон способен значительно повышать уровень экспрессии целевых генов в клетках млекопитающих; 3) собственно ген *rNIS*; 4) поздний сигнал полиаденилирования вируса SV40 (Simian vacuolating virus 40).

Для достижения детектируемого уровня репортерного сигнала необходимо обеспечить высокий уровень экспрессии репортерного гена в трансфицированных клетках. С этой целью была получена экспрессионная конструкция pCMV-rNIS, содержащая репортерный ген *rNIS* под контролем вирусного промотора pCMV (Cytomegalovirus immediate early promoter), высокоактивного в клетках млекопитающих различного происхождения. В качестве вектора сравнения была получена беспромоторная конструкция rNIS, содержащая ген *rNIS* в контексте вектора pGL3-basic, не несущего известные эукариотические промоторные элементы. В качестве отрицательного контроля (К-), лишённого последовательности *rNIS*, был использован коммерческий вектор pFLAG-CMV.2. Структура данных конструкций представлена на Рисунке 1.

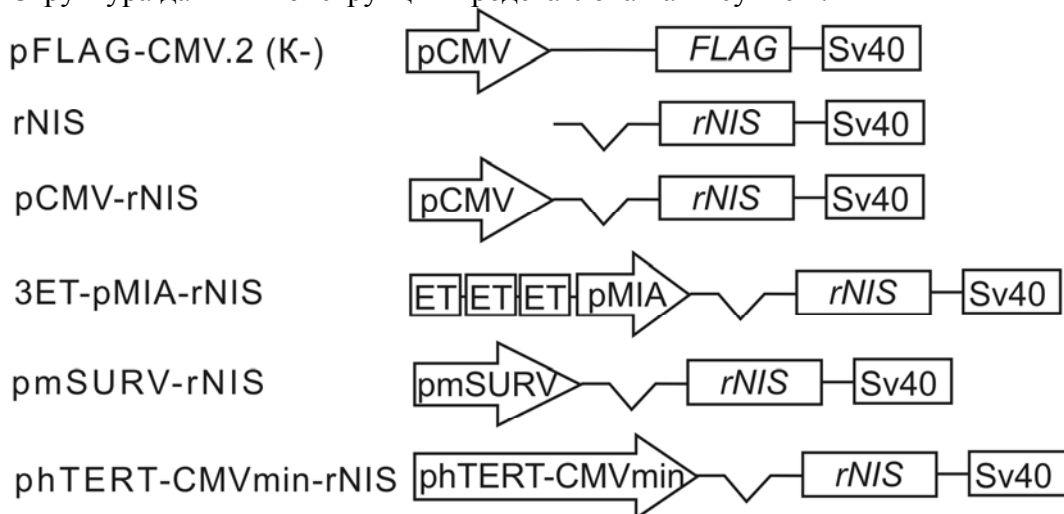


Рисунок 1. Схема созданных экспрессионных векторов. Стрелкой обозначены промоторы, направляющие экспрессию репортерного гена; V-образной линией - синтетический интрон; прямоугольниками (слева направо) – энхансеры гена тирозиназы мыши (ET), ген *rNIS* и сигнал полиаденилирования SV40.

Функциональный анализ экспрессионных конструкций с геном *rNIS* в клетках меланомного происхождения

Функциональный NIS обеспечивает перенос йодид-ионов в цитоплазму клеток через мембрану, что приводит к концентрированию йодид-ионов в NIS-экспрессирующих клетках. Поэтому функциональный анализ полученных конструкций проводили путем определения способности трансфицированных клеток поглощать йодид-ионы из культуральной среды. Для этого генно-инженерными конструкциями rNIS, pCMV-rNIS и К- проводили липофекцию клеток меланомы человека (A375) и меланомы мыши (меланома Клаудмана S91, клон M3, далее – M3). Через 48 часов после трансфекции методом RIUA (radioiodide uptake assay) проводили анализ поглощения клетками радиойодида (^{125}I) из среды. Суть данного метода заключается в том, что клетки инкубируют в течение 1 часа в среде,

содержащей радиоактивный йодид $^{125}\text{I}^-$, после чего клетки отмывают от радиоактивной среды, лизируют щелочью и в полученных щелочных лизатах определяют активность радиойодида. Ионы перхлората являются специфическим ингибитором NIS. Для того чтобы подтвердить специфическую природу поглощения радиойодида трансфицированными клетками, проводили контрольный эксперимент RIUA, в котором клетки инкубировали с радиойодидом в той же среде, но содержащей 50 мкМ перхлората натрия. Полученные данные представлены на Рисунке 2.

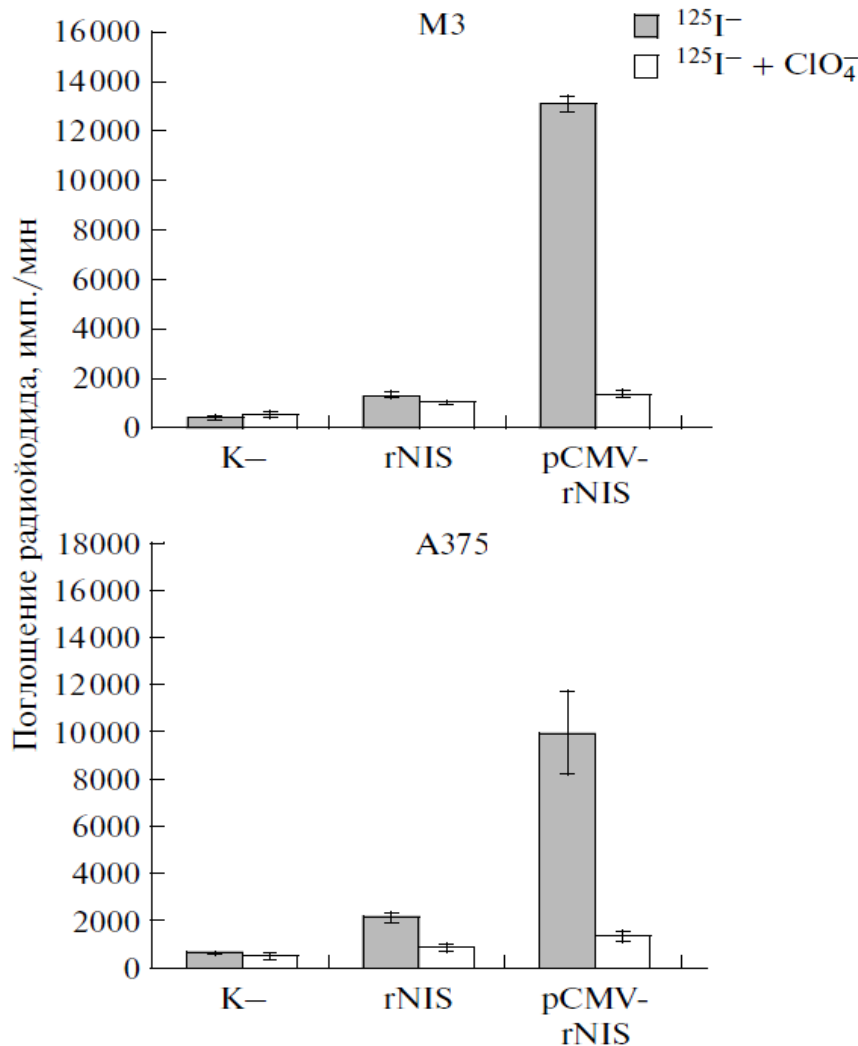


Рисунок 2. Поглощение $^{125}\text{I}^-$ в трансфицированных клетках. M3 и A375 – результаты для клеток меланомы мыши и человека соответственно. Трансфицированные клетки инкубировали в буфере с $^{125}\text{I}^-$, либо в буфере с $^{125}\text{I}^-$ и перхлоратом. Высота столбцов отражает среднюю активность радиойодида (имп./мин) в щелочных лизатах клеток как минимум после трех трансфекций. Приведены стандартные ошибки среднего (SEM). Под столбцами указаны названия конструкций, использованных для трансфекции. К-соответствует конструкции pFLAG-CMV.2.

Согласно полученным данным клетки обеих меланомных линий, трансфицированные экспрессионной конструкцией pCMV-rNIS, поглощали значительно большее количество йодид-ионов из среды по сравнению с клетками, трансфицированными контрольной плазмидой (К-). Добавление перхлората натрия при инкубации с радиоактивным йодидом приводило к значительному снижению поглощения йодида клетками. Так как перхлорат натрия является специфическим ингибитором NIS, можно сделать вывод, что поглощение йодида клетками было связано с активностью NIS в трансфицированных клетках. Клетки обеих линий, трансфицированные беспромоторной конструкцией rNIS, также поглощали радиойодид и такая активность подавлялась добавлением перхлората, однако уровень

поглощения был значительно ниже по сравнению с клетками, трансфицированными рCMV-rNIS. Такой феномен, вероятно, связан с фоновой экспрессией *rNIS* в беспромоторной конструкции. В лизатах контрольных клеток (К-) обнаруживался ¹²⁵I, при этом его активность была невысока и не зависела от наличия перхлората в инкубационном буфере, что говорит о неспецифической природе такого захвата.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что созданная экспрессионная конструкция, несущая ген *rNIS* под контролем сильного вирусного промотора рCMV, при трансфекции *in vitro* клеток меланомного происхождения обеспечивает высокий детектируемый уровень синтеза функционального натрий-йодидного симпортера.

Использование мелано- и опухолеспецифичных промоторов в репортерной системе на основе *rNIS*

Генопрепарат, нацеленный на уничтожение клеток опухоли в организме, будет обладать более высоким терапевтическим индексом (т.е. отношением противоопухолевой эффективности к токсичности препарата для нормальных тканей) в том случае, когда экспрессия терапевтических генов ограничена опухолевой тканью. В настоящее время эту задачу пытаются решить двумя различными путями: за счет направленной доставки генопрепаратов в целевые клетки, либо за счет использования специфичных промоторов, инициирующих экспрессию терапевтических генов только в целевых клетках. В рамках второго подхода используется два типа промоторов: тканеспецифичные и опухолеспецифичные промоторы.

Тканеспецифические промоторы характеризуются высокой активностью в клетках определенного происхождения. Генетические системы под контролем тканеспецифических промоторов были успешно разработаны для опухолей простаты, яичников, печени и других органов. Недостатки такого подхода заключаются в том, что экспрессия терапевтических генов может наблюдаться также и в здоровых клетках целевой ткани, а также в том, что для каждого типа опухоли требуется создавать и верифицировать свою пару тканеспецифический промотор-терапевтический ген. Параллельно активно развиваются генетические системы под контролем промоторов, обладающих широкой опухолевой специфичностью. Такие промоторы активны в опухолевых клетках самого разного происхождения, но при этом малоактивны или неактивны в нормальных клетках взрослого организма. К сожалению, активность опухолеспецифичных промоторов, как правило, не очень высока и значительно варьирует в опухолевых клетках различного происхождения. Специфичные промоторы обоих типов, как правило, менее активны по сравнению с сильными вирусными промоторами, такими как рCMV. В случае репортерной системы на основе *NIS* это может быть причиной низкой экспрессии данного белка в некоторых опухолевых клетках, что в свою очередь приведет к низкому недетектируемому уровню поглощения радиоизотопа. В связи с этим актуальной является задача определения связи активности используемого промотора с активностью *NIS* при экзогенной экспрессии в клетках разного происхождения.

На модели клеток меланомы человека (A375) и мыши (M3) мы провели сравнение активности *NIS* при транзientной трансфекции клеток генетическими конструкциями, содержащими *NIS* под контролем конститутивно активного промотора цитомегаловируса (рCMV); меланомоспецифического регуляторного элемента (3ET-pMIA), состоящего из трех энхансеров гена тирозиназы мыши и промотора гена *MIA* человека; а также опухолеспецифического промотора гена *Birc5* мыши (pmSURV) и опухолеспецифического гибридного промотора (phTERT-CMVmin), структуры конструкций приведены на Рисунке 1. Кроме того, мы изучили активность выбранных промоторов в двух линиях клеток меланомы, чтобы сравнить различия активности *NIS* и промоторной активности в выбранных клеточных линиях.

В качестве меланомоспецифического регуляторного элемента мы использовали синтетический промотор 3ET-pMIA, состоящий из тандема трех энхансеров тирозиназного гена мыши (последовательность длиной 208 п.н., соответствует координатам 5256849-5257056 nt NCBI Reference Sequence: NT_039433.8) и фрагмента промотора гена *MIA* человека (1374 п.н. с 5'-конца гена *MIA* (-1373...+1 относительно стартового кодона *MIA*), соответствует координатам 49314-50687 nt NCBI Reference Sequence: NT_011109.16), структура промотора приведена на Рисунке 3. Ранее такая последовательность была получена в лаборатории, в экспериментах *in vitro* была показана высокоспецифичная активность 3ET-pMIA в клетках меланомного происхождения.

В качестве одного из опухолеспецифических промоторов использовали промотор pmSURV - проксимальную часть промотора гена *Birc5* мыши, соответствующую координатам nt 117710470– 117710666 последовательности NC_000077.5 Gene bank, см. Рисунок 3. Ранее данный промотор был изучен в нашей лаборатории. Было показано, что он, как и промотор гена *BIRC5* человека, активирует синтез репортерных генов в большинстве клеток опухолевого происхождения, но практически не активен в нормальных клетках. При этом было показано, что активность промотора мышиноного происхождения в опухолевых клетках различного происхождения в несколько раз выше по сравнению с промотором гена *BIRC5* человека.

В качестве второго опухолеспецифического промотора использовали синтетический phTERT-CMVmin - промотор гена теломеразы человека (phTERT, соответствует координатам -206...+37 п.н. относительно точки начала транскрипции (nt 11006-11248 для последовательности GeneBank Acc. No. AF128893)), слитый с минимальным промотором цитомегаловируса (CMVmin, nt 460-529 для последовательности GeneBank Acc. No. M21295), см. Рисунок 3. Ранее данный промотор был изучен в лаборатории И. В. Коробко, ИБГ РАН. Было показано, что он обладает высокой специфичностью к клеткам различного опухолевого происхождения, при этом минимальный промотор цитомегаловируса значительно увеличивает промоторную активность phTERT, не влияя на опухолевую селективность.

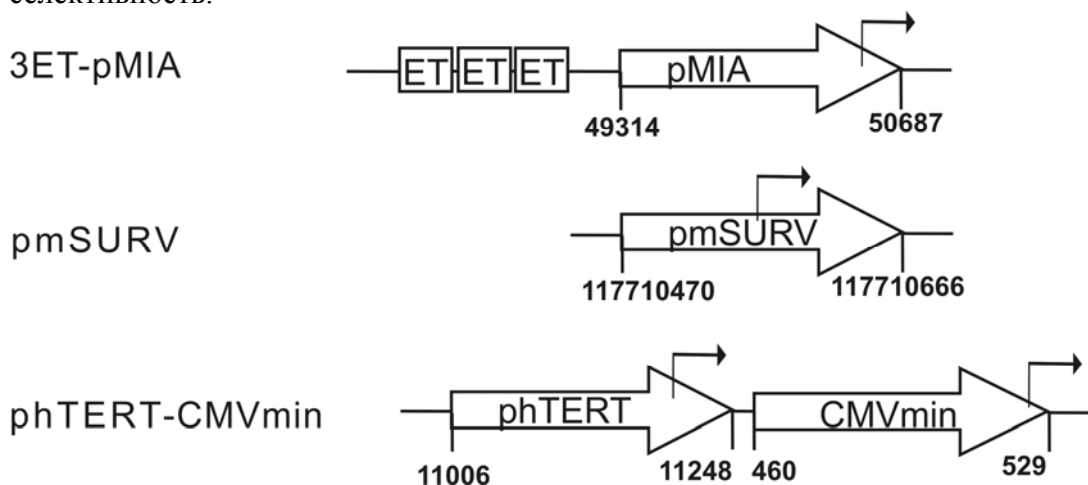


Рисунок 3. Структура используемых специфических промоторов. Стрелкой обозначен промотор, направляющий экспрессию репортерного гена, цифрами указаны координаты относительно референсной последовательности из GeneBank (NT_011109.16 для промотора гена *MIA*, NC_000077.5 для pmSURV, AF128893 для промотора *hTERT*, M21295 для CMVmin); Г-образной стрелкой - точка начала транскрипции. Прямоугольниками ET обозначены энхансеры тирозиназного гена мыши (соответствует координатам 5256849-5257056 nt NCBI Reference Sequence: NT_039433.8).

На первом этапе в клеточных линиях меланомы мыши (M3) и человека (A375) была определена активность выбранных промоторов в контексте репортерной плазмиды pGL3. Промоторную активность определяли по уровню экспрессии репортерного гена люциферазы

методом двойной люциферазной детекции. Для этого промоторные участки были клонированы в репортерный вектор pGL3-BV, содержащий ген люциферазы светлячка (данные конструкции были получены ранее в лаборатории). Полученными плазмидными конструкциями трансфицировали меланомные клетки мыши (M3) и человека (A375). Активность промоторов в трансфицированных клетках сравнивали с активностью раннего промотора вируса SV40, который входил в состав репортерного вектора pGL3-PV (вектор сравнения). Промоторную активность определяли как отношение люциферазной активности в экстрактах клеток, трансфицированных плазмидой со вставкой тестируемого промотора, к люциферазной активности в клетках, трансфицированных вектором сравнения pGL3-PV. Дополнительно определяли активность люциферазы в клетках, трансфицированных беспромоторным вектором pGL3-BV (тест на криптическую промоторную активность вектора pGL3). Полученные данные представлены в Таблице 1.

Таблица 1. Активность промоторов в транзистно-трансфицированных клетках меланомы мыши (M3) и меланомы человека (A375). С помощью липофекции клетки были трансфицированы репортерными плазмидами, содержащими вставку промотора цитомегаловируса (pCMV), промотора гена *Birc5* мыши (pmSURV), гибридного опухолевоспецифического промотора phTERT-CMVmin, меланомоспецифического регуляторного элемента ЗЕТ-pMIA, промотора вируса SV40 (pGL3-PV) и беспромоторной плазмидой pGL3-BV. Через 48 часов после трансфекции клетки лизировали, в полученных лизатах определяли люциферазную активность. За единицу принимали относительную люциферазную активность в экстрактах клеток, трансфицированных плазмидой pGL3-PV. В таблице приведены средние значения приведенной люциферазной активности как минимум трех трансфекций, а также стандартные ошибки среднего (mean±SEM).

Промотор	Характеристика промотора	Относительная промоторная активность в линии M3	Относительная промоторная активность в линии A375
Без промотора (BV)	отсутствует	0,1±0,01	0,02±0,01
pCMV	сильный конститутивно активный	358,49±65,78	109,01±16,79
pmSURV	опухолеспецифический	0,56±0,05	1,66±0,14
phTERT-CMVmin	опухолеспецифический	0,56±0,13	3,35±1,11
ЗЕТ-pMIA	меланомоспецифический	7,64±1,02	17,11±0,56

В обеих клеточных линиях сильный конститутивно активный pCMV проявлял наибольшую активность: более чем в 300 раз превышал активность промотора SV40 в клетках линии M3 и более чем в 100 раз в клетках линии A375. Меланомоспецифический элемент ЗЕТ-pMIA проявлял на порядок меньшую активность по сравнению с pCMV, но достаточно высокую по сравнению с pSV40: в 7 раз активнее pSV40 в клетках M3 и в 17 раз активнее в клетках A375. Опухолеспецифические промоторы pmSURV и phTERT-CMVmin в обеих клеточных линиях проявляли примерно на порядок меньшую активность по сравнению с ЗЕТ-pMIA, активность этих промоторов относительно pSV40 была различна в исследованных линиях меланомы: в два раза слабее в клетках линии M3, но в 1,5-3 раза активней в клетках A375. В клетках меланомы мыши (M3) оба опухолеспецифических промотора проявляли равную активность, однако в клетках меланомы человека (A375)

гибридный промотор *phTERT-CMVmin* был примерно в два раза активнее промотора *pmSURV*. Беспромоторная конструкция *pGL3-BV* проявляла низкую активность в обеих клеточных линиях (менее 10% от *pSV40*). Таким образом, ряд активности изученных промоторов в клетках меланомного происхождения M3 и A375 можно представить следующим образом (по убыванию):

$$pCMV \gg 3ET-pMIA > phTERT-CMVmin \geq pmSURV \gg BV,$$

при этом в клеточной линии A375 сравнительная активность опухолеспецифических промоторов *pmSURV* и *phTERT-CMVmin* была выше, чем в клетках M3.

На втором этапе эксперимента в тех же клеточных линиях M3 и A375 была изучена активность NIS при транзientной трансфекции клеток генетическими конструкциями, содержащими NIS под контролем того же набора промоторов (*pCMV*, *phTERT-CMVmin*, *pmSURV* и *3ET-pMIA*). Параллельно проводили трансфекцию клеток двумя контрольными конструкциями: *pFLAG-CMV.2* (K-, не содержала *rNIS*) и *rNIS* (беспромоторная конструкция). Активность NIS в трансфицированных клетках определяли методом RIUA, как это описано ранее. Полученные данные представлены на Рисунке 4.

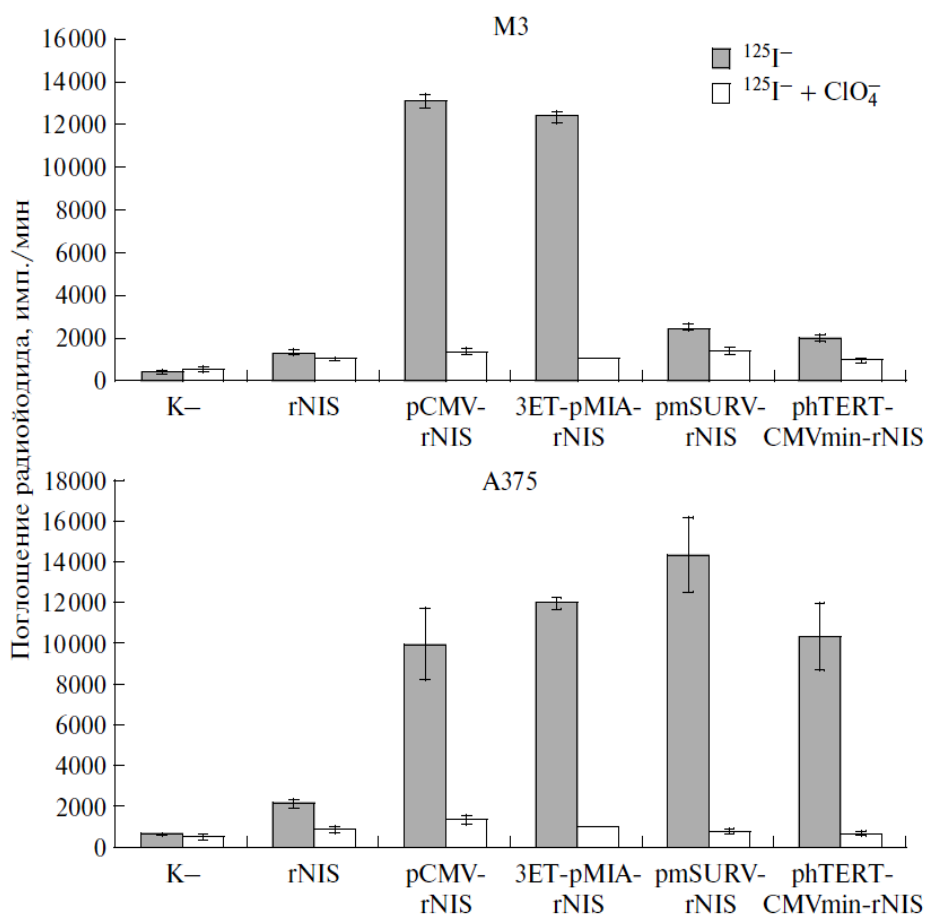


Рисунок 4. Поглощение ¹²⁵I в транзientно-трансфицированных клетках. M3 и A375 – результаты для клеток меланомы мыши и человека соответственно. Генетическими конструкциями проводили липофекцию клеток, через 48 часов трансфицированные клетки инкубировали в буфере с радиоактивным йодидом (ряд ¹²⁵I), либо в буфере с радиоактивным йодидом и перхлоратом (ряд ¹²⁵I + ClO₄⁻), после 1 часа инкубации клетки лизировали щелочью. Высота столбцов отражает среднюю активность радиойодида (имп./мин) в щелочных лизатах клеток как минимум после трех трансфекций. Приведены стандартные ошибки среднего (SEM). Под столбцами указаны названия конструкций, использованных для трансфекции.

Было показано, что клетки обеих меланомных линий, трансфицированные конструкцией 3ET-pMIA-rNIS, поглощали значительное количество радиоактивного йодида, сопоставимое с тем, что поглощали клетки, трансфицированные конструкцией с сильным промотором pCMV. Клетки A375, трансфицированные конструкциями pmSURV-rNIS и phTERT-CMVmin-rNIS, поглощали радиоактивный йодид в тех же количествах, что и клетки, трансфицированные конструкциями с более сильными промоторами pCMV и 3ET-pMIA. В отличие от этого клетки M3, трансфицированные конструкциями pmSURV-rNIS и phTERT-CMVmin-rNIS, поглощали в несколько раз меньше радиоактивного йодида, чем клетки, содержащие конструкции с более сильными промоторами pCMV и 3ET-pMIA. При этом уровень активности NIS все же был в 1,5–2 раза выше, чем в клетках, трансфицированных беспромоторной конструкцией.

Таким образом, мы наблюдали, что в условиях транзientной трансфекции умеренная активность меланомспецифичного промотора 3ET-pMIA обеспечивает в двух клеточных линиях меланомы мыши (M3) и человека (A375) высокий уровень активности NIS, сопоставимый с уровнем, обусловленным значительно более сильным промотором pCMV. Опухолеспецифичные промоторы pmSURV и phTERT-CMVmin, еще менее активные по сравнению с pCMV, обеспечивают высокий уровень активности NIS в клеточной линии меланомы человека (A375), но сравнительно низкий в линии меланомы мыши (M3).

Полученные данные указывают на то, что репортерная система на основе NIS может обеспечивать высокий уровень детектируемого сигнала (поглощение радиофармпрепарата) при использовании достаточно активных неспецифических и тканеспецифических промоторов. При этом более низкой активности промоторов с широкой опухолевой специфичностью может быть недостаточно для детекции экспрессируемого NIS.

Изучение кинетики диффузии радиойодида из клеток в условиях *in vitro*

С точки зрения практического применения данной репортерной системы важно добиться не только высокого уровня поглощения радиоизотопа трансфицированными клетками, но и длительного удержания захваченного изотопа в клетках. В диагностических приложениях время удержания радиоизотопа в клетках определяет временные рамки для оптимальной детекции радиоизотопа в аккумулирующей его ткани. В случае радиойодтерапии время удержания радиопрепарата особенно важно, так как определяет поглощенную дозу в ткани, экспрессирующей NIS, а значит и эффективность терапии.

Чтобы пролить свет на кинетические особенности созданной системы, *in vitro* мы оценили скорость диффузии радиоизотопа из клеток, трансфицированных генетическими конструкциями с *rNIS*. Для этого клетки линии меланомы мыши (M3) были транзientно трансфицированы плазмидой pCMV-rNIS либо контрольной плазмидой pFLAG-CMV.2. Через 48 часов после трансфекции провели изучение скорости вытекания предварительно накопленного радиойодида из клеток (Γ efflux assay). Данный эксперимент представляет собой модифицированный метод RIUA, в котором на первом этапе клетки также инкубируют в среде с радиойодидом, после чего среду заменяют нерадиоактивной, которую полностью обновляют через заданные промежутки времени. В конце эксперимента оставшийся в клетках радиопрепарат извлекают щелочным лизисом, определяют содержание радиойодида в каждой фракции, суммарную активность всех фракций принимают за исходное количество захваченного радиойодида. Полученные данные приведены на Рисунке 5.

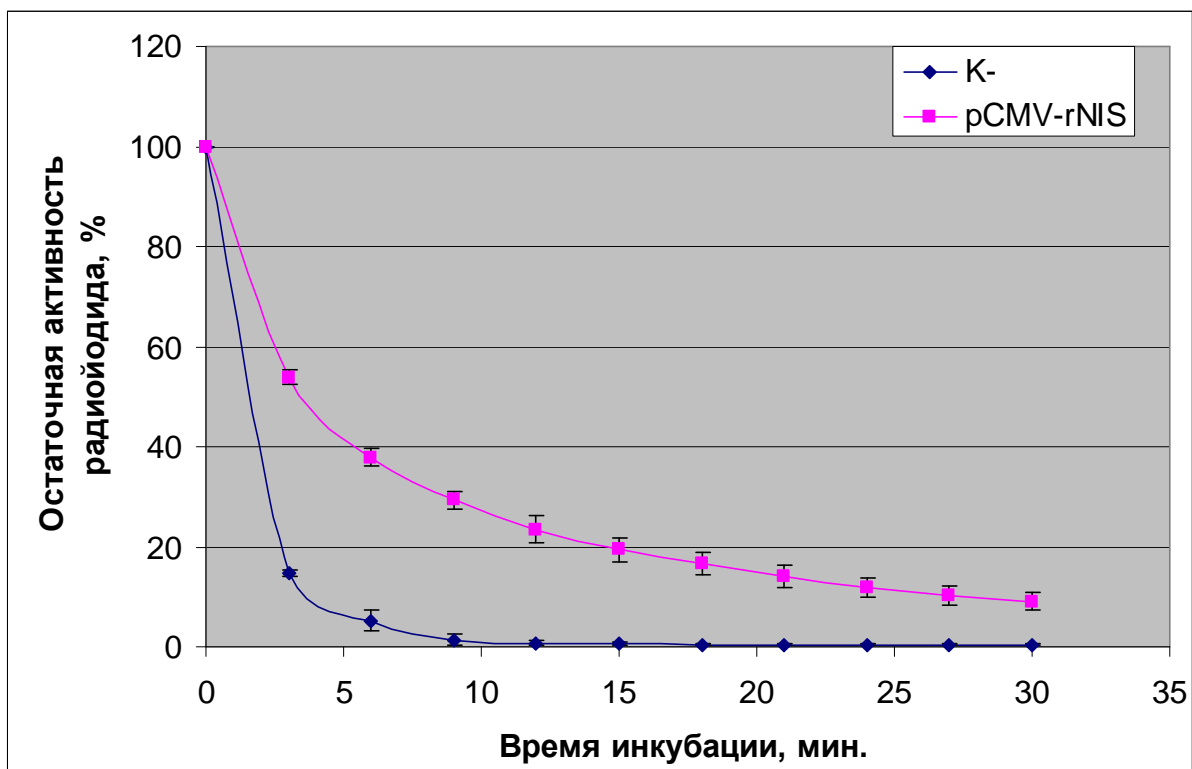


Рисунок 5. Диффузия ^{125}I из трансфицированных клеток M3. pFLAG-CMV.2 (K-) и pCMV-rNIS – результаты для клеток, трансфицированных соответствующими конструкциями. Трансфицированные клетки инкубировали в буфере с ^{125}I в течение 1 часа, затем буфер удаляли, после чего проводили отмывку клеток в среде без ^{125}I , которую полностью обновляли каждые 3 минуты. В конце эксперимента проводили щелочной лизис клеток. Для каждой группы трансфицированных клеток суммарная радиоактивность в собранных отмывочных фракциях и щелочных лизатах принята за 100% (время инкубации 0 минут). Все последующие точки отражают остаточную активность радиоизотопа через определенное время инкубации в нерадиоактивном буфере (исходная радиоактивность минус суммарная радиоактивность в собранных на данный момент инкубации фракциях). Приведены средние результаты двух экспериментов, барами обозначены стандартные отклонения.

Было показано, что клетки M3, трансфицированные плазмидой pCMV-rNIS, при инкубации в буфере с радиоiodидом захватывают значительные его количества, однако, при замене буфера на нерадиоактивный быстро теряют захваченный изотоп. Уже в течение 6 минут промывки остаточная активность падала до 40% от исходной. Через 30 минут инкубации в «холодном» буфере в клетках оставалось не более 10% от исходной активности изотопа. В контрольных клетках, трансфицированных плазмидой pFLAG-CMV.2, наблюдалась некоторая исходная активность (абсолютный счет был на порядок меньше по сравнению с клетками pCMV-rNIS), большая часть которой (более 80%) терялась в первые 3 минуты отмывки и полностью отмывалась за 9 минут инкубации в «холодном» буфере, что говорит о неспецифическом связывании некоторой доли радиоiodида с контрольными клетками и/или стенками культурального планшета.

Полученные данные указывают на то, что созданная система на основе NIS при трансфекции клеток *in vitro* может обеспечивать высокий уровень захвата радиоiodида клетками, однако захваченный изотоп быстро (в течение десятков минут) вымывается из клеток, т.е. длительного удержания не происходит. Такой недостаток системы ограничивает изучение ее терапевтического потенциала в экспериментах *in vitro*. Если такое же низкое время удержания захваченного изотопа будет наблюдаться и в системах *in vivo*, то это может серьезно ограничить возможности применения системы на основе NIS в диагностических и терапевтических приложениях. Однако, последующие эксперименты *in vivo* (приведены

далее) продемонстрировали, что в случае мышинной модели опухоли скорость вытекания захваченного йодида достаточно низка (период полувыведения оценивается часами), что снимает данное ограничение на применение системы в диагностических целях, при этом ограничение терапевтического потенциала сохраняется.

Изучение кинетических параметров репортерной системы на основе NIS в клетках, экспрессирующих лактопероксидазу

В организме млекопитающих йодид, захватываемый клетками щитовидной железы, переносится в полость тиреоидных фолликул, где претерпевает ферментативное окисление и ковалентно присоединяется к тиреоглобулину. Такой процесс называют органификацией йодида, он обеспечивает синтез тиреоидных гормонов, тироксина и трийодтиронина. При радиойодтерапии щитовидной железы органификация введенного радиойодида обеспечивает его длительное удержание в этом органе, что приводит к значительному времени облучения целевой ткани и резко увеличивает эффективность радиотерапии.

Наблюдаемое нами низкое время удержания радиойодида в экспрессирующих NIS клетках связано с отсутствием в них системы органификации йодида. Ранее предпринимались попытки воссоздать эту систему в опухолевых клетках путем переноса гена, кодирующего тиреопероксидазу – ключевой фермент, катализирующий окисление йодида в щитовидной железе. Результаты таких работ противоречивы, но в целом можно говорить о том, что экзогенная экспрессия тиреопероксидазы не влияла на скорость вытекания радиойодида, транспортируемого внутрь клеток с помощью NIS. Среди возможных причин этого можно назвать отсутствие свободной перекиси водорода, необходимой для реакции окисления йодида, а также различная локализация участников органификации: тиреопероксидаза экспортируется на поверхность трансфицированных клеток, тогда как повышенная концентрация йодида создается в их цитоплазме. Так или иначе, воссоздать тиреоидную систему органификации йодида в нетиреоидных опухолях затруднительно в силу ее сложной многокомпонентной организации.

Мы предложили другой подход, заключающийся во внутриклеточной органификации радиойодида, захватываемого с помощью NIS. В качестве фермента, способного окислять радиойодид, была выбрана лактопероксидаза мыши (LPO). Мы модифицировали ее последовательность С-концевой сигнальной последовательностью HDEL, чтобы этот фермент, обычно секретируемый во внеклеточное пространство, накапливался в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР), где в норме наблюдается высокое содержание пероксида водорода (в других клеточных органеллах свободный пероксид быстро утилизируется антиоксидантными системами клетки), такой вариант был назван LPO-E. Было выдвинуто предположение, что клетки продуцирующие и NIS и LPO-E, смогут захватывать радиойодид из среды и окислять его за счет пероксида водорода в ЭПР, что приведет к увеличению времени внутриклеточного удержания захваченного изотопа. Это предположение было проверено экспериментально.

На первом этапе работы были получены экспрессионные конструкции рCMV-LPO-M и рCMV-LPO-E, несущие ген *LPO-M* (кодирует лактопероксидазу дикого типа с Мус-эпитопом на С-конце) или *LPO-E* под контролем сильного вирусного промотора рCMV. При транзientной трансфекции полученными конструкциями клеток линии HEK293T, характеризующихся высоким уровнем трансфекции и продукции экзогенных белков, наблюдалось увеличение общей пероксидазной активности кондиционированных сред и экстрактов клеток, что позволяет говорить о продукции активной лактопероксидазы трансфицированными клетками. При этом использование гена *LPO-E* приводило к увеличению пероксидазной активности в экстрактах клеток и ее уменьшению в кондиционированной среде по сравнению с геном *LPO-M*, что вероятно было связано с удержанием модифицированного белка в ЭПР за счет использованного сигнала. Результаты этого этапа работы приведены в диссертации.

Далее была получена экспрессионная конструкция pCMV-rNIS-2A-LPO-E, несущая под контролем pCMV гибридный ген rNIS-2A-LPO-E, см. Рисунок 6. Ранее в лаборатории была разработана схема создания генетических конструкций с 2A пептидом, способных обеспечивать одновременную продукцию двух и более белковых продуктов на высоком уровне в клетках млекопитающих. Последовательность rNIS-2A-LPO-E представляет собой единую рамку считывания, кодирующую rNIS, 2A пептид из генома тешовируса свиней и модифицированный вариант лактопероксидазы. Трансляция на матрице мРНК с такой рамкой считывания позволяет получить два дискретных белковых продукта: rNIS с небольшим довеском 2A пептида и LPO-E. Было показано, что транзientная трансфекция клеток линии HEK293Т данной конструкцией приводит к появлению в них высокой активности NIS, а также значительной пероксидазной активности в экстрактах клеток (данные приведены в диссертации).

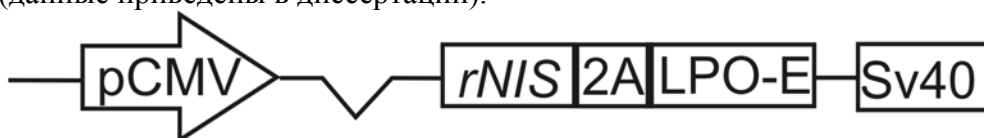


Рисунок 6. Структура конструкции pCMV-rNIS-2A-LPO-E. Стрелкой обозначен промотор pCMV; V-образной линией - синтетический интрон; прямоугольниками (слева направо) – кодирующие последовательности *rNIS*, *2A* и *LPO-E*, находящиеся в общей рамке считывания, а также сигнал полиаденилирования SV40.

На последнем этапе была изучена скорость диффузии радиоiodида из клеток, трансфицированных конструкциями с *rNIS* и *LPO-E*. Для этого клетки линии HEK293Т были транзientно трансфицированы плазмидами pCMV-rNIS-2A-LPO-E, pCMV-rNIS, pCMV-LPO-E либо контрольной плазмидой pFLAG-CMV.2 (K-). Через 72 часа после трансфекции была изучена диффузия радиоiodида из клеток (I efflux assay), как это описано выше. Полученные данные приведены на Рисунке 7.

Было показано, что клетки, трансфицированные конструкцией только с лактопероксидазой (pCMV-LPO-E) захватывают некоторое количество радиоiodида, но быстро теряют его при отмывке, что практически полностью повторяет результаты контрольного эксперимента (K-). В то же время клетки, трансфицированные конструкциями с геном *rNIS* (pCMV-rNIS и pCMV-rNIS-2A-LPO-E), при инкубации в буфере с радиоiodидом захватывают значительные его количества, однако, при замене буфера на нерадиоактивный быстро теряют захваченный изотоп (половина активности терялась в течение первых 5 минут отмывки, через 45 минут отмывки в клетках оставалось менее 10% исходной активности). В профилях диффузии радиоiodида из клеток, трансфицированных только *rNIS* и *rNIS* с *LPO-E*, не наблюдалось достоверных различий.

Таким образом, было показано, что в условиях *in vitro* клетки, одновременно продуцирующие активные NIS и вариант лактопероксидазы LPO-E, способны захватывать радиоiodид из внеклеточной среды, но не способны его длительно удерживать, т.е. внутриклеточная органификация радиоiodида в такой системе не была обнаружена. Причины отсутствия внутриклеточного окисления йодида могут быть различны. Возможно, содержания пероксида водорода или активной лактопероксидазы в ЭПР было недостаточно для значимого окисления йодида. Также неизвестно, способен ли цитоплазматический йодид попадать через мембрану в люмен ЭПР, где предположительно должна накапливаться модифицированная лактопероксидаза. Так или иначе, предложенная система внутриклеточной органификации йодида, по-видимому, не работает либо требует серьезной доработки.

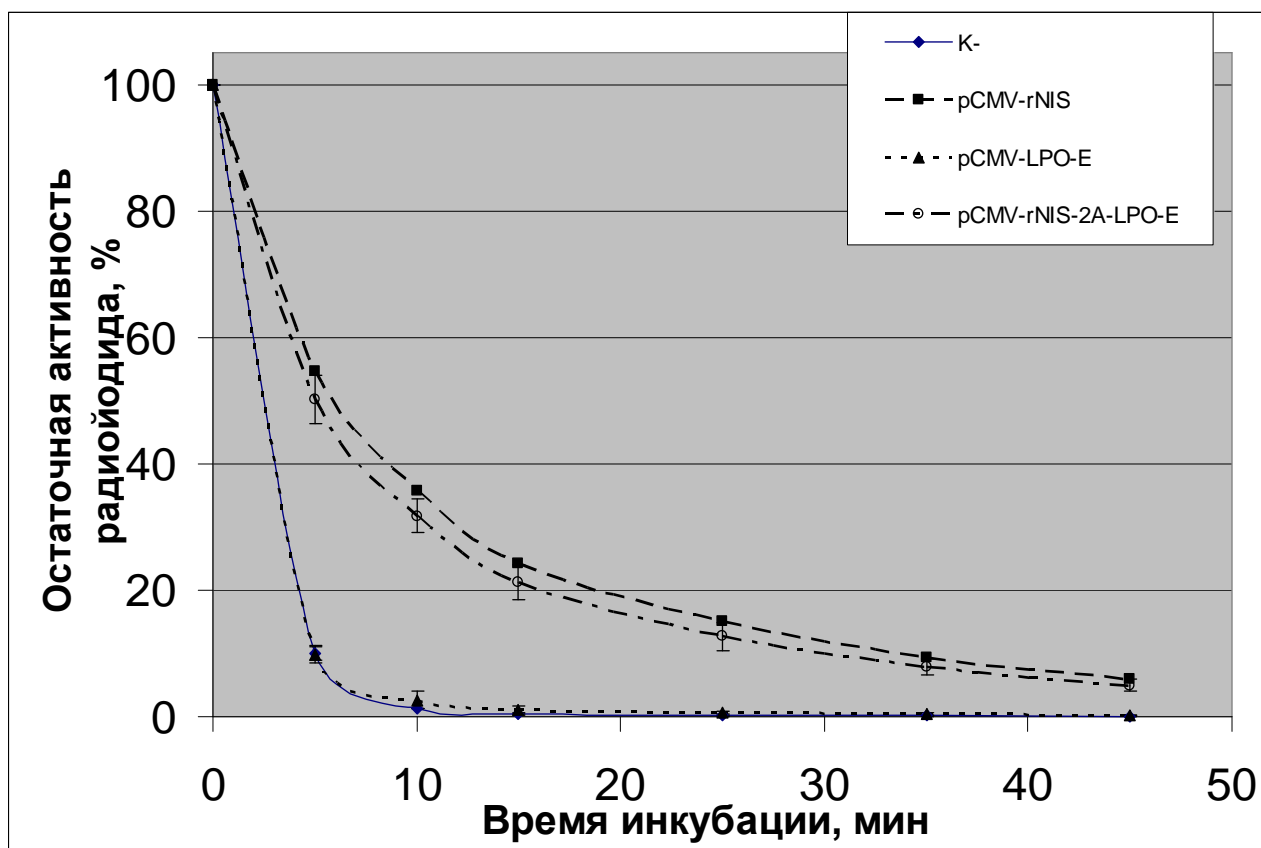


Рисунок 7. Диффузия ^{125}I из трансфицированных клеток НЕК293Т. К-, pCMV-rNIS, pCMV-LPO-E, pCMV-rNIS-2A-LPO-E – результаты для клеток, трансфицированных соответствующими конструкциями. Трансфицированные клетки инкубировали в буфере с ^{125}I в течение 1,5 часов, затем буфер удаляли, после чего проводили отмывку клеток в среде без ^{125}I , которую полностью обновляли каждые 5 минут. В конце эксперимента проводили щелочной лизис клеток. Для каждой группы трансфицированных клеток суммарный счет ^{125}I в собранных отмывочных фракциях и щелочных лизатах принят за 100% (время инкубации 0 минут). Все последующие точки отражают остаточную активность радиоизотопа через определенное время инкубации в нерадиоактивном буфере (исходный счет минус счет в собранных на данный момент инкубации фракциях). Приведены средние результаты двух экспериментов, барами обозначены стандартные отклонения.

Создание линии клеток меланомного происхождения, стабильно продуцирующей натрий-йодидный симпортер

Для того чтобы в организме лабораторных животных успешно обнаруживать опухолевые клетки, экспрессирующие NIS в результате системной доставки этого репортерного гена, необходимо подобрать условия детекции NIS-положительных клеток в условиях *in vivo*. Такую задачу значительно удобнее решать, прививая животным опухолевые клетки стабильно продуцирующие репортерный белок. С этой целью была получена линия клеток меланомы мыши М3, стабильно трансфицированная экспрессионной кассетой с геном *rNIS*.

На первом этапе работы на основе лентивирусного вектора pLVX-*puro* были получены две генно-инженерные конструкции, несущие экспрессионную кассету, состоящую из гена *rNIS* под контролем меланомоспецифического регуляторного элемента ЗЕТ-рMIA либо под контролем сильного неспецифического промотора pCMV. Схема конструкций приведена на Рисунке 8А.

На втором этапе была проведена транзитная котрансфекция клеток линии НЕК293Т полученными конструкциями и вспомогательными плазмидами, после чего были собраны супернатанты, содержащие лентивирусные частицы. Далее клетки линии М3 инфицировали полученными лентивирусными частицами, после чего проводили отбор стабильно

трансфицированных клеток в среде с пуромицином. В результате были получены две клеточные линии M3-3ET-pMIA-rNIS и M3-pCMV-rNIS, стабильно трансфицированные кассетой, состоящей из гена *rNIS* под контролем 3ET-pMIA либо под контролем pCMV, соответственно.

Для подтверждения функциональной активности интегрированных в геном экспрессионных кассет был проведен анализ активности белка NIS в полученных линиях. С этой целью клетки рассеивали в 24-х луночный планшет по 250000 клеток на лунку, через 24 часа после посева с помощью метода RIA проводили оценку способности клеток поглощать йодид-ионы из среды. Результаты приведены на Рисунке 8Б.

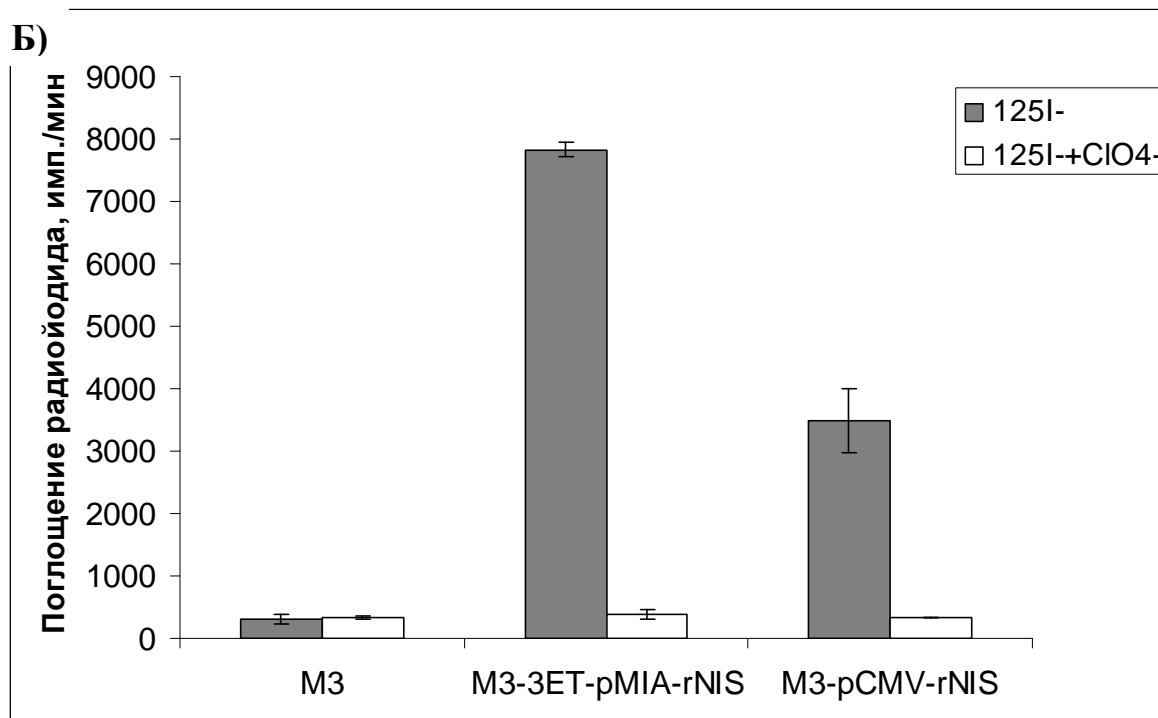
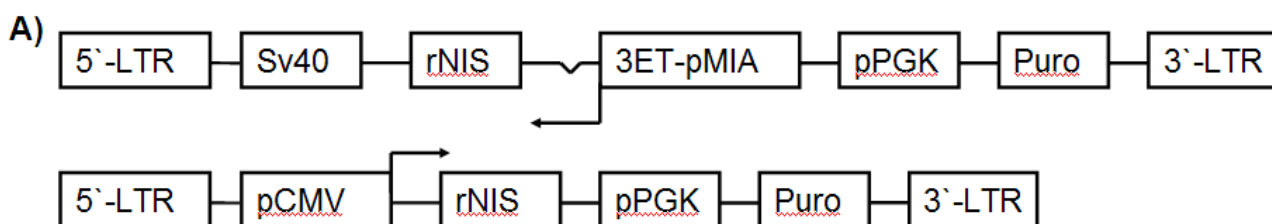


Рисунок 8. А) Схема созданных лентивирусных векторов. Сверху приведена структура вектора 3ET-pMIA-rNIS-pLVX-Puro, снизу – pCMV-rNIS-pLVX-Puro. Г-образной стрелкой обозначена точка начала и направление транскрипции; V-образной линией - синтетический интрон; прямоугольниками – LTR лентивирусного генома, ген *rNIS*, сигнал полиаденилирования SV40, промоторы pCMV, 3ET-pMIA и pPGK, ген устойчивости к пуромицину Puro. Б) Поглощение ^{125}I в стабильно трансфицированных клетках меланомы мыши. Под столбцами указаны названия клеточных линий: M3 – нативная линия, M3-3ET-pMIA-rNIS и M3-pCMV-rNIS – линии стабильно трансфицированные соответствующими кассетами. Клетки инкубировали в буфере с радиоактивным йодидом (^{125}I), либо в буфере с ^{125}I и перхлоратом (ClO_4). Высота столбцов отражает среднюю активность ^{125}I (имп./мин) в щелочных лизатах клеток как минимум двух экспериментов. Приведены стандартные отклонения (SD).

Было показано, что обе стабильно трансфицированные линии поглощали значительно большее количество йодид-ионов по сравнению с нетрансфицированными клетками, причем поглощение ингибировалось перхлоратом натрия. Таким образом, обе полученные линии

продуцировали активный белок NIS. Интересно, что клетки линии M3-3ET-pMIA-rNIS поглощали почти в два раза большее количество йодид-ионов по сравнению с клетками M3-pCMV-rNIS. Это неожиданно, так как экспрессионная кассета 3ET-pMIA-rNIS содержит более слабый по сравнению с pCMV промотор. Такой результат может быть связан с различной архитектурой полученных лентивирусных векторов - экспрессионная кассета в 3ET-pMIA-rNIS-pLVX-Puro дополнительно содержит синтетический интрон и собственный сигнал полиаденилирования, которые могут увеличивать стабильность целевого транскрипта. Также более низкая активность симпортера в M3-pCMV-rNIS может быть связана с подавлением вирусного промотора pCMV путем метилирования, которое может происходить при длительной культивации стабильно трансфицированных клеток (селекция полученных линий проводилась в течение нескольких недель). В виду более высокой активности NIS для дальнейшей работы использовали линию M3-3ET-pMIA-rNIS.

Визуализация NIS-позитивных клеток меланомы *in vivo* с помощью ОФЭКТ/КТ

Полученная линия M3-3ET-pMIA-rNIS была использована для отработки условий визуализации NIS-позитивных клеток в организме мыши (данная работа была выполнена совместно с лабораторией проф. А.С. Соболева, ИБГ РАН). Для этого мышам сингенной линии DBA/2 подкожно вводили $2 \cdot 10^6$ клеток полученной линии. Примерно через десять суток, когда опухоль достигала объема около 200 мм^3 , мышей анестезировали смесью воздуха с изофлураном и внутривенно вводили $18,5 \text{ МБк } ^{123}\text{I}$, после чего в течение нескольких часов отслеживали биораспределение радиойодида с помощью специального томографа с высоким разрешением U-SPECT-II/CT фирмы MILABS (биологический факультет, Программа развития Московского университета). На основе полученных изображений, а также данных рентгеновской компьютерной томографии (КТ) мышей были построены 3D-реконструкции распределения изотопа во внутренних органах и проведен количественный анализ распределения активности. Полученные данные представлены на Рисунке 9.

Введенный радиойодид в значительной степени накапливался в привитой опухоли (до 13% от общей активности препарата, при этом максимально достигнутый захват составил $24,3 \pm 3,5 \%$ от введенной дозы на грамм ткани). Кроме того, накопление йодида наблюдалось также в органах с естественной экспрессией NIS (в частности, в щитовидной железе, желудке, слюнных железах) и в мочевом пузыре, где накапливается выводимый почками радиойодид. При одновременном введении перхлората натрия радиойодид обнаруживался исключительно в мочевом пузыре, что подтверждает NIS-опосредованный характер накопления изотопа в привитой опухоли и органах с естественной экспрессией симпортера. Уровень захвата радиоизотопа в опухоли был достаточно высок для ее визуализации на фоне остальных NIS-позитивных органов.

Максимальный захват йодида в опухоли наблюдался через 1,5 часа после введения радиопрепарата, Рисунок 9Б. При этом интенсивность сигнала не снижалась даже через 200 минут после инъекции, что говорит о низкой скорости выведения радиопрепарата из опухоли. Наблюдаемая картина сильно отличалась от той, что наблюдалась в экспериментах *in vitro*, где захватившие радиойодид клетки теряли большую часть активности в течение первых 15 минут нахождения в нерадиоактивном буфере. Вероятно, такое различие объясняется различной скоростью выведения радиопрепарата из среды, в которой находятся экспрессирующие NIS клетки: в случае экспериментов *in vitro* радиоактивный буфер резко заменялся нерадиоактивным, тогда как в экспериментах *in vivo* радиоизотоп постепенно удалялся из кровотока почками, что способствовало многократному вторичному захвату препарата клетками привитой опухоли. В любом случае, удержание захваченного радиопрепарата в течение часов после инъекции значительно облегчает визуализацию опухолей, экспрессирующих NIS, в организме модельных животных.

Таким образом, в проведенном эксперименте мы показали, что созданная нами система на основе rNIS в случае «идеальной» доставки, когда все опухолевые клетки несут экспрессионную кассету с rNIS, позволяет визуализировать привитую опухоль меланомы в организме мыши методом ОФЭКТ. При этом скорость выведения радиоизотопа из опухоли достаточно низка, что позволяет проводить мониторинг распределения радиопрепарата в течение нескольких часов после его введения.

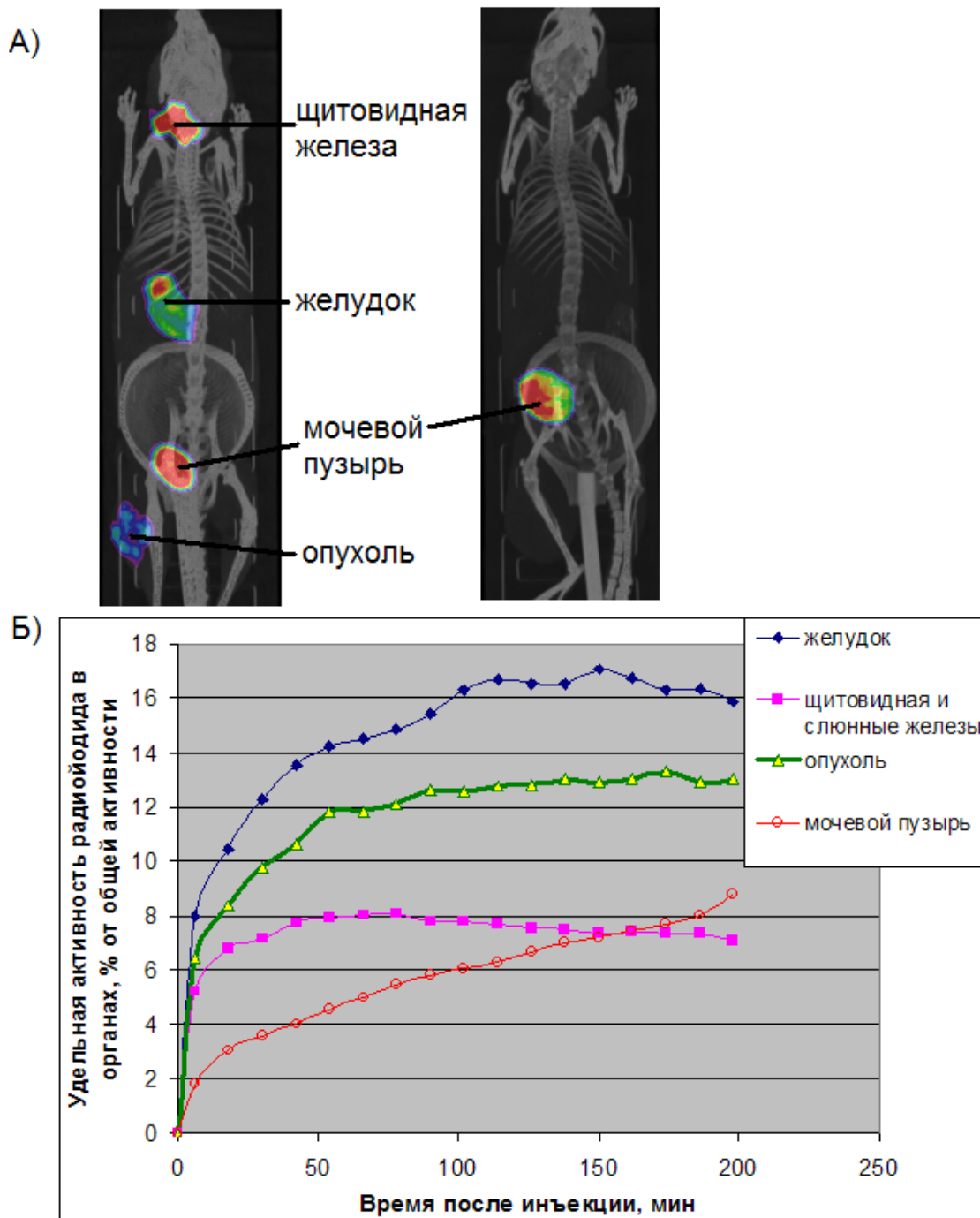


Рисунок 9. Выявление накопления ^{123}I в опухоли мышинной меланомы М3, стабильно экспрессирующей NIS, с помощью ОФЭКТ/КТ. А) Реконструированные 3D-проекции мышей после инъекции 18,5 МБк ^{123}I (слева), либо после инъекции радиопрепарата и перхлората натрия в качестве ингибитора NIS (справа). Б) Кинетика накопления радиопрепарата в стабильно трансфицированной опухоли и внутренних органах мыши. Уровень накопления радиопрепарата в каждом органе нормирован на общую активность ^{123}I в организме мыши.

Оценка эффективности системной доставки гена *rNIS* в опухоли меланомы путем визуализации NIS-позитивных клеток с помощью ОФЭКТ/КТ

Известные на сегодня системы генетической доставки, как правило, не могут обеспечивать «идеальную» доставку в условиях *in vivo*, т.е. трансфекцию всех клеток опухоли. Поэтому применимость разработанной репортерной системы для отслеживания доставки генов *in vivo* может быть ограничена. Чтобы прояснить этот вопрос, данная репортерная система была испытана в условиях системной доставки генетического материала в опухоли меланомы (данная работа была выполнена совместно с лабораторией проф. А.С. Соболева, ИБГ РАН).

В качестве средства доставки мы использовали полиплексы на основе блок-сополимера полиэтиленгликоля и полиэтиленimina (ПЭГ-ПЭИ). Эта система хорошо изучена, ранее неоднократно была показана ее эффективность в доставке генетического материала в целевые клетки в условиях *in vitro* и *in vivo*. Модификация полиплексов лигандами, специфичными к рецепторам, сверхэкспрессированным на поверхности целевых клеток, может улучшать селективность системной доставки, а также увеличивать захват полиплексов целевыми клетками. Известно, что во многих случаях меланомы человека и мыши раковые клетки сверхэкспрессируют на поверхности меланокортиновый рецептор 1 типа (MC1R), для которого разработан селективный пептидный лиганд MC1SP. Ранее было показано, что в условиях *in vitro* полиплексы на основе ПЭГ-ПЭИ, армированные лигандом MC1SP, обеспечивают более высокий уровень трансфекции клеток меланомы мыши М3 по сравнению с нелигандированным полиплексом. Мы использовали разработанную репортерную систему для того, чтобы оценить различия в эффективности доставки генов в опухоли меланомы с помощью MC1SP-лигандированных и нелигандированных полиплексов.

Для этого мышам сингенной линии DBA/2 подкожно вводили $2 \cdot 10^6$ клеток линии М3. Примерно через десять суток, когда опухоль достигала объема порядка 200 мм^3 , мышам внутривенно вводили MC1SP-ПЭГ-ПЭИ либо ПЭГ-ПЭИ полиплексы, содержащие плазмиду pCMV-rNIS. Еще одной группе мышей вводили контрольные ПЭГ-ПЭИ полиплексы с беспромоторной плазмидой rNIS. Через 12, 24 или 48 часов после введения полиплексов мышей анестезировали и внутривенно вводили $18,5 \text{ МБк } ^{123}\text{I}$, после чего изучали биораспределение радиойодида с помощью сканера ОФЭКТ. На основе полученных изображений, а также данных рентгеновской компьютерной томографии мышей были построены 3D-реконструкции распределения изотопа во внутренних органах и проведен количественный анализ распределения активности. Полученные данные представлены на Рисунке 10.

Согласно полученным данным максимальный уровень активности NIS в опухоли достигался через 24 часа после системного введения лигандированных полиплексов, см. Рисунок 10А. При этом накопление радиойодида составило $6,8 \pm 1,1 \%$ от введенной дозы на грамм опухолевой ткани. Через 48 часов после введения полиплексов активность NIS в опухоли была ниже, что указывает на временную природу экспрессии репортерного гена, доставленного при помощи таких полиплексов. Достигнутого уровня поглощения радиоизотопа было достаточно, чтобы визуализировать опухоль с помощью ОФЭКТ, хотя поглощение радиоизотопа органами с естественной экспрессией NIS (желудок и щитовидная железа) наблюдалось на более высоком уровне, см. Рисунок 10Б. В нетрансфицированных опухолях (соответствует точке 0 ч. на Рисунке 10А) накопление радиойодида достигало $2,4 \pm 0,4 \%$ от введенной дозы на грамм опухолевой ткани.

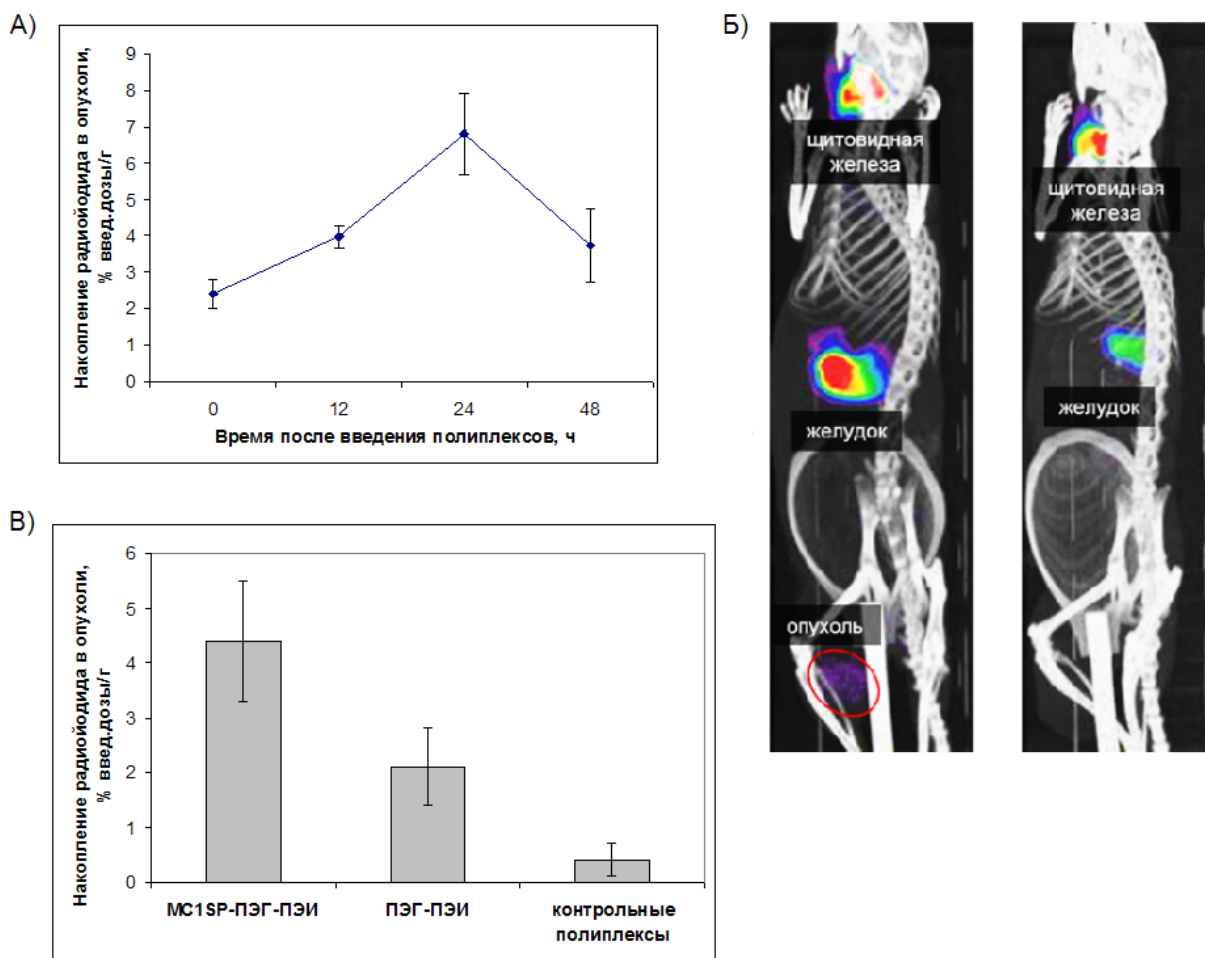


Рисунок 10. Выявление накопления ^{123}I в опухоли мышинной меланомы М3, трансфицированной полиплексами *in vivo*, с помощью ОФЭКТ/КТ томографии. А) Кинетика изменения активности NIS в опухоли, измеренной по накоплению ^{123}I , после доставки гена *rNIS* с помощью лигандированных полиплексов (80 мкг ДНК на мышь). Б) Реконструированные 3D-проекции мышей спустя 24 ч после введения лигандированных полиплексов, несущих плазмиду pCMV-rNIS (слева), либо тех же полиплексов, несущих беспромоторную плазмиду rNIS в качестве контроля (справа). В) Накопление ^{123}I в опухоли спустя 24 ч после введения полиплексов с лигандом, несущих плазмиду pCMV-rNIS (MC1SP-ПЭГ-ПЭИ), полиплексов без лиганда, несущих плазмиду pCMV-rNIS (ПЭГ-ПЭИ), либо полиплексов с лигандом, несущих беспромоторную плазмиду rNIS (контрольные полиплексы). Из средних значений накопления радиойодида в трансфицированных опухолях был вычтен уровень накопления ^{123}I в нетрансфицированной опухоли ($2,4 \pm 0,4$ % введ.дозы/г). 18,5 МБк ^{123}I вводили внутривенно для визуализации экспрессии гена *rNIS* с помощью ОФЭКТ/КТ томографии. Значения приведены в виде среднего % введенной дозы на грамм ткани, барами обозначены стандартные отклонения данной величины.

Полиплексы с MC1SP-лигандом обеспечивали почти в два раза большее накопление радиойодида в трансфицированной опухоли по сравнению с нелигандированными полиплексами, см. Рисунок 10В. Как отмечалось ранее, в условиях *in vitro* полиплексы на основе ПЭГ-ПЭИ, армированные лигандом MC1SP, обеспечивали более высокий уровень трансфекции клеток меланомы мыши М3 по сравнению с нелигандированным полиплексом. Вероятно, в условиях *in vivo* лигандированные полиплексы также обеспечивали более высокий уровень трансфекции опухоли меланомы, при этом чувствительности созданной репортерной системы оказалось достаточно, чтобы выявить такие различия в эффективности трансфекции полиплексами. Стоит отметить, что системное введение лигандированных контрольных полиплексов, несущих беспромоторную плазмиду rNIS, также приводило к

некоторому увеличению накопления радиоизотопа в опухоли по сравнению с нетрансфицированным контролем (на $0,4 \pm 0,3$ % от введенной дозы на грамм опухолевой ткани, Рисунок 10В). Аналогичная активность плазмиды rNIS наблюдалась при липофекции меланомных клеток в условиях *in vitro*, см. раздел «Функциональный анализ экспрессионных конструкций с геном rNIS в клетках меланомного происхождения». Можно предположить, что даже низкий уровень экспрессии репортерного гена, достигаемый при системной доставке беспромоторной плазмиды rNIS, удалось детектировать с помощью ОФЭКТ. Однако в силу небольшой величины наблюдаемого эффекта говорить о достоверности обнаруженных различий не представляется возможным.

Как уже отмечалось выше, при системном введении лигандированных полиплексов нам удалось добиться уровня экспрессии репортерного гена rNIS, достаточного для визуализации опухоли и обеспечивающего накопление $6,8 \pm 1,1$ % от введенной дозы на грамм ткани. При этом максимально достигнутый уровень захвата радиойодида в опухоли, стабильно трансфицированной геном rNIS, составил $24,3 \pm 3,5$ % от введенной дозы на грамм ткани, см. раздел «Визуализация NIS-позитивных клеток меланомы *in vivo* с помощью ОФЭКТ/КТ». Это говорит об ограниченной доставке репортерного гена в опухоль полиплексами, не обеспечивающей трансфекцию всех клеток опухоли при системном введении. Среди вероятных причин низкой эффективности доставки можно назвать сосудистый барьер, препятствующий выходу полиплексов из кровотока в ткань опухоли, а также ограниченная диффузия полиплексов (размер которых составляет десятки нанометров) внутри опухоли, что затрудняет доставку репортерного гена во все клетки опухоли.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в данной работе была создана и охарактеризована репортерная система на основе гена rNIS, кодирующего натрий-йодидный симпортер крысы. В условиях *in vitro* было показано, что доставка в клетки меланомного происхождения генетических конструкций, содержащих репортерный ген под контролем регуляторных элементов различной активности и специфичности, может обеспечивать высокий детектируемый уровень синтеза функционального натрий-йодидного симпортера. На модели мышинной меланомы было показано, что методом ОФЭКТ/КТ в организме мыши можно отслеживать клетки опухоли, стабильно экспрессирующие данный репортерный ген. Кроме того, была продемонстрирована возможность визуализации опухоли мышинной меланомы после системного введения репортерного гена в составе полиплексов на основе поликатионного полимера. При этом в рамках данного подхода удалось выявить различия в эффективности системной доставки репортерного гена, обеспечиваемой полиплексами различного состава. Так, было показано, что лигандированные MC1SP пептидом полиплексы обеспечивают более высокий уровень доставки гена rNIS в опухоли меланомы по сравнению с нелигандированными полиплексами, что отражается на количестве захватываемого опухольями радиойодида ($6,8 \pm 1,1$ % против $4,5 \pm 0,8$ % введенной дозы ^{123}I на грамм ткани).

Совокупность полученных результатов говорит о перспективности использования созданной репортерной системы в области разработки систем доставки генетического материала.

ВЫВОДЫ

1. Получены экспрессионные конструкции, содержащие ген rNIS, кодирующий натрий-йодидный симпортер крысы, под контролем различных регуляторных элементов: раннего промотора цитомегаловируса (pCMV), промотора гена *Birc5* мыши (pmSURV), гибридного промотора pH_{TERT}-CMV_{min}, гибридного промотора 3ET-pMIA. Проведен сравнительный анализ эффективности экспрессии гена rNIS под контролем этих промоторов.

2. Показано, что в культурах клеток меланомного происхождения rNIS под контролем

сильного вирусного промотора pCMV и умеренно-активного меланомоспецифического гибридного промотора 3ET-pMIA обеспечивает высокий детектируемый уровень синтеза функционального натрий-йодидного симпортера. Более низкой активности промоторов с широкой опухолевой специфичностью pmSURV и phTERT-CMVmin недостаточно для надежной детекции экспрессируемого NIS.

3. Созданная система на основе *rNIS* при трансфекции *in vitro* может обеспечивать высокий уровень захвата радиойодида клетками, однако захваченный изотоп быстро (в течение десятков минут) вымывается из клеток.

4. Сконструирована генетическая система, позволяющая достигать одновременного синтеза двух белков в трансфицированных клетках: NIS и лактопероксидазы мыши LPO-E, потенциально способной окислять и органифицировать йод. Показано, что введение созданной системы в клеточные линии приводит к продукции обоих функционально активных белков, однако присутствие в клетке лактопероксидазы не сказывается на удержании радиоактивного йода.

5. Получена и использована для прививки меланомы подопытным мышам линия клеток меланомного происхождения M3-3ET-pMIA-rNIS, стабильно продуцирующая натрий-йодидный симпортер. Показано, что в организме мыши привитые опухоли меланомы M3-3ET-pMIA-rNIS способны захватывать до $24,3 \pm 3,5$ % от введённой внутривенно дозы ^{123}I на грамм ткани, что позволяет визуализировать опухоль с помощью ОФЭКТ/КТ.

6. Полиплексы, содержащие лиганд меланокортинового рецептора первого типа, при внутривенном введении продемонстрировали более высокую эффективность доставки гена *rNIS* в опухоли меланомы по сравнению с нелигандированными аналогами. Это позволило визуализировать опухоль с помощью ОФЭКТ/КТ и продемонстрировало перспективность использования созданной репортерной системы на основе NIS для отслеживания процесса доставки генов в опухоли в условиях *in vivo*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи

1. **Кузьмич А.И.** Натрий-йодидный симпортер как репортерный белок в разработке генотерапевтических препаратов.//Медицинский академический журнал, 2012, Т.12 (3), стр. 74-75,
2. Durymanov M.O., Slastnikova T.A., **Kuzmich A.I.**, Khramtsov Y.V., Ulasov A.V., Rosenkranz A.A., Egorov S.Y., Sverdlov E.D., Sobolev A.S. Microdistribution of MC1R-targeted polyplexes in murine melanoma tumor tissue.//Biomaterials, 2013, V.34 (38), P.10209-10216.
3. **Кузьмич А.И.**, Копанцев Е.П., Виноградова Т.В., Сverdlov E.Д. Сравнительный анализ активности различных промоторов при экспрессии гена *NIS* в клетках меланомного происхождения.//Молекулярная биология, 2014, Т. 48 (1), стр. 142-152

Тезисы докладов конференций

1. **Кузьмич А.И.**, Копанцев Е.П., Виноградова Т.В. Разработка системы детекции генотерапевтических агентов в клетках меланомного происхождения на основе натрий-йодидного симпортера (NIS). VIII Международная конференция «Молекулярная генетика соматических клеток», 6 – 9 декабря, 2011, Звенигород. Сборник тезисов, с.67.
2. **Кузьмич А.И.**, Копанцев Е.П., Виноградова Т.В. Анализ экспрессии гена натрий-йодидного симпортера под контролем различных промоторов в клетках меланомы. БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI ВЕКА: 16-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых, 16 - 21 апреля, 2012, Пущино. Сборник тезисов, с.232-233.
3. Розенкранц А.А., Дурьманов М.О., Сlastnikova T.A., **Кузьмич А.И.**, Сverdlov E.Д., Соболев А.С. Использование однофотонной эмиссионной компьютерной томографии для определения эффективности доставки генов при помощи наночастиц и диагностики опухолей. IV съезд биофизиков России, 20-26 августа, 2012, Нижний Новгород, «Новые тенденции и методы в биофизике», стр.79.
4. Durymanov M.O., Slastnikova T.A., Rosenkranz A.A., **Kuzmich A.I.**, Sverdlov E.D., Sobolev A.S. Specific polyplexes for intravital targeting of murine melanoma tumors. 4th International Congress “Nanotechnology, Medicine & Biology”, March, 13-15, 2013, Krems, Austria, P25.
5. Durymanov M.O., Ulasov A.V., Rosenkranz A.A., Khramtsov Y.V., Slastnikova T.A., Alekseenko I.V., **Kuzmich A.I.**, Bezborodova O.A., Nemtsova E.R., Yakubovskaya R.I., Sverdlov E.D., Sobolev A.S. Polyplex nanoparticles for cancer gene therapy. 21st International Symposium “Nanostructures: Physics and Technology”, June, 24-28, 2013, St.-Petersburg, Russia, p.113.
6. Durymanov M.O., Slastnikova T.A., Rosenkranz A.A., **Kuzmich A.I.**, Sverdlov E.D., Sobolev A.S. Distribution of targeted PEI-PEG-based polyplexes in melanoma tumor tissue. 25th European Conference on Biomaterials, September, 8-12, 2013, Madrid, Spain, OPO048.