

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук (ИБХ РАН)

На правах рукописи

Кузьмич Алексей Иванович

**Использование натрий-йодидного симпортера (NIS) для детекции
доставки генотерапевтических агентов в опухолевые клетки**

Специальность 03.01.03 – молекулярная биология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
Свердлов Евгений Давидович,
доктор химических наук,
академик РАН

Москва-2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
ВВЕДЕНИЕ	5
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	9
1. Обзор литературы	9
1.1. Стратегия генной терапии и необходимость адекватных методов контроля	9
1.2. Краткий обзор современных методов молекулярной визуализации <i>in vivo</i>	11
1.3. Радионуклидные репортерные системы	13
1.3.1. Ферментативные репортерные системы	14
1.3.2. Рецепторные радионуклидные системы	15
1.3.3. Транспортные репортерные системы	16
1.4. Натрий-йодидный симпортер	17
1.4.1. Синтез тиреоидных гормонов в организме	17
1.4.2. Радиойоддиагностика и радиойодтерапия	19
1.4.3. Клонирование гена <i>NIS</i> из разных организмов	20
1.4.4. Функциональная экспрессия <i>NIS</i> в организме	21
1.4.5. Структура и транспортная активность <i>NIS</i>	23
1.4.6. Использование <i>NIS</i> в качестве репортерного гена	25
1.4.7. Использование <i>NIS</i> в качестве терапевтического гена	28
1.4.8. Использование специфичных промоторов совместно с <i>NIS</i>	32
2. Материалы и методы	34
2.1. Материалы	34
2.1.1. Культуры эукариотических клеток	34
2.1.2. Бактериальные клетки	34
2.1.3. Животные	34
2.1.4. Реактивы	34
2.1.5. Ферменты	35
2.1.6. Антитела	35
2.1.7. Буферные растворы	35
2.1.8. Микробиологические среды	36

2.1.9. Наборы реактивов	36
2.1.10. Маркеры	36
2.1.11. Олигонуклеотиды	36
2.1.12. Плазмидные векторы	38
2.1.13. Полиплексы	38
2.2. Методы	38
2.2.1. Стандартные процедуры	38
2.2.2. Секвенирование ДНК	39
2.2.3. Выделение РНК гуанидин изотиоционатным методом	39
2.2.4. Синтез одноцепочечной кДНК с помощью обратной транскрипции	39
2.2.5. Полуколичественная оценка экспрессии генов методом ОТ-ПЦР	40
2.2.6. Транзиентная трансфекция клеток в условиях <i>in vitro</i>	41
2.2.7. Вестерн-блот анализ клеточных лизатов	41
2.2.8. Определение промоторной активности методом двойной люциферазной детекции	42
2.2.9. Измерение поглощения ^{125}I клетками в условиях <i>in vitro</i> (RIUA)	43
2.2.10. Измерение пероксидазной активности в экстрактах клеток и кондиционированных средах	44
2.2.11. Получение стабильно трансфицированных клеток с помощью лентивирусного вектора pLVX-Puro	45
2.2.12. Выявление распределения изотопа ^{123}I и его накопления в опухолях с помощью однофотонной эмиссионной компьютерной томографии	46
3. Результаты и обсуждение	47
3.1. Создание экспрессионных векторов, несущих ген <i>rNIS</i> в качестве репортерного гена	47
3.1.1. Поиск биологического источника для получения кДНК гена <i>NIS</i> , анализ содержания транскриптов гена <i>NIS</i> в разных тканях	47
3.1.2. Клонирование кДНК гена <i>rNIS</i>	49
3.1.3. Получение экспрессионных генетических конструкций, несущих ген <i>rNIS</i> под контролем различных регуляторных элементов	51

3.1.4. Оценка длины продукта экспрессии клонированного <i>rNIS</i> в клетках млекопитающих	54
3.2. Исследование активности NIS, образующегося при доставке различных экспрессионных конструкций в клетки меланомного происхождения <i>in vitro</i>	56
3.2.1. Функциональный анализ экспрессионных конструкций с геном <i>rNIS</i> в клетках меланомного происхождения	56
3.2.2. Использование меланомо- и опухолеспецифичных промоторов в репортерной системе на основе <i>rNIS</i>	58
3.3. Изучение диффузии радиойодида из клеток, экспрессирующих <i>NIS</i> , в условиях <i>in</i> <i>vitro</i>	66
3.4. Изучение кинетических параметров репортерной системы на основе <i>NIS</i> в клетках, экспрессирующих лактопероксидазу	68
3.4.1. Клонирование кДНК гена лактопероксидазы мыши (<i>LPO</i>)	70
3.4.2. Получение экспрессионных генетических конструкций, несущих гены	72
<i>LPO-E</i> и <i>LPO-M</i>	72
3.4.3. Функциональный анализ экспрессионных конструкций с генами <i>LPO-E</i> и <i>LPO-</i> <i>M</i> в клетках млекопитающих	75
3.4.4. Изучение диффузии ¹²⁵ I из клеток, экспрессирующих <i>NIS</i> и <i>LPO-E</i> , в условиях <i>in</i> <i>vitro</i>	79
3.5. Создание линии клеток меланомного происхождения, стабильно продуцирующей натрий-йодидный симпортер	81
3.6. Визуализация NIS-позитивных клеток меланомы <i>in vivo</i> с помощью ОФЭКТ/КТ ...	84
3.7. Оценка эффективности системной доставки гена <i>rNIS</i> в опухоли меланомы путем визуализации NIS-позитивных клеток с помощью ОФЭКТ/КТ	86
ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ	91
Заключение	91
Выводы	92
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	93
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	94

ВВЕДЕНИЕ

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-йодидный¹ 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 (TcO₄⁻). 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 радиопрепаратов 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 радиойодида клетками. Разработанная система была успешно использована для изучения эффективности системы невирусной доставки генов на модели мышинной меланомы.

Цель и основные задачи работы

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

¹ Согласно правилам IUPAC «Йод» и однокоренные названия химических соединений следует писать через «И». В то же время в литературе по медицинской тематике чаще используется написание через «Й». Так как данная работа имеет потенциальное приложение в медицинской области, здесь и далее в названиях, содержащих корень «Йод», будет использовано написание через «Й».

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 опухолеспецифичных 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 меланомоспецифичного промотора обеспечивало высокий уровень активности натрий-йодидного симпортера в клетках меланомы. При этом более слабые опухолеспецифичные 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 радиодид, 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 ОФЭКТ (однофотонной эмиссионной компьютерной томографии).

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» (Пушино, 2012), IV съезде биофизиков России (Нижний Новгород, 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).

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1. Обзор литературы

1.1. Стратегия генной терапии и необходимость адекватных методов контроля

Современные достижения фундаментальной науки значительно расширили понимание процессов, происходящих на молекулярном и клеточном уровне в живых системах в норме и при развитии заболеваний. В результате стали развиваться направленные терапевтические стратегии, нацеленные на молекулярные причины патологических процессов, а не на симптомы заболеваний.

В частности, большое внимание получил новый терапевтический подход, основанный на переносе генов в клетки организма, - генотерапия. В общем генотерапия представляет собой исправление или уничтожение генетической причины заболевания путем искусственного введения в клетку новой генетической информации. В настоящее время зарегистрированы сотни клинических испытаний, использующих генотерапию для лечения наследственных патологий и широкого спектра приобретенных заболеваний (<http://www.abedia.com/wiley/>). Экспериментальные исследования подтверждают, что перенос генов в соматические клетки может обеспечивать терапевтический эффект у пациентов со злокачественными, сердечно-сосудистыми и нейродегенеративными заболеваниями. Первые испытания на людях подтвердили осуществимость и безопасность генотерапии, однако, результаты клинических испытаний II/III фазы далеко не всегда оправдывают ожидания исследователей. Это связано с множеством причин. В частности, успех генотерапевтического протокола в значительной степени зависит от специфичной и адекватной доставки терапевтических генов в заданную ткань, а также от пространственно-временного распределения и интенсивности экспрессии гена-интереса. При этом как в модельных доклинических исследованиях, так и в клинических испытаниях одной из серьезных проблем генопрепаратов является адекватное определение экспрессии доставленного гена в целевой ткани.

Классические методы изучения биораспределения и фармакокинетики генопрепаратов в основном заключаются в лабораторном исследовании тканей, полученных с помощью биопсии или аутопсии. Такие методы дают мало информации о поведении генопрепарата в организме, так как они либо не позволяют оценить пространственное и временное распределение используемого генетического вектора и продуктов экспрессии терапевтических генов в тканях, либо являются очень трудоемкими. Поэтому существует необходимость в развитии методов, позволяющих с высокой чувствительностью и

воспроизводимостью многократно проводить оценку распределения генопрепарата и продуктов его экспрессии в живом организме при минимальном воздействии на него. Идеальным был бы низко инвазивный метод, позволяющий в режиме реального времени отслеживать процесс генотерапии и вносить необходимые изменения для его оптимизации. Такие возможности дает молекулярная визуализация *in vivo* (*in vivo* molecular imaging) – группа низко инвазивных методов, позволяющих проводить прямое или косвенное изучение пространственно-временного распределения клеточных и молекулярных процессов, происходящих в реальном времени и в живых клетках [Fomchenko, Holland, 2006; Waerzeggers и др., 2009].

Все используемые в генной терапии методы *in vivo* визуализации включают два принципиальных компонента: (а) репортерные гены (маркерные гены), продукты экспрессии которых можно детектировать в организме; (б) зонды, которые взаимодействуют тем или иным способом с продуктами экспрессии репортерных генов и излучают сигналы, которые могут быть детектированы физическими приборами вне организма.

Для экспрессии репортерных генов создают репортерные генно-инженерные конструкции, основной особенностью которых является наличие экспрессионной кассеты, состоящей из одного или нескольких генов (репортерный и/или терапевтический ген) под контролем регуляторного элемента (промотор или промотор с энхансером). При введении такого генопрепарата в организм в зависимости от типа промотора (конститутивно активный, ткане- или опухолеспецифичный, индуцируемый промотор) экспрессия репортерного гена будет происходить либо во всех трансфицированных клетках, либо только в клетках определенного типа. Выбор используемого промотора зависит от поставленной задачи. При экспрессии репортерного гена в трансфицированных клетках образуется репортерный белок, который, как правило, является ферментом или рецептором, способным конвертировать или связывать специфичный зонд, присутствие которого можно регистрировать тем или иным путем. Взаимодействие репортерного белка с зондом приводит к накоплению последнего в трансфицированных и экспрессирующих репортер клетках, что приводит к усилению регистрируемого неинвазивными методами сигнала.

В зависимости от природы используемого зонда сигнал может представлять собой радиоактивное излучение, свет от фотохимической реакции, сигнал ядерного магнитного резонанса (ЯМР) или другой детектируемый физическими методами сигнал.

В конечном счете, исследователи могут получать различную информацию о ходе генной терапии: отслеживать процесс доставки генопрепарата в целевую ткань; оценивать локализацию, интенсивность и продолжительность экспрессии доставленных генов; наблюдать терапевтический ответ в процессе и по окончании лечения [Miletic и др., 2007].

Для визуализации в условиях *in vivo* идеальный репортер должен обладать следующими свойствами:

Во-первых, он должен быть нетоксичным, неиммуногенным и неметаболизирующимся в клетках.

Во-вторых, репортерный белок, а также специфичные зонды к нему должны обнаруживаться только в трансфицированных клетках.

Кроме того, должна наблюдаться высокая степень корреляции между уровнем продукции репортерного белка и интенсивностью регистрируемого сигнала.

Для простоты проведения генно-инженерных манипуляций, а также в силу ограниченной емкости многих векторных систем, размер репортерного гена не должен превышать 2000 п.н.о.

Также специфичный зонд должен хорошо проникать в нужные ткани и клеточные органеллы, быть удобным для связывания с регистрируемыми метками (для мечения), а также быстро выводиться из организма [Youn, Chung, 2013].

1.2. Краткий обзор современных методов молекулярной визуализации *in vivo*

Последние несколько десятилетий активно развивались диагностические технологии визуализации, такие как томография на основе ЯМР, рентгеновская компьютерная томография и радионуклидные методы сканирования (ПЭТ и ОФЭКТ), что значительно изменило облик современной медицины. Данное развитие сопровождалось растущим интересом использования этих технологий в качестве удобных инструментов, применяемых для получения детализированных изображений, отражающих сведения об анатомии, физиологии и метаболизме лабораторных животных. В конечном счете, все это привело к появлению молекулярной визуализации *in vivo*, в рамках которой с помощью данных технологий визуализации можно получать детальную информацию о клеточных и молекулярных процессах, происходящих в организме экспериментальных животных. В последние два десятка лет было развито множество различных систем репортерный ген/специфический зонд, а также методов их детекции в организме. При этом важно отметить, что все существующие сегодня системы молекулярной визуализации *in vivo* отличаются по следующим параметрам: разрешающая способность, глубина проникновения, доступность инъецируемых биосовместимых зондов, стоимость и чувствительность детекции сигнала от зонда [Weissleder, 2001].

В настоящий момент большинство таких систем можно разделить на три группы по типу регистрируемого сигнала: оптические системы, системы на основе ядерного магнитного резонанса (ЯМР) и радионуклидные системы.

В оптических системах репортерные белки внутри трансфицированной ткани способны испускать световое излучение, которое проходит через ткани организма и регистрируется внешними высокочувствительными устройствами [Waerzeggers и др., 2009]. По способу излучения света репортерами выделяют две основные группы оптических систем: флуоресцентные и биолюминесцентные. Оптические репортерные системы очень широко используются в доклинических испытаниях генопрепаратов, так как они позволяют проводить эффективную, неинвазивную, сравнительно недорогую и быструю оценку экспрессии трансгенов при их доставке *in vivo* [Waerzeggers и др., 2009]. При этом постоянно развиваются новые оптические репортеры с улучшенными характеристиками и новые устройства их детекции, обладающие более высокой чувствительностью, специфичностью и глубиной детекции. Поэтому можно говорить о том, что оптические методы являются хорошим выбором для проведения неинвазивной визуализации доставки трансгенов в организме небольших животных. Однако низкая глубина проникновения светового излучения, а также отсутствие используемых в клинике оптических систем детекции и соответствующих флуоресцентных или люминесцентных зондов не позволяет пока рассматривать данную группу методов в качестве универсальных, то есть пригодных для использования как в доклинических так и в клинических испытаниях [Blow, 2009].

В другую группу входят репортеры, детекция которых в организме осуществляется с помощью методов визуализации и спектроскопии на основе ядерного магнитного резонанса. В настоящий момент существует множество таких систем, подробно ознакомиться с ними можно, например, в обзорах [Lee, Lee, Biswal, 2012; Vandsburger и др., 2013]. Тем не менее все магнитно-резонансные репортерные системы обладают рядом общих преимуществ и недостатков. Одним из основных преимуществ является возможность получать изображения тканей, расположенных на любой глубине организма, что позволяет использовать данные репортеры для визуализации экспрессии трансгенов в больших животных. При этом МРТ (магнитно-резонансная томография) одновременно предоставляет информацию об анатомии всего тела животного, что позволяет с высокой точностью привязать локализацию репортеров к органам и тканям животного. Кроме того, данные методы визуализации характеризуются высоким пространственным разрешением (до микрометров), что позволяет получать изображения высокого качества. Наконец, устройства для проведения МРТ, а также некоторые зонды (контрастирующие агенты) в настоящий момент уже широко используются в клинике [Waerzeggers и др., 2009]. Однако, существуют недостатки, ограничивающие

использование магнитно-резонансных репортерных систем. Основным недостатком является значительно более низкая чувствительность магнитно-резонансных методов по сравнению с другими способами молекулярной визуализации (на несколько порядков ниже), поэтому для надежной детекции требуются большие количества вводимого контрастирующего агента либо магнитные поля более высокой мощности [Lee, Lee, Biswal, 2012]. Кроме того, стоимость устройств для проведения МРТ является сравнительно высокой, так как для этого метода используются мощные магнитные поля. Таким образом, магнитно-резонансные репортерные системы предоставляют уникальные возможности для биовизуализации экспрессии генов в доклинических и клинических исследованиях, но, по-видимому, необходимо их дальнейшее развитие для более широкого использования.

В третью группу репортерных систем попадают подходы, использующие радионуклидные методы визуализации, такие как ПЭТ и ОФЭКТ. Устройства для проведения ПЭТ впервые были описаны в середине 1960х, принцип их работы основан на детекции гамма-излучения, испускаемого радиоактивно мечеными соединениями, такими как радиоактивно меченая глюкоза. Они использовались и используются в клинике для визуализации метаболических процессов, проходящих по всему организму, а также для отслеживания накопления и распределения меченых молекул [Blow, 2009]. Благодаря широкому использованию радионуклидных диагностических методов в клинике значительно ускоряется процесс внедрения новых зондов и радионуклидных методов молекулярной визуализации от экспериментов на лабораторных животных до испытаний на человеке.

Исходя из соображений трансляции результатов лабораторных экспериментов в клинику мы в данной работе выбрали в качестве систем молекулярной визуализации группу радионуклидных репортеров. Дальнейший обзор литературы посвящен этим универсально применимым как в доклинических исследованиях на животных, так и в клинической диагностике и терапии методам визуализации.

1.3. Радионуклидные репортерные системы

Репортерные гены из класса радионуклидной визуализации кодируют белки, способные взаимодействовать и захватывать вводимые извне радиоактивно меченые молекулы, что приводит к локальному накоплению радиоактивности. Как правило, для радионуклидной визуализации используют радиопрепараты с изотопами, испускающими при распаде позитроны или гамма-кванты. С помощью методов ядерной медицины, таких как ПЭТ (позитронно-эмиссионная томография), ОФЭКТ или сцинтиграфия, можно определять локализацию и количество накопленного радиопрепарата, что может отражать локализацию

и уровень экспрессии репортерного гена. Важно отметить, что все радионуклидные репортерные системы используют связку репортерного гена и специфического радиомеченого субстрата. По типу взаимодействия между репортерным белком и радиофармпрепаратом (пробой) можно выделить три типа радионуклидных систем: ферментативные, рецепторные и транспортерные [Ahn, 2014]. Ниже будут рассмотрены примеры систем каждого типа.

1.3.1. Ферментативные репортерные системы

Гены этой группы кодируют ферменты, способные катализировать внутриклеточную модификацию радиомеченого субстрата, что приводит к накоплению продуктов реакции в трансфицированных клетках. Одним из самых используемых генов этой группы является *HSV1-tk*, кодирующий тимидинкиназу вируса простого герпеса. Этот белок, как и тимидинкиназа 1 млекопитающих, конвертирует тимидин в его фосфорилированную форму ТМФ. Однако, вирусный белок обладает меньшей субстратной специфичностью, поэтому способен катализировать также реакцию фосфорилирования различных нуклеозидных аналогов тимидина или гуанозина (например, ганцикловир), в результате чего образуются соответствующие нуклеозид монофосфаты [Waerzeggers и др., 2009]. В свою очередь, образующиеся фосфорилированные аналоги нуклеозидов не способны свободно проходить через плазматическую мембрану, поэтому накапливаются в клетках. В настоящее время разработано несколько специфичных субстратов HSV1-tk, меченных ^{18}F или радиоизотопами йода (^{123}I , ^{124}I , ^{131}I), что позволяет отслеживать экспрессию этого репортера с помощью ПЭТили ОФЭКТ [Ahn, 2014; Alauddin, Gelovani, 2010]. Кроме того, тимидинкиназа способна действовать в качестве ингибитора репликации ДНК, осуществляя внутриклеточное превращение нетоксичных нуклеозидов в токсичные для клеток соединения [Sverdlov, 2009]. Таким образом, *HSV1-tk* можно использовать и в качестве репортерного и в качестве терапевтического гена, что привело к его широкому применению в геннотерапевтических протоколах. В качестве других примеров ферментативных радионуклидных систем, использовавшихся для радионуклидной визуализации *in vivo*, можно привести следующие пары фермент/субстрат: дезоксицитидинкиназа *hdCK*/ ^{18}F -2-дезоксидезокси-2-фторарабинофуранозилцитозин, цитозиндезаминаза *CD*/ ^{18}F -5-фторцитозин [Ahn, 2014]. В целом ферментативные радионуклидные системы отличаются высоким уровнем сигнала. Среди недостатков можно выделить зависимость сигнала от скорости проникновения субстрата в клетки, потенциальную токсичность образующегося продукта для клеток (как в

случае с ганцикловир монофосфатом), а также возможность развития иммунного ответа на такие репортеры, как HSV1-tk.

1.3.2. Рецепторные радионуклидные системы

Репортерные белки этой группы представляют собой рецепторы, заякоренные в плазматической мембране клеток и способные селективно связывать соответствующий радиомеченный лиганд. При этом в качестве репортерных, как правило, используют гены человека, эндогенная экспрессия которых существенно ограничена определенным органом. Человеческое происхождение генов резко снижает вероятность развития иммунного ответа при проведении клинических испытаний, кроме того, благодаря этому появляется возможность использовать радиоактивно меченые лиганды уже применяющиеся в медицине. Одним из генов этой группы является *SSTR2*, кодирующий рецептор соматостатина второго типа. Эндогенная экспрессия этого гена в основном ограничена гипофизом, хотя в других тканях она тоже может наблюдаться, но на низком уровне [Rogers и др., 1999]. Разработаны радиомеченные аналоги соматостатина, селективно связывающиеся с *SSTR2*, такие как ^{111}In -, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ - или $^{94\text{m}}\text{Tc}$ -меченные октреотид и октреотат, с помощью которых можно отслеживать экзогенную экспрессию *SSTR2* [Waerzeggers и др., 2009]. Кроме того, относительно недавно были разработаны новые радиоактивно меченые лиганды ^{68}Ga -DOTATOC (комплекс ^{68}Ga и (DOTA-Phe-Туг) октреотида), ^{68}Ga -DOTATATE (комплекс ^{68}Ga и (DOTA-Туг) октреотата) и ^{111}In -DOTABASS (комплекс ^{111}In с хелатной группой DOTA, присоединенной к селективному пептидному антагонисту *SSTR2*), которые обладают более высокой специфичностью к *SSTR2* и быстрее выводятся из организма, что значительно уменьшает фоновую активность [Brader, Serganova, Blasberg, 2013].

Другой представитель этой группы репортеров – ген *DRD2*, который кодирует рецептор дофамина D2R. Этот рецептор у человека обнаруживается в полосатом теле головного мозга, он является одним из наиболее изученных рецепторов, используемых в области ядерной нейробиологии. Радиоактивно меченый лиганд D2R, ^{18}F -этилспиперон (FEPS), применяется в клинике для визуализации дофаминэргической системы человека с помощью ПЭТ и также подходит для исследования локализации ectopической экспрессии (экспрессия в органах и тканях, которым она не свойственна в норме) этого гена [MacLaren и др., 1999]. Существуют и другие радиоактивно меченые лиганды этого рецептора, такие как антагонист ^{11}C -раклоприд, подходящие для ПЭТ [Waerzeggers и др., 2009].

Один из недостатков использования рецепторов в качестве репортеров – изменение функционального состояния трансфицированных клеток при взаимодействии рецепторов с

эндогенными природными лигандами. Так, связывание D2R с дофамином может индуцировать активацию сигнальных путей, опосредованных G-белками, приводящую к снижению уровня клеточного цАМФ [Brader, Serganova, Blasberg, 2013]. Для решения этой проблемы был создан модифицированный белок D2R80A, который не активирует внутриклеточную сигнализацию при связывании со своими лигандами и, таким образом, больше подходит для неинвазивной визуализации трансфицированных клеток [Kummer и др., 2007].

1.3.3. Транспортные репортерные системы

Репортерные гены этой группы кодируют белки-транспортёры, закоренные в цитоплазматической мембране и осуществляющие селективный транспорт ионов или низкомолекулярных соединений из окружающей среды внутрь клеток. Транспортируемые этими белками соединения не способны самостоятельно диффундировать через клеточную мембрану, поэтому извне они попадают только в клетки, экспрессирующие соответствующие транспортёры. При этом транспортёры осуществляют энергозависимый перенос молекул, благодаря чему в клетках может достигаться значительное накопление этих соединений по сравнению с концентрацией в окружающей среде. Использование радиоактивно меченых субстратов транспортёров приводит к локальному накоплению радиоактивности в трансфицированных клетках, что можно отслеживать с помощью методов ядерной медицины [Waerzeggers и др., 2009].

Наибольшее распространение получили два транспортёра hNET (человеческий транспортёр норадреналина) и NIS. Ген первого из них – *hNET (SLC6A2)* – кодирует человеческий транспортёр норадреналина (норэпинефрина). В норме этот белок обнаруживается в мембране норадренергических нейронов, находящихся в центральной и симпатической периферической нервной системе, где он обеспечивает быстрый обратный захват норадреналина из синаптической щели. Некоторые радиомеченные субстраты NET, такие как ^{11}C -эфедрин или $^{123/124}\text{I}$ -MIBG (мета-йодобензилгуанидин), уже используются в клинике для ядерной визуализации нейроэндокринных опухолей, экспрессирующих ген *hNET* [Brader, Serganova, Blasberg, 2013], что делает эту систему более доступной для исследователей.

Другим перспективным репортером является ген *NIS*, кодирующий натрий-йодидный симпортер. NIS – 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 простые анионы, например пертехнетат (TcO_4^-), для получения радиофармпрепаратов на их основе, как правило, не требуется использования сложных радиохимических методов. Состояние щитовидной железы легко отслеживать путем введения в организм хорошо изученных радиофармпрепаратов на основе радиоактивных изотопов йода или технеция, что уже несколько десятков лет используется в клинике [Ahn, 2012]. Кроме того, *NIS* имеет потенциал применения и в качестве терапевтического гена. Таким образом, репортерная система на основе *NIS* обладает рядом преимуществ по сравнению с другими радионуклидными системами, благодаря чему она широко используется в проведении доклинических и клинических испытаний генопрепаратов.

Несмотря на разнообразие, радионуклидные репортерные системы обладают рядом общих преимуществ и недостатков. Среди преимуществ можно выделить высокую чувствительность радионуклидной детекции, неограниченную глубину визуализации за счет прозрачности тканей для гамма-излучения (это снимает ограничения на использование таких репортеров в испытаниях на животных большого размера и в клинике), хорошее соотношение сигнал/шум и широкий спектр радиомеченных проб, используемых в клинике. Недостатки этих репортеров: умеренное пространственное разрешение (как правило, миллиметры) по сравнению с методами на основе ЯМР, сложные системы детекции сигнала, зависимость от фармакокинетики радиозондов, а также сложность работы с радиоактивными препаратами, заключающаяся в их нестабильности и опасности для работы [Waerzeggers и др., 2009]. Можно заключить, что радионуклидные репортерные системы в настоящий момент хорошо развиты и продолжают развиваться, возможно, они не так удобны в лабораторных исследованиях, как оптические методы, но имеют значительно больший потенциал для применения в ходе клинических испытаний генопрепаратов.

В следующем разделе будут подробно рассмотрены биологические особенности натрий-йодидного симпортера и его применение в генотерапевтических исследованиях.

1.4. Натрий-йодидный симпортер

1.4.1. Синтез тиреоидных гормонов в организме

Йод представляет собой важный элемент в физиологии Хордовых, так как он является структурным компонентом основных тиреоидных гормонов тироксина (T_4) и трийодтиронина (T_3). Щитовидная железа является органом, в котором осуществляется синтез этих гормонов. Так как содержание этого элемента в плазме млекопитающих является

крайне низким (для свободного йодида оно составляет 50-300 нМ [Carrasco, 1993]), в щитовидной железе выработался очень эффективный механизм его накопления из кровотока. Еще в 1896 году было показано, что она способна концентрировать йодид из кровотока [Baumann, 1896], при этом йодид концентрируется в 20-40 раз относительно своего плазматического уровня [La Vieja De и др., 2000]. Далее в щитовидной железе происходит включение захваченного йодида в состав тиреоглобулина (этот процесс называют органификацией), образование йодосодержащих тиреоидных гормонов и их секреция в кровотока.

Биосинтез тиреоидных гормонов осуществляется в фолликулах щитовидной железы с помощью многокомпонентного и многоступенчатого механизма, основные участники которого в настоящий момент идентифицированы. На первом этапе йодид из кровотока транспортируется через базолатеральную мембрану в цитоплазму клеток фолликула. Этот процесс осуществляет НИС, движущей силой является трансмембранный градиент ионов натрия, создаваемый и поддерживаемый Na^+/K^+ -АТФ-азой (Na^+/K^+ аденозинтрифосфатазой). Далее захваченный йодид диффундирует через цитоплазму фолликулярных клеток, после чего переносится через апикальную мембрану тироцитов в полость фолликула. Белок, осуществляющий этот перенос, до конца не идентифицирован. В полости фолликула происходит органификация йодида. За этот процесс отвечают сразу несколько участников. Дуальная оксидаза $\text{Duox}2$ обеспечивает продукцию пероксида водорода в люмене фолликула, пероксид водорода, в свою очередь, используется тиреопероксидазой (ТРО) для окисления йодида до молекулярного йода. Молекулярный йод ковалентно связывается с остатками тирозина в составе тиреоглобулина, который составляет основную долю коллоида (вещество, заполняющее фолликулярную полость). При этом образуются 3-монойодтирозин (МИТ) и 3,5-дийодтирозин (ДИТ), которые, взаимодействуя друг с другом, образуют Т3 и Т4, связанные с тиреоглобулином. В составе тиреоглобулина тиреоидные гормоны хранятся в полости фолликул. При стимуляции тиреотропным гормоном фолликулярные клетки с помощью эндоцитоза захватывают йодированный тиреоглобулин, расщепляют его эндосомальными протеазами, после чего свободные Т3 и Т4 секретируются через базолатеральную мембрану в кровотока [Portulano, Paroder-Belenitsky, Carrasco, 2014]. Схематично биосинтез тиреоидных гормонов приведен на Рисунке 1.

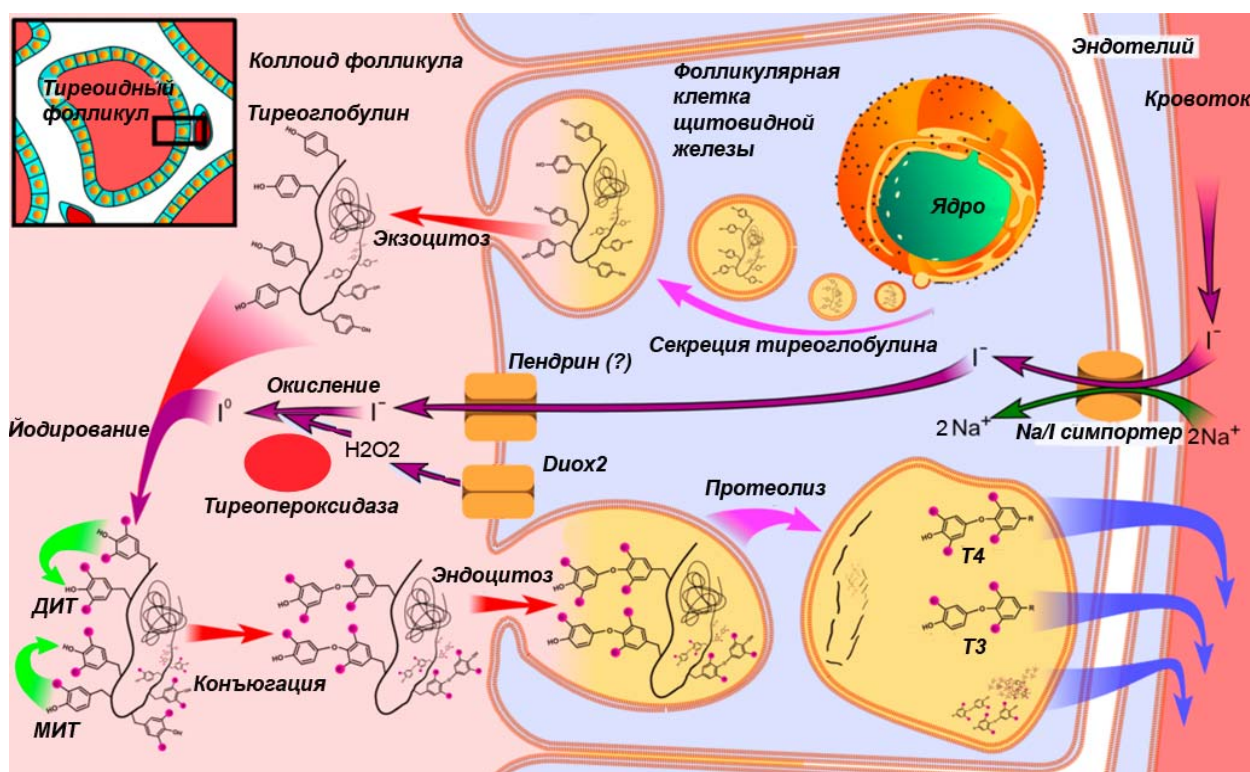


Рисунок 1. Биосинтез гормонов щитовидной железы. В левом верхнем углу

(врезка) изображен фолликул щитовидной железы, состоящий из одного слоя эпителиальных клеток, окружающих коллоид. Справа от фолликула изображен примыкающий кровеносный сосуд. В центральной части рисунка изображены цитоплазма фолликулярной клетки, а также основные этапы синтеза тироксина (Т4) и трийодтиронина (Т3): захват и органификация йодида в коллоиде, эндоцитоз и протеолиз йодированного тиреоглобулина, секреция образующихся гормонов в кровоток. МИТ - 3-монойодтирозин, ДИТ - 3,5-дийодтирозин. Использовано изображение из [Boron, Boulpaer, 2003], стр. 1300, с изменениями.

1.4.2. Радиойоддиагностика и радиойодтерапия

Способность щитовидной железы накапливать йодид уже более 70 лет используется в диагностике заболеваний щитовидной железы. При системном введении в организм радиофармпрепараты на основе радиоактивных изотопов йода (^{123}I) либо на основе пертехнетата ($^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$) накапливаются в тиреоидной ткани за счет активности НИС, детекция этих изотопов методами ядерной медицины позволяет определить точную локализацию и активность такой ткани в организме [Chung, 2002]. Препараты ^{131}I успешно используются для радиотерапии гиперфункционирующей тиреоидной ткани. В этом случае накопление изотопа в патологической ткани приводит к ее избирательному облучению и деструкции. Такой подход успешно используется для лечения доброкачественных тиреоидных заболеваний, таких как диффузный токсический зоб (гипертиреоз или болезнь

Грэйвса) [Vonnema, Hegedüs, 2012]. При этом эффективность радиойодтерапии достаточно высока, описано, что излечение гипертиреоза наступает в 50-90% случаев через 3-12 месяцев после терапии ^{131}I .

Радиойодтерапия также широко используется для лечения дифференцированного рака щитовидной железы, при котором опухолевые клетки сохраняют способность накапливать йодид. Важно отметить, что метастазы таких опухолей часто сохраняют активность НИС, благодаря чему также подвержены терапии ^{131}I [Portulano, Paroder-Belenitsky, Carrasco, 2014]. Эффективность лечения чрезвычайно высока: в настоящее время 5-летняя выживаемость пациентов с тиреоидной карциномой составляет 97% (согласно базе данных SEER (seer.cancer.gov)). При этом, как показали большие ретроспективные исследования, радиойодтерапия является наиболее мощным фактором, связанным с выживаемостью без признаков заболевания [Mazzaferrì, 1997], а также с пониженной вероятностью рецидива или гибели от опухоли [Woodrum, Gauger, 2005]. Более того, поглощение радиойодида дистантными метастазами увеличивало десятилетнюю выживаемость пациентов с 10% до 56% [Durante и др., 2006]. Неудивительно, что радиойодтерапия заняла столь прочное положение в медицине и используется уже десятки лет.

1.4.3. Клонирование гена *NIS* из разных организмов

Еще в начале 1960-х было установлено, что тиреоидный йодидный транспорт, ранее называемый йодидным насосом или йодидной ловушкой, является насыщаемым и специфичным. Впоследствии было показано, что движущей силой поглощения йодида против электрического градиента является трансмембранный градиент ионов натрия, создаваемый и поддерживаемый $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATP}$ -азой. А сам йодидный насос – это белок НИС, который относится к семейству натрий-глюкозных котранспортеров [Chung, 2002].

Клонирование кДНК гена, кодирующего *NIS* крысы (*rNIS*), а также всестороннее биохимическое, иммунологическое и электрохимическое описание этого белка было сделано лабораторией Карраско в 1996 году [Dai, Levy, Carrasco, 1996; Eskandari и др., 1997]. Клонирование *rNIS* его группой означало большой шаг вперед. Сразу после этого в другой лаборатории, используя описанную последовательность *rNIS*, был клонирован и секвенирован человеческий гомолог *hNIS* [Smanik и др., 1996]. Человеческий и крысиный белки очень похожи – идентичность первичной структуры составила 84%. Позднее была идентифицирована кДНК симпортера мыши (*mNIS*) [Pinke и др., 2001]. Этот белок оказался очень похож на *rNIS* (идентичность – 95%), при этом идентичность его первичной структуры с *hNIS* также составила 84%.

Несмотря на высокую степень сходства, rNIS и hNIS, по-видимому, имеют различную способность концентрировать йодид. Было показано, что клетки, стабильно трансфицированные ретровирусным вектором с кДНК *rNIS*, захватывают большее (до 5 раз) количество радиоiodида из среды, по сравнению с *hNIS* [Heltemes и др., 2003]. Различие стабильно наблюдалось в клетках человеческого, крысиного и мышиноного происхождения. Эти данные показывают, что ген крысиного происхождения лучше подходит для использования в качестве репортерного или терапевтического гена. Недавно был создан ген *opt-hNIS*, кодирующий такой же hNIS, но оптимизированный по составу кодонов для более высокого уровня экзогенной экспрессии в клетках млекопитающих [Kim и др., 2015]. Прямое сравнение нового гена с *hNIS* дикого типа, показало, что оптимизированный ген обеспечивает более высокий захват радиоiodида клетками в условиях *in vitro*, а также лучше подходит для использования в качестве репортерного и терапевтического гена в экспериментах *in vivo*. Прямое сравнения свойств *rNIS* и *opt-hNIS* не проводилось.

1.4.4. Функциональная экспрессия NIS в организме

Как описано ранее, основную роль в организме натрий-йодидный симпортер играет в щитовидной железе. В нормальной тиреоидной ткани фолликулярные эпителиальные клетки проявляют неоднородный паттерн при окраске с антителами к hNIS. В составе каждого фолликула отдельные клетки проявляют сильное иммуноокрашивание и значительно отличаются от слабopоложительных или неокрашенных клеток. Приблизительно 30% фолликулярных клеток обнаруживали детектируемые количества hNIS белка [Filetti и др., 1999]. В NIS-положительных клетках окрашивание ограничивалось базолатеральной мембраной. Стромальные клетки, лимфоциты, внутрифолликулярные макрофаги и клетки эндотелия сосудов не реагировали с антителами к hNIS. Иной паттерн наблюдался для рецептора TSH (тиреотропного гормона), который конститутивно обнаруживался во всех нормальных фолликулярных клетках [Caillou и др., 1998]. Важно подчеркнуть, что в щитовидной железе продуцируется функционально активный симпортер, а также функционирует система органификации йодида (см. выше), за счет чего на этот орган приходится 70-90% от общего содержания йода в организме человека [Riggs, 1952].

Новорожденным требуется значительное количество йодида, идущего на образование тиреоидных гормонов, необходимых для нормального развития мозга. В связи с этим во время беременности и в период лактации молочные железы эффективно накапливают йодид, за счет чего концентрация йодида в грудном молоке достигает 150-180 мкг/л [Semba, Delange, 2001]. При этом NIS обнаруживается на базолатеральной мембране альвеолярных

клеток только в лактирующей молочной железе, где обеспечивает накопление йодида из кровотока в молоко [Cho и др., 2000], на других физиологических стадиях симпортер в молочной железе, как правило, не обнаруживается. В отличие от щитовидной железы, где экспрессия *NIS* регулируется гормоном TSH, в молочной железе экспрессия этого гена индуцируется окситоцином, при этом такая индукция усиливается повышенным содержанием в плазме гормонов пролактина и эстрогена, что наблюдается в послеродовой период [Tazebay и др., 2000].

Другие нетиреоидные органы, среди которых желудок, слюнные железы, кишечник и слезные железы также экспрессируют функциональный *NIS* [Dohán и др., 2003]. В органах пищеварительной системы *NIS* обнаруживается на базолатеральной мембране протоковых клеток слюнных желез и клеток слизистой желудка [Altorjay и др., 2007; Josefsson и др., 2002], тогда как в клетках эпителия тонкой кишки этот белок обнаруживается на апикальной мембране [Nicola и др., 2009]. По-видимому, такое различие имеет физиологический смысл. Йодид из пищи и воды, употребляемыми перорально, захватывается клетками кишечника через апикальную мембрану с помощью *NIS*, после чего переносится в кровоток [Nicola и др., 2009]. Слюнные железы и слизистая желудка, напротив, выводят йодид из кровотока и высвобождают его в желудочно-кишечный тракт [Brown-Grant, 1961]. Почки не способны реабсорбировать йодид, поэтому большая его часть (90%) выводится именно через почки. Было предположено, что такая система, в которой йодид секретируется слюнными железами и желудком в ЖКТ, после чего он реабсорбируется в кишечнике, сформировалась как механизм сохранения йодида в организме [Miller, Swanson, Spalding, 1975].

Кроме того, *NIS* в нетиреоидных тканях может выполнять и другую функцию. Слезные и слюнные железы, желудок и лактирующие молочные железы также экспрессируют элементы лактопероксидазной системы, обеспечивающей природную антибактериальную защиту [Bosch, Doorne Van, Vries De, 2000]. Антибактериальная активность этой системы обеспечивается путем генерации перекиси водорода, гипоиодита (IO^-) и гипотиоцианата (OSCN^-). Часть йодида, концентрируемая в этих тканях с помощью *NIS*, в присутствии пероксида водорода окисляется эндогенной лактопероксидазой до гипоиодита, который проявляет бактерицидное действие [Majerus, Courtois, 1992]. Таким образом *NIS* в этих тканях может быть необходим также и для поддержания врожденной антибактериальной защиты.

1.4.5. Структура и транспортная активность NIS

Ген *NIS* человека (*SLC5A5*) расположен на 19-ой хромосоме и кодирует интегральный мембранный гликопротеин, состоящий из 643 аминокислотных остатков и с молекулярной массой примерно 70-90 кДа. Кодирующий участок *hNIS* содержит в себе 15 экзонов, разделенных 14 интронами. Известно 2 транскрипта этого гена: один (ENST00000222248) имеет длину 3576 п.о. и кодирует полноразмерный *hNIS*, другой (ENST00000597109) – 573 п.о., содержит один из интронов и не кодирует белковый продукт.

Натрий-йодидный симпортер относится к семейству натрий-зависимых транспортеров SLC5 (натрий-глюкозные котранспортеры) и, как и другие представители этого семейства, является интегральным белком мембраны, содержащим 13 трансмембранных сегментов, внеклеточный N-конец и внутриклеточный C-конец [Levy и др., 1998]. Белок подвергается фосфорилированию, большинство фосфатных групп находят на C-конце. Этот конец, по-видимому, важен для внутриклеточного транспорта NIS и его доставке к цитоплазматической мембране [Portulano, Paroder-Belenitsky, Carrasco, 2014]. NIS является высокогликозилированным белком, в его последовательности описано 3 сайта N-гликозилирования, расположенных во внеклеточных сегментах, однако, гликозилирование не является необходимым для транспортной активности [Portulano, Paroder-Belenitsky, Carrasco, 2014].

Натрий-йодидный симпортер осуществляет сопряженный транспорт ионов натрия Na^+ и йодид-ионов I^- из внеклеточной среды внутрь клеток через цитоплазматическую мембрану, соотношение перенесенных ионов при этом составляет $2 \text{Na}^+ : 1 \text{I}^-$, а сам перенос является электрогенным [Eskandari и др., 1997]. В этом процессе йодид транспортируется в клетки против своего электрохимического градиента (в клетках создается в десятки раз большая концентрация йодида по сравнению с интерстицием), поэтому симпортер сопрягает его с процессом переноса ионов Na^+ внутрь клетки, который протекает по электрохимическому градиенту Na, создаваемому Na^+/K^+ -АТФ-азой [Filetti и др., 1999]. Таким образом, трансмембранный градиент натрия, создаваемый за счет энергии гидролиза АТФ, работает в качестве движущей силы йодидного поглощения. В связи с этим, NIS-опосредованный йодидный транспорт ингибируется убаином - ингибитором натрий-калиевой аденозин трифосфатазы [Chung, 2002].

Помимо йодида некоторые другие анионы переносятся с помощью NIS:

$\text{I}^- = \text{SeCN}^- > \text{SCN}^- > \text{ClO}_3^- > \text{NO}_3^-$ (ионы указаны в соответствии со скоростью их переноса) [Eskandari и др., 1997]. Кроме того, в меньшей степени этот белок способен транспортировать ионы Br^- , BF_4^- , IO_4^- , BrO_3^- , TcO_4^- (пертехнетат), At^- (астатид), ReO_4^- (перренат) и ClO_4^- (перхлорат). Перечисленные ионы различны как по размерам, так и по

геометрии, единственный очевидный общий знаменатель этих транспортируемых субстратов – анионная одновалентность. Кроме того, показано, что, чем ближе размер одновалентного аниона к размеру йодид-иона, тем лучше он переносится [Chung, 2002]. Тиоцианат (SCN^-) и перхлорат (ClO_4^-) при значительных концентрациях способны замещать йодид-ионы в процессе транспорта, опосредованного NIS, поэтому они часто используются в качестве конкурентных ингибиторов этого белка при проведении экспериментов.

Специфичность натрий-зависимых котранспортеров к иону натрия, как движущему катиону, тоже не абсолютна. Транспорт йодида через NIS не может осуществляться за счет градиента H^+ (в отличие от некоторых представителей семейства SLC5), но градиент Li^+ способен обеспечивать транспорт на пониженном уровне (10%-20% от Na^+ -опосредованного транспорта) [Eskandari и др., 1997].

Помимо различных субстратов NIS существуют различные изотопы элементов, входящих в состав переносимых ионов. Радиоактивные субстраты могут использоваться в рамках ядерной медицины, при этом альфа- и бета-излучающие изотопы могут использоваться в терапевтических целях для радиотерапии тканей, тогда как гамма- и позитрон-излучающие изотопы имеют применение в диагностике в связке с ОФЭКТ и ПЭТ. Действительно, многие радиоактивные субстраты NIS сегодня уже используются (например, $^{131}\text{I}^-$ и $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$) или имеют потенциал использования в ядерной медицины в связке с NIS [Ahn, 2012]. В Таблице 1 приведены основные изотопы, их свойства и область их применения.

Таблица 1. Радиоактивные субстраты NIS, их свойства и потенциал применения в ядерной медицине. Большой пробег указан для частиц, длина пути которых в организме сопоставима с размерами тела человека. Использована таблица из [Ahn, 2012] с дополнениями.

Радиоизотоп (соответствующий субстрат NIS)	Тип основного излучения	Период полураспада	Пробег (длина пути испущенной частицы)	Медицинское применение (способ регистрации)
^{123}I (I-)	гамма	13,2 ч	Большой	Диагностика (ОФЭКТ)
^{124}I (I-)	позитрон/гамма	4,2 д	Большой	Диагностика (ПЭТ)
^{125}I (I-)	гамма	59,4 д	Большой	Диагностика (ОФЭКТ)
^{131}I (I-)	бета/гамма	8 д	2.6-5 мм	Радиойодтерапия (средние опухоли)
$^{99\text{m}}\text{Tc}$ (TcO_4^-)	гамма	6 ч	Большой	Диагностика (ОФЭКТ)
^{18}F (BF_4^-)	позитрон	109,8 мин	Большой	Диагностика (ПЭТ)
^{186}Re (ReO_4^-)	бета/гамма	90,6 ч	1-3.6 мм	Терапия (средние опухоли)
^{188}Re (ReO_4^-)	бета/гамма	17 ч	23-32 мм	Терапия (крупные опухоли)
^{211}At (At-)	альфа/рентген	7,2 ч	40-80 мкм	Терапия (небольшие опухоли и микрометастазы)

1.4.6. Использование NIS в качестве репортерного гена

Вскоре после клонирования гена *rNIS* была продемонстрирована возможность его использования для неинвазивной визуализации опухоли *in vivo* [Shimura и др., 1997]. Для этого авторы исследования использовали линию клеток крысиного тиреоидного происхождения FRTL-Тс. В ходе длительной культивации эти клетки утратили способность концентрировать йодид (родительская линия FRTL проявляла такую активность). Клетки FRTL-Тс были трансфицированы экспрессионным плазмидным вектором, содержащим кДНК *rNIS*, после чего путем селекции на среде с антибиотиком были отобраны стабильно трансфицированные клетки (Тс-rNIS). Полученная линия в условиях *in vitro* была способна накапливать радиойодид. Далее крысам прививали опухоли из клеток Тс-rNIS, животным вводили следовые количества ^{125}I и с помощью кассет для радиолуминографии (phosphorimaging cassette) получали последовательные изображения распределения радиоизотопа в организме. Исследователи смогли отследить динамику появления и исчезновения радиоактивности в щитовидной железе, опухоли и всем теле животных. Пиковое поглощение радиойодида наблюдалось в опухоли через 90 минут после введения изотопа и падало до половины за 6 часов. Авторадиография образцов опухоли и плазмы,

взятых через 2 часа после инъекции, показала, что опухоли Tc-rNIS накапливали до 27,5% от введенной дозы изотопа, а концентрация радиойодида в опухоли была до 27,3 раз выше чем в плазме крови. При этом контрольные опухоли FRTL-Tc практически не накапливали радиойодид. Авторы построили модель, согласно которой 5 % NIS-экспрессирующих клеток в опухоли было бы достаточно для того, чтобы содержание радиоизотопа в опухоли превышало в два раза его содержание в плазме крови. Таким образом, данное исследование продемонстрировало применимость *NIS* в качестве чувствительного и количественного репортера.

Немного позже была показана возможность визуализации в условиях *in vivo* стабильно трансфицированных *rNIS* меланомных ксенографтов, при этом для визуализации использовалась сцинтиграфия ^{123}I с клинически используемой гамма-камерой [Mandell, Mandell, Link, 1999]. После этого вскоре была продемонстрирована визуализация доставки гена *NIS* с помощью нереплицирующихся аденовирусов в ксенографты рака шейки матки и молочной железы [Boland и др., 2000]. Уже в 2003 году *hNIS* был успешно использован для мониторинга распространения реплицирующегося аденовируса, несущего терапевтические гены, при его введении в простату собак [Barton и др., 2003]. Важно отметить, что это работа была проведена не на грызунах, а на животных большого размера (собаки). Через год *NIS* был успешно использован для неинвазивного мониторинга внутриопухолевого распространения онколитического РНК-содержащего вируса кори (MV-Edm), работа была проведена на ксенографтах миеломы [Dingli и др., 2004]. Перечисленные работы заложили основу для последующего взрывного роста количества работ, в которых *NIS* использовался в качестве репортерного гена. В целом можно выделить три направления исследований, в которых *NIS* используется в качестве репортерного гена: генная терапия (опосредованная как вирусными так и невирусными системами доставки), терапия онколитическими вирусами и клеточная терапия (в данном случае *NIS* используется для отслеживания судьбы введенных в организм клеток, при этом клетки перед введением модифицирует экспрессионной кассетой с *NIS*). Более детальную информацию по использованию этого репортерного гена можно найти в обзоре [R. Penheiter, J. Russell, K. Carlson, 2012]. Здесь же мы приведем некоторые особенности этого репортера.

Данный репортер оказался очень полезным инструментом. В отличие от рецепторных радионуклидных систем, которые связывают меченные лиганды в соотношении 1:1, *NIS*, будучи активным транспортером, обеспечивает накопление радиомеченного субстрата в клетках и концентрирование сигнала. Такая особенность позволяет обнаруживать даже слабую экспрессию трансгена, которую обычно сложно детектировать. Кроме того, некоторые радиосубстраты *NIS* одобрены для применения в клинической практике для

визуализации как с помощью ПЭТ (^{124}I) так и с помощью ОФЭКТ (^{123}I , ^{131}I , $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$). Активность симпортера оказывает незначительное влияние на физиологию клеток. Этот репортер также подходит для отслеживания доставки связанных с ним других генов и позволяет проводить оценку размеров целевой опухоли или ткани [Portulano, Paroder-Belenitsky, Carrasco, 2014].

Важно отметить, что применимость натрий-йодидного симпортера в качестве репортерного гена была доказана и в клинических испытаниях. В одном случае исследовался реплицирующийся аденовирус, несущий два терапевтических гена и ген *hNIS* [Barton и др., 2011]. Шести пациентам с локализованным раком простаты данный аденовирус был введен путем инъекции внутрь простаты. Через несколько дней после инъекции объем инфицированного аденовирусом органа и величину экспрессии гена *hNIS* удалось изучить путем визуализации распределения $^{99\text{m}}\text{Tc}^-$ методом ОФЭКТ. В другом случае исследовался онколитический РНК-содержащий вирус кори MV-NIS, разработанный для терапии множественной миеломы и армированный геном *hNIS* [Russell и др., 2014]. При системном введении этого вируса двум пациентам с множественной миеломой, вирус инфицировал опухолевые клетки, что было подтверждено с помощью визуализации распределения ^{123}I методом ОФЭКТ. В настоящее время, согласно portalу www.cancer.gov, зарегистрировано 4 клинических испытания препарата MV-NIS, проводящихся на пациентах с множественной миеломой (II фаза), раком яичников (I/II фаза), злокачественной плевральной мезотелиомой (I фаза) и плоскоклеточным раком головы и шеи (I фаза).

В подавляющем большинстве опубликованных работ *in vivo* доставка гена *NIS* в целевую ткань (как правило, в опухоль) осуществлялась с использованием вирусных систем доставки. Альтернативой вирусным системам являются невирусные синтетические системы доставки, которые активно развиваются последние два десятилетия. Среди преимуществ таких систем можно выделить биологическую безопасность, низкую иммуногенность и более низкую стоимость продукции, в тоже время, невирусные системы, как правило, проигрывают в эффективности трансфекции вирусным векторам [Nguyen, Szoka, 2012]. Однако вопрос применимости *NIS* для мониторинга генетической доставки с помощью невирусных систем в условиях *in vivo* пока слабо изучен. Существует всего несколько работ, касающихся этой проблемы.

В 2009 году было опубликовано исследование, в котором для доставки плазмиды с геном *NIS* (CMV-NIS-pcDNA3) в клетки нейробластомы использовался имеющий повышенное сродство к опухоли синтетический полимерный вектор G2-HD-OEI, полученный на основе дендримеров из пропиленмина, армированных олигоэтиленмином [Klutz и др., 2009]. После внутривенного введения полиплексов G2-HD-OEI/ CMV-NIS-

pcDNA3 мышам с подкожными опухолями нейробластомы Neuro2A и последующего введения ^{123}I методами сцинтиграфии и *ex vivo* определения гамма-радиоактивности было показано, что опухоли приобретали способность накапливать от 8 до 13% введённой дозы ^{123}I на грамм ткани. При этом нетрансфицированные опухоли и другие органы (такие как печень, почки, легкие и селезенка) не накапливали значимых количеств радиодоида. В 2011 году эта же группа исследователей сообщила об использовании другой невирусной системы на основе линейного полиэтиленимина (LPEI), полиэтиленгликоля (PEG) и пептида GE11, селективно связывающегося с рецептором EGFR, для системной доставки *NIS* в опухоли печеночноклеточной карциномы HuH7 [Klutz и др., 2011b]. В этом случае внутривенное введение полиплексов LPEI-PEG-GE11/*NIS* приводило к тому, что ксенографты HuH7 приобретали способность накапливать 6,5-9% введённой дозы ^{123}I на грамм ткани согласно сцинтиграфии и *ex vivo* gamma counting. При этом предварительное введение цетуксимаба, представляющего собой антитела против EGFR, значительно снижало поглощение радиодоида трансфицированной опухолью, что, по словам авторов, подтверждало EGFR-специфичную доставку гена в опухоль. В конце 2011 года эта группа опубликовала еще одну работу, где проводилось сравнение эффективности доставки гена *NIS* в опухоли печеночноклеточной карциномы с помощью описанных систем LPEI-PEG-GE11/*NIS* и G2-HD-OEI/*NIS* [Klutz и др., 2011a]. При внутривенном введении мышам полиплексы G2-HD-OEI/*NIS* обеспечивали поглощение опухолью 6-11% введённой дозы ^{123}I на грамм ткани согласно сцинтиграфии и ОФЭКТ, тогда как полиплексы LPEI-PEG-GE11/*NIS* обеспечивали поглощение 6,5-9% введённой дозы. При этом эффективный период полувыведения изотопа из опухоли составил 10 часов при введении G2-HD-OEI/*NIS* и 6 часов при введении LPEI-PEG-GE11/*NIS*. Таким образом, использование *NIS* в качестве репортера позволило не только отслеживать эффективность невирусной доставки гена в опухоль, но и провести сравнение разных систем доставки.

1.4.7. Использование *NIS* в качестве терапевтического гена

Как отмечалось ранее, радиодтерапия заболеваний щитовидной железы – один из лучших примеров безопасности и высокой эффективности терапии радиоизотопами. Так как *NIS* играет ключевую роль в селективном накоплении радиоизотопов в тиреоидных тканях, неудивительно, что вскоре после клонирования гена *NIS* начались попытки его использования в качестве терапевтического гена. Идея такого применения заключается в переносе функционального гена *NIS* в патологические ткани, где не наблюдается его эндогенная экспрессия, после чего в организм вводят бета-излучающий изотоп ^{131}I (который

используется для радиойодтерапии). Полагают, что радиопрепарат будет накапливаться в клетках, трансфицированных *NIS*, и приводить к радиотерапии целевой ткани [Chung, 2002]. Такой подход в принципе может быть применим для тканей как тиреоидного так и нетиреоидного происхождения.

Первое сообщение о таком использовании гена *NIS* было сделано Шимурой в уже упомянутой работе [Shimura и др., 1997]. Линия клеток Тс-rNIS, поглощение йодида которой было восстановлено с помощью стабильной трансфекции геном *NIS*, при прививания крысам формировала опухоль, способную аккумулировать значительные количества как диагностического ^{125}I так и терапевтического ^{131}I по сравнению с опухолью из нетрансфицированных клеток FRTL-Тс. Однако введение ^{131}I не повлияло на рост опухолей обеих линий клеток. Авторы связали это явление с коротким периодом полувыведения радиойодида из опухолей (всего 6 часов), из-за чего доза облучения опухолевых клеток была недостаточна для терапевтического эффекта.

Впоследствии потенциал генной терапии с помощью *NIS* был широко исследован в различных преклинических испытаниях. Успех такого подхода был показан в экспериментах *in vitro* и *in vivo* для терапии многих видов рака. Однако наиболее интересные результаты были получены для терапии рака печени, простаты и множественной миеломы [Portulano, Paroder-Belenitsky, Carrasco, 2014]. Так, данный подход был подтвержден на модели агрессивной гепатокарциномы, индуцированной диэтилнитрозамином у иммунокомпетентных крыс [Faivre и др., 2004]. Инъекция в портальную вену животным аденовирусов Ad-CMV-NIS, несущих *NIS* под контролем сильного промотора *pCMV*, и последующая радиойодтерапия ^{131}I приводили к сильному торможению роста опухоли и увеличению продолжительности жизни. Интересно, что авторы наблюдали лишь краткосрочный захват радиойодида в условиях *in vitro*, при этом в экспериментах на животных радиоизотоп удерживался в опухоли более 11 дней после инъекции. Исследователи связали такое явление с рециркуляцией вытекающего из клеток радиойодида за счет циркуляции портального кровотока в печени.

Несмотря на то, что будущее такого подхода кажется многообещающим в клинических приложениях, остаются нерешенными некоторые вопросы. Функциональная доставка *NIS* требует как экспрессии гена, так и адекватной посттрансляционной модификации и транспорта белка к цитоплазматической мембране целевых клеток опухоли. При этом известно, что опухолевые клетки часто теряют такие функции дифференцированных клеток [Filetti и др., 1999]. Если ген *NIS* функционально экспрессируется на достаточном уровне, необходимо доказывать эффективность его йодид-концентрирующей активности. Поглощение, вытекание и кинетика насыщения йодида в

клетках опухоли, особенно в клетках нетиреоидного происхождения, вполне вероятно отличается от соответствующих параметров нормальных тиреоидных клеток. Кроме того, нетиреоидные ткани не могут эффективно накапливать и органифицировать йодид, как это происходит в тканях щитовидной железы, что является основной причиной короткого периода полувыведения йодида. Это приводит к тому, что в опухолевых клетках трудно достичь уровня накопления и удержания радиоактивного йодида достаточно адекватного для достижения существенной дозы облучения, необходимой для терапевтического эффекта. Также, существуют проблемы, связанные с различной чувствительностью опухолей к радиоактивному облучению. Наконец, существует общая для большинства вариантов генотерапии рака проблема доставки терапевтических генов в ткани опухоли.

Один из подходов, позволяющий увеличить дозу облучения NIS-экспрессирующих клеток, заключается в использовании радиоактивных субстратов NIS, обладающих более коротким периодом полураспада и большей энергией излучения по сравнению с ^{131}I (период полураспада – 8 дней). На эту роль хорошо подходит перренат $^{188}\text{ReO}_4^-$, имеющий период полураспада 16 часов и испускающий бета-частицы с более высокой энергией [Ahn, 2012]. Действительно, в одной из работ [Willhauck и др., 2007] было показано, что в организме мышей опухоли, трансфицированные NIS, при введении перрената накапливали в 4,7 раз большую поглощенную дозу облучения по сравнению с ^{131}I . При этом объем опухолей большого размера уменьшался сильнее при введении перрената чем при введении радиойодида, тогда как небольшие опухоли одинаково реагировали на терапию изотопами, что авторы объясняют большей энергией излучения ^{188}Re . Другим примером является использование для радиотерапии астатида $^{211}\text{At}^-$, который также является субстратом NIS [Petrich и др., 2002]. Этот альфа-излучатель имеет короткий период полураспада (7,2 часа), кроме того он отличается высокой цитотоксичностью в силу большого значения линейной передачи энергии испускаемых альфа-частиц. Высокая эффективность такого подхода была подтверждена на мышинной модели папиллярной тиреоидной карциномы, трансфицированной геном NIS [Petrich и др., 2006].

Другой подход заключается в воссоздании системы органификации йодида в трансфицированных клетках. В нормальной ткани щитовидной железы процесс органификации йодида и включение его в состав тиреоидных гормонов приводит к его длительному удержанию в ткани. Ген *TPO* отвечает за эту функцию в клетках щитовидной железы, фермент TPO обеспечивает окисление йодида и включения его в тирозиновые остатки тиреоглобулина, что приводит к накоплению йода в фолликулах щитовидной железы, см. Рисунок 1. Было предложено, что одним из способов преодолеть быстрое вытекание радиойодида из клеток опухоли, трансфицированных NIS, может стать перенос

гена *TPO* в опухоль и индукция им органификации йодида, захватываемого NIS. В 2001 году было продемонстрировано [Huang и др., 2001], что котрансфекция клеток немелкоклеточного рака легких плазмидными векторами, несущими гены *TPO* и *NIS*, в условиях *in vitro* приводит к увеличению поглощения радиойодида и его удержанию, а также к усилению апоптоза опухолевых клеток по сравнению с трансфекцией только *NIS*. Также для котрансфицированных клеток наблюдалось значительное увеличение содержания йодированных клеточных белков. В работе 2002 года [Boland и др., 2002] было показано, что коинфекция клеток SiHa (рак шейки матки) аденовирусами с генами *NIS* и *TPO* приводила к образованию активной пероксидазы, наблюдалось значимое увеличение органификации йодида при добавлении пероксида водорода, однако увеличение времени удержания радиойодида не наблюдалось. Подобные результаты наблюдались при коинфекции клеток глиомы аденовирусами с *NIS* и *TPO* по сравнению с только *NIS*: обнаруживалось некоторое увеличение поглощения радиойодида, но время его удержания оставалось низким (период полувыведения не превышал 10 минут), смертность этих двух групп клеток при обработке ^{131}I была сравнима [Li и др., 2011; Tan, Li, Wang, 2011]. В другой работе было показано, что органификация радиоiodида в клетках, экспрессирующих *TPO*, действительно происходит, но при этом не зависит от экспрессии *NIS*, коэкспрессия *NIS* в клетках с *TPO* не приводила к увеличению уровня органификации иодида [Wenzel и др., 2003]. Таким образом, использование *TPO* по-видимому может несколько увеличивать захват радиойодида клетками из среды, но не приводит к увеличению удержания радиойодида, захваченного NIS-продуцирующими клетками, а следовательно и к увеличению чувствительности клеток к обработке ^{131}I .

Впрочем, отсутствие синергизма между экзогенными *TPO* и *NIS* легко объяснимо, с точки зрения механизма органификации йодида в щитовидной железе (Рисунок 1). Органификация происходит не в отдельных тиреоидных клетках, а в надклеточных образованиях – тиреоидных фолликулах. При этом исходно йодид переносится в цитоплазму тироцитов с помощью *NIS*, но после он транспортируется в полость фолликула, где происходит его внеклеточное окисление и включение в остатки тирозина с помощью *TPO*. Также в этом процессе важную роль играет второй субстрат *TPO* – пероксид водорода, который продуцируется третьим белком *DUOX2*. Очевидно, что простой экспрессии *TPO* и *NIS* в опухолевых клетках, не формирующих такой сложной структуры, будет недостаточно для эффективной органификации йодида, захватываемого *NIS*.

1.4.8. Использование специфичных промоторов совместно с *NIS*

При использовании системы на основе *NIS* в экспериментах *in vivo* важно обеспечить высокий уровень экспрессии *NIS* в целевых клетках, при этом минимизировав его активность в других тканях модельного организма. В большинстве работ для достижения экзогенной экспрессии *NIS* в нетиреоидных опухолевых клетках используются конститутивно активные вирусные промоторы, такие как *pCMV* и *pSV40* [Riesco-Eizaguirre, Santisteban, 2006]. Данные промоторы, как правило, обеспечивают высокий уровень экспрессии *NIS*, что приводит к высокому уровню поглощения радиоизотопов целевыми клетками. Однако, использование такой системы в экспериментах *in vivo* в связи с отсутствием специфичности таких промоторов чревато нежелательной активностью *NIS* в неопухолевых тканях (при системной доставке гена *NIS*). Для предотвращения неспецифической активности трансгенов часто используют промоторы, специфически активные только в целевых клетках или тканях. В рамках такого подхода можно использовать тканеспецифические промоторы, высокоактивные в клетках определенного происхождения. Впервые такой подход был опробован в 1999 году, когда промотор простат-специфичного антигена (PSA) использовался для обеспечения экспрессии *NIS* в клетках андроген-чувствительной аденокарциномы простаты человека [Spitzweg и др., 1999]. Впоследствии системы на основе *NIS* под контролем тканеспецифических промоторов были успешно разработаны для опухолей простаты, яичников, печени, поджелудочной железы и др., достаточно подробный список примеров можно найти в обзоре [Hingorani и др., 2010]. Недостатки такого подхода заключаются в том, что экзогенная экспрессия *NIS* будет 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-*NIS*.

В последнее время активно разрабатываются генетические системы, основанные на *NIS* 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. Среди таких промоторов наиболее изученными являются промотор гена теломеразы человека (*hTERT*) и промотор гена *BIRC5* (Сурвивина). Недавно была показана эффективность систем на основе *phTERT-NIS* [Riesco-Eizaguirre и др., 2011] и *pBIRC5-NIS* [Huang и др., 2011] при доставке аденовирусами в опухолевые клетки различного происхождения. К сожалению, активность опухолеспецифичных промоторов, как правило, не очень высока и значительно варьирует в опухолевых клетках различного происхождения. Это может быть причиной низкой экспрессии *NIS* в некоторых опухолевых клетках, что в свою очередь приведет к низкому уровню поглощения радиоизотопа.

Информации о связи активности используемого промотора и активности *NIS* в клетках при трансфекции достаточно мало. Есть несколько работ, где проводилось сравнение вирусного промотора *pCMV* и тканеспецифичного или опухолеспецифичного промотора, опосредующих экспрессию *NIS*. При стабильной трансфекции клеток нейроэндокринной опухоли поджелудочной железы кассета *pCMV-NIS* обеспечивала в 2,5 раза больший захват радиойодида по сравнению с кассетой, где *NIS* находился под контролем тканеспецифичного промотора хромогранина А [Schirrer и др., 2003]. Инфекция клеток андроген-чувствительной аденокарциномы простаты человека (LNCaP) аденовирусами с тканеспецифичным промотором пробазина (ARR(2)PB) обеспечивала в 3,2 раза больший захват радиойодида по сравнению с контрольными аденовирусами (*pCMV*) [Kakinuma и др., 2003]. Инфекция клеток рака поджелудочной железы человека (Capan-2) аденовирусами с тканеспецифичным промотором муцина-1 (MUC-1) в условиях *in vitro* обеспечивала такой же захват радиойодида как и инфекция контрольными аденовирусами (с *pCMV*) [Dwyer и др., 2006a]. При внутривенном введении мышам с привитыми опухолями Capan-2 тканеспецифичные аденовирусы не изменяли распределение радиойодида в организме, тогда как контрольные аденовирусы в 50 раз увеличивали поглощение радиойодида печенью, что отражало неспецифическую инфекцию гепатоцитов. В другой работе, при инфекции клеток рака яичников (OVCAR-3) такими же аденовирусами в условиях *in vitro*, промотор *pCMV* обеспечивал почти в 2,5 раза больший захват радиойодида по сравнению с промотором *MUC-1* [Dwyer и др., 2006b]. При этом при внутриопухолевом введении мышам с привитыми опухолями OVCAR-3 контрольные аденовирусы обеспечивали значительно больший захват радиойодида и терапевтический эффект по сравнению с тканеспецифическими. В другой работе, при внутриопухолевом введении мышам с привитыми опухолями меланомы или рака кишечника и последующей терапии ^{131}I , аденовирусы с опухолеспецифичными промоторами *hTERT* и *hTR* обеспечивали значимо большее торможение роста опухоли по сравнению с контрольными аденовирусами (*pCMV*) [Riesco-Eizaguirre и др., 2011]. Прямое сравнение эффективности промоторов всех трех типов для обеспечения экспрессии *NIS* ранее не проводилось. В связи с этим остается актуальной задача определения связи активности используемого промотора с активностью НИС при экзогенной экспрессии в клетках разного происхождения.

2. Материалы и методы

2.1. Материалы

2.1.1. Культуры эукариотических клеток

В работе использовали следующие клеточные линии млекопитающих:

A375 (ATCC Number: CRL-1619) – злокачественная меланома человека;

M3 (меланома Клаудмана S91, клон M3, ATCC Number: CCL-53.1) – меланома мыши;

HT1080 (ATCC Number: CCL-121) – фибросаркома человека;

HEK293 (ATCC Number: CRL-1573) – клетки почки эмбриона человека;

HEK293T (ATCC Number: CRL-3216) – трансформированные клетки почки эмбриона человека, содержат Т-антиген вируса SV40.

Все клеточные линии культивировали при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂.

2.1.2. Бактериальные клетки

Для трансформации использовали компетентные клетки *E.coli* штамма DH5 α , приготовленные в лаборатории структуры и функции генов человека ИБХ РАН Н.И.Медведевой.

2.1.3. Животные

Взрослый самец серой крысы линии Wistar был любезно предоставлен вивариумом биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Три взрослые самки мышей линии DBA были получены из Питомника лабораторных животных Филиала ИБХ РАН в г. Пушкино.

Для экспериментов *in vivo* использовались 6-8 недельные самки мышей линии DBA/2, полученные из Питомника лабораторных животных «Столбовая» (Московская область).

2.1.4. Реактивы

В работе использовались следующие реактивы:

Агароза (LE 2, For nucleic acid gel electrophoresis) («Helicon», Россия); ампициллин («Биохимик», Россия); акриламид, персульфат аммония («Merck», ФРГ). Бис-акриламид, тетраэтилметилендиамин (ТЕМЕД), сухое обезжиренное молоко - Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk («Bio-Rad», США), β -меркаптоэтанол («Promega», США). Глицерин, трис (гидроксиметил) аминотан, HEPES («Sigma», США).

Дезоксинуклеозидтрифосфаты (dNTPs), этидиум бромид, ксиленицианол, бромфеноловый синий, додецил сульфат натрия (SDS), ЭДТА («Amersham Pharmacia Biotech», Англия). Твин-20 («FERAK», ФРГ). Хлорид натрия, хлорид калия, иодид натрия,

перхлорат натрия, ацетат натрия, хлорид магния, сульфат магния, этиловый спирт – марки хч или осч фирма («Реахим», Россия). Трипсин/ЭДТА 1X (0,05% трипсин/0,53мМ ЭДТА) («Gibco», США); пурамицин, липофектамин Lipo²⁰⁰⁰ («Invitrogen», США); тироксин Т4 («Berlin-Chemie», Германия). Иодид натрия Na¹²⁵I («Изотоп», Россия), иодид натрия Na¹²³I («Медрадиопрепарат», Россия).

2.1.5. Ферменты

Смесь ДНК-полимераз Encyclo, Screen Mix на основе ДНК-полимеразы *Thermus aquaticus* («Евроген», Россия), ДНК-полимераза *Pyrococcus furiosus* («Fermentas», Литва);

Эндонуклеазы рестрикции Bsu15 I (ClaI), KpnI, HindIII, XbaI, XhoI («Fermentas», Литва), EcoRI («NEB», США);

ДНК-лигаза фага Т4, полинуклеотид киназа фага Т4, фрагмент Кленова (ДНК-полимераза I, большой фрагмент) («Fermentas», Литва);

РНК-зависимая ДНК-полимераза (обратная транскриптаза) PowerScript («Clontech», США).

2.1.6. Антитела

Мышинные моноклональные антитела к GAPDH (SC-47724) - «Santa Cruz Biotechnology» (США).

Мышинные моноклональные антитела к FLAG-эпистоу (F1804) – «Sigma-Aldrich» (США).

Овечьи моноклональные антитела к мышинным IgG (SC-2302), конъюгированные с пероксидазой хрена - «Santa Cruz Biotechnology» (США).

2.1.7. Буферные растворы

Ниже представлены буферные растворы, использовавшиеся в работе, за исключением буферов, необходимых для различных ферментных реакций и поставляемых в комплекте с соответствующими ферментами.

Буфер для переноса TS: 25 мМ Трис (pH 8.3), 192 мМ глицин, 20% метанол;

Буфер для электрофореза по Лэммли (TGB (10^x)): 250мМ Трис, 2,5 М глицин, 1% SDS;

Буфер для нанесения при электрофорезе в агарозном геле: 10% бромфеноловый синий, 10 % ксиленцианол, 50 % глицерин;

Буфер для нанесения при денатурирующем электрофорезе белков в ПААГ: 1X Tris-Glycine SDS Sample Buffer Novex («Invitrogen», США) с 2% β-меркаптоэтанолом;

PBS буфер: 137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ фосфатный буфер (pH 7,3-7,5);

Буфер ТАЕ: 0,04 М Трис-ацетат (pH 7.6), 1 мМ ЭДТА;

Модифицированный раствор Хэнкса: 0,44 мМ KH_2PO_4 , 0,4 мМ Na_2HPO_4 , 137 мМ NaCl , 5,4 мМ KCl , 1,3 мМ CaCl_2 , 0,5 мМ MgCl_2 , 0,4 мМ MgSO_4 , 5,55 мМ глюкозы, 10 мМ HEPES, pH 7,3;

Лизирующий буфер для выделения РНК из тканей: 4М гуанидин изотиоционат, 0,5% саркозилат натрия, 100 мМ β -меркаптоэтанол, 25 мМ ацетат натрия, pH 7,0.

2.1.8. Микробиологические среды

Среда LB: 10 г триптон, 5 г дрожжевой экстракт, 5 г NaCl на 1 литр воды.

Среда LB с ампициллином: к среде LB добавляли раствор ампициллина до концентрации 100 мг/л.

Агаризованная среда LB с ампициллином: 1,5% раствор агара в среде LB с ампициллином.

Для культивирования эукариотических клеток - среда DMEM/F12 (1:1), содержащая 10% эмбриональной телячьей сыворотки, опционально содержала смесь антибиотиков 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 0,25 мкг/мл амфотерицина («Invitrogen», США).

2.1.9. Наборы реактивов

Wizard Plus Minipreps DNA Purification System - «Promega» (США).

Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System - «Promega» (США).

Endo Free Plasmid Maxi Kit - «QIAGEN» (Германия).

Immun-Star HRP Peroxide Buffer, Immun-Star HRP Luminol/Enhancer - «Bio-Rad» (США).

Dual-Luciferase Reporter Assay System - «Promega» (США).

CellTiter96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay - «Promega» (США).

TMB One Solution - «Promega» (США).

2.1.10. Маркеры

Маркеры длин ДНК 100 bp + 1.5 Kb и 1 Kb - «Сибэнзим» (Россия).

Маркер молекулярных масс белков Biotinylated Protein Ladder Detection Pack #7727 - «Cell Signaling Technology» (США).

2.1.11. Олигонуклеотиды

Олигонуклеотидные праймеры были синтезированы компанией «Евроген» (Россия). Нуклеотидные последовательности олигонуклеотидов приведены в Таблице 2. Дизайн праймеров проводили с использованием программы Gene Runner («Hastings Software, Inc»).

Таблица 2. Используемые в работе олигонуклеотиды.

Целевая последовательность	Название праймера	Нуклеотидная последовательность (5'-3')
rNIS	NIS-nest rev	GGCCCGAGGCCTGTGATTGG
	NIS-nest2 for	ATCCTCTCCTCACCGAGTCAC
	rNIS rev	CGGTACCCTCAGAGGTTGGTCTCCA
	rNIS for	CCACCATGGAGGGTGC GGAGGC
	NIS-seq1 for	GGTTGGACATCTGGGCATCG
	NIS-seq2 for	CGCTGCTTGTGTTGGACATT
	NIS-seq3 for	GAGCCACCAACGCTTCCAAC
	NIS-seq1 rev	GCAGATGATTCCTGTGGACA
	NIS-seq2 rev	TAGGCACAGGCCAGGAAGAG
	NIS-seq3 rev	CCATTCCAGAACTGGGGATC
	NIS-2A rev	AGAGAAGTTCGTGGCTCCGAA- CCGGTGAGGTTGGTCTCCACATCGT
	LPO	LPO-nest for
LPO-nest rev		AGGAAGCTGTGGGCAGCAGGTTC
LPO for		CCACGATGAAAGTGCTTCTGCATCTCCCAG
LPO-M rev		CTTATGCCAGATCTTCTTCGCTAAT- CAGTTTCTGCTCCTTCACTGAGGCCAGGGTG
LPO-MER		CTTACAGTTCATCATGTGC- CAGATCTTCTTCGCTAATCAG
LPO-M2		CTTATGCCAGATCTTCTTCGCTAATC
2A-LPO for		AGACGTGGAGGAGAATCCCGGGCCT- ATGAAAGTGCTTCTGCATCTC
2A-LPO rev		ATATCTAGATTACAGTTCATCATGTGCCAG
LPO-seq1 for		CCTTACCGGACCATCACTGG
LPO-seq2 for		GGATGCTAGCCTAGTGTATAGC
LPO-seq3 for		CTGTGTACCGCCTAGATGAGA
LPO-seq4 for		GATCCGAGATGGAGACAGGT
LPO-seq1 rev		CCAGTGATGGTCCGGTAAGG
LPO-seq2 rev		GCTATACACTAGGCTAGCATCC

	LPO-seq3 rev	TCTCATCTAGGCGGTACACAG
	LPO-seq4 rev	ACCTGTCTCCATCTCGGATC
P2A	2A for	AGCAGGAGACGTGGAGGAGAATCCCG
	2A rev	TGCTTCAGCAGAGAGAAGTTCGTGGCTCCG
Intron pCI	FCU for	CTAAGTAAGCTTTATTGCGGTAG
GAPDH	GAPDH for	TTAGCACCCCTGGCCAAGG
	GAPDH rev	CTTACTCCTTGGAGGCCATG

2.1.12. Плазмидные векторы

Использовались следующие коммерческие плазмидные векторы: pCI, pGL3-Basic, pGL3-PV, pRL-TK («Promega», США); pAL-TA («Евроген», Россия); pLVX-Puro, pVSV-G («Clontech», США); pFLAG-CMV.2 («Sigma-Aldrich», США).

2.1.13. Полиплексы

Блок-сополимер полиэтиленгликоля и полиэтиленimina, а также его вариант лигандированный пептидом MC1SP были синтезированы в лаборатории профессора А.С. Соболева, ИБГ РАН. Там же проводилась сборка полиплексов из данных блок-сополимеров и выделенных нами плазмид.

2.2. Методы

2.2.1. Стандартные процедуры

Электрофорез ДНК в агарозном геле, очистку ДНК путем экстракции с помощью фенола, фенола-хлороформа и переосаждения изопропанолом, спектрофотометрическое определение концентрации нуклеиновых кислот, трансформацию бактериальных клеток плазмидной ДНК, отбор клонов методом ПЦР с колонии проводили по стандартным протоколам [Sambrook, W Russell, 2001]. Согласно инструкциям производителей наборов реактивов проводили: препаративную ПЦР, расщепление ДНК эндонуклеазами рестрикции, фосфорилирование олигонуклеотидов и фрагментов ДНК с помощью полинуклеотид киназы фага T4, достройку «липких» концов ДНК с помощью фрагмента Кленова, выделение ДНК из агарозного геля, лигирование фрагментов ДНК в плазмидные вектора с помощью ДНК-лигазы фага T4, выделение и очистку плазмидной ДНК в аналитических целях (Wizard Plus Minipreps DNA Purification System - «Promega» (США)) и для экспериментов *in vivo* (Endo Free Plasmid Maxi Kit - «QIAGEN» (Германия)).

2.2.2. Секвенирование ДНК

К 300-350 нг плазмидной ДНК добавляли 3,2 пмоль праймера, после чего пробу высушивали при 60°C. Секвенирование проводилось в Центре Коллективного Пользования «Геном» Института Молекулярной Биологии им. Энгельгардта. Анализ хроматограмм проводился при помощи программ Chromas v 2.13 и Vector NTI.

2.2.3. Выделение РНК гуанидин изотиоционатным методом

Выделение проводили согласно методике [Chomczynski, Sacchi, 1987]. Все операции проводили на льду. Один шпатель растертого и хранящегося в жидком азоте порошка тканей (~ 50 мкг) помещали в охлажденную в жидком азоте пробирку, содержащую 370 мкл лизирующего буфера, после чего объем лизирующего буфера доводили до 740 мкл и быстро перемешивали на встряхивателе Vortex. Раствор пропускали 5-10 раз через шприц с иглой №№ 19-21, до тех пор, пока раствор не переставал быть вязким, и добавляли 1/10 объема 2 М ацетата натрия, рН 4,0 (75 мкл). Добавляли 0,8-1 объем кислого фенола (650-750 мкл) и 1/5 объема хлороформа (120-140 мкл), перемешивали на встряхивателе Vortex в течение мин. Смесь инкубировали 10-15 мин. на льду и центрифугировали (10 мин., 12 т. об/мин при +4°C). Отбирали водную (верхнюю) фазу в новую пробирку и добавляли к ней 600 мкл фенола и 80 мкл хлороформа, после чего повторно центрифугировали (5 мин., 12 т. об/мин при +4°C). Экстракцию фенол/хлороформом повторяли до исчезновения интерфазы (до 5 раз). Последний раз экстракцию проводили равными объемами фенола и хлороформа (по 340 мкл). К полученному супернатанту добавляли равный объем изопропанола и инкубировали при комнатной температуре 10 мин., после чего проводили центрифугирование (10 мин., 12 т. об/мин, +4°C). Осадок РНК промывали 70% раствором этанола, центрифугировали (5 мин., 12 т. об/мин, +4°C). Удаляли супернатант. Стадию промывки повторяли два раза.

Осадок РНК растворяли в воде и хранили при -70°C. Для длительного хранения к водному раствору РНК добавляли три объема этанола, перемешивали и хранили при -70°C.

После выделения и очистки РНК проводили спектрофотометрическое определение количества и качества полученной РНК (соотношение поглощения при 260/280 нм). Кроме того, качество полученной РНК исследовали путем электрофореза в агарозном геле, оценивая соотношение полос рибосомальных РНК.

2.2.4. Синтез одноцепочечной кДНК с помощью обратной транскрипции

Смешивали 1мкг РНК, 10 пикомоль антисенс-олигонуклеотида (или 200 нг смеси случайных гексануклеотидных праймеров), водой доводили объем до 10 мкл. Инкубировали смесь при 70°C в течение 3 мин., после чего охлаждали на льду.

Добавляли 4 мкл 5X буфера для построения первых цепей (Clontech), 2 мкл dNTPs (10 мМ каждого), 2 мкл DTT (20 мМ), 2 мкл обратной транскриптазы PowerScript (200 ед./мкл, Clontech).

Инкубировали при 42°C 60 минут (или при 20°C 10 минут, затем при 37°C 15 минут, затем при 42°C 60 минут – при использовании гексануклеотидных праймеров).

Останавливали реакцию прогреванием при 65°C в течение 10 мин. Водой доводили объем до 100 мкл, замораживали.

Далее дополнительно по стандартной методике проводили очистку фенолом, фенолом-хлороформом и переосаждение изопропанолом. Очищенный препарат кДНК растворяли в 100 мкл деионизированной воды, хранили при -20°C.

2.2.5. Полуколичественная оценка экспрессии генов методом ОТ-ПЦР

Для проведения данной оценки на первом этапе на матрице суммарной РНК, выделенной из целевых органов, проводили синтез и очистку одноцепочечной кДНК, как это описано выше. При этом в качестве затравки использовали смесь случайных гексануклеотидных праймеров. Также для получения препаратов кДНК из разных органов в реакцию вносили одинаковое количество соответствующей РНК.

На втором этапе проводили амплификацию целевых фрагментов ДНК методом ПЦР. В качестве матрицы использовали препарат одноцепочечной кДНК, в качестве затравок для синтеза – специфические пары праймеров, подобранные для изучаемых генов. Реакцию проводили с использованием смеси термостабильных ДНК-полимераз Encuslo («Евроген»), подходящей для «горячего старта» ПЦР.

Реакцию проводили в следующем режиме:

предварительный прогрев 94°C – 90 с (этот этап проводили только один раз, перед первым циклом амплификации);

денатурация 94°C – 30 с;

отжиг праймеров (температура специфична для каждой пары праймеров) –30 с;

построение цепей 72°C – 40 с.

Для ПЦР использовали следующую реакционную смесь (объем 50 мкл):

Компонент	Объем (мкл)	Итоговая концентрация
10-кратный буфер Encuslo	5	1-кратный
dNTPs (2,5 мМ каждого)	5	0,25 мМ
10 мМ праймер for	1	0,2 мМ
10 мМ праймер rev	1	0,2 мМ
Смесь полимераз Encuslo	1	1-кратная

(50-кратная)		
Матрица	2	~20 нг
Вода	30	

ПЦР проводили в автоматических амплификаторах с нагревающейся крышкой. После проведения 27 циклов ПЦР отбирали аликвоту раствора (5 мкл) и продолжали амплификацию, отбирая равные количества реакционной смеси (по 5 мкл) через каждые 3 цикла амплификации до 39 цикла. Аликвоты анализировали с помощью электрофореза в агарозном геле. Различия в содержании мРНК определяли по различиям в циклах, после проведения которых можно было визуализировать продукт.

Праймеры для ПЦР подбирали через интрон гена, чтобы можно было отличить продукты ПЦР, синтезированные на матрице кДНК, от синтезированных по матрице геномной ДНК.

2.2.6. Транзиентная трансфекция клеток в условиях *in vitro*

Приведен способ трансфекции в 6-луночных культуральных планшетах, для трансфекции клеток в другом формате метод масштабировали согласно рекомендациям производителя.

Для трансфекции клетки, выращенные в культуральных флаконах площадью 25см² до плотности около 90%, пересевались в шестилуночные планшеты в количестве 1/6-1/7 от общего объема суспензии клеток на лунку в среде DMEM/F12 (1:1) без антибиотиков, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Через 1-2 суток, когда клетки покрывали около 80% поверхности каждой лунки, проводили трансфекцию.

Трансфекцию клеток проводили в 6-луночных планшетах Липофектаминоном 2000 («Invitrogen», США) согласно рекомендациям производителя. Для трансфекции использовали 4 мкг плазмидной ДНК на одну лунку. Продолжительность инкубации с трансфицирующей смесью составляла от 2 до 4 часов. После трансфекции клетки культивировали как минимум 24 часа при 37°C в среде DMEM/F12 (1:1) без антибиотиков, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки.

2.2.7. Вестерн-блот анализ клеточных лизатов

Клетки трансфицировали в 6-луночных планшетах исследуемыми конструкциями с помощью липофектамина 2000 («Invitrogen») согласно рекомендациям производителя. Далее клетки в течение 48 ч культивировали в среде DMEM/F12 (1:1) без антибиотиков, содержащей 10% ЭТС, после чего среду удаляли, клетки открепляли от субстрата, считали и осаждали путем центрифугирования. Для получения лизатов клеточные осадки растворяли в

деионизованной воде, а затем добавляли 2X Sample буфер (Trise-Glycine SDS Sample Buffer Novex («Invitrogen», США) с 4% β -меркаптоэтанолом) из расчёта конечной концентрации клеток 1000 клеток на мкл, инкубировали при 95°C 5 минут, охлаждали на льду, после чего центрифугировали при 14000 об/мин в течение 5 мин для осаждения клеточного дебриса.

Лизаты подвергали денатурирующему электрофорезу белков в ПААГ по Лэммли в присутствии додецилсульфата натрия в трис-глициновой буферной системе. При электрофорезе использовали 4% концентрирующий и 12% разделяющий гели. Электрофорез проводили при напряжении 40 В (на стадии концентрирования) и напряжении 80 В (на стадии разделения) в течение 3 часов. В качестве маркера молекулярных масс использовали набор маркерных белков для электрофореза Biotinylated Protein Ladder Detection Pack #7727 - «Cell Signaling Technology» (США). Источником тока служил прибор Эльф-4 («ДНК-технология», Россия).

Белки с FLAG-эпитопом, а также белок GAPDH в образцах детектировали методом вестерн-блот анализа. Для этого проводили полусухой перенос фракционированных белков. Сначала вырезали по размеру мембрану PVDF Immobilone-P ("Millipore", Англия) и листы Whatman 3MM. Мембрану инкубировали в метаноле 1 минуту, отмывали водой в течение 3-х мин. и помещали в буфер для переноса. Гель помещали на мембрану и переносили в прибор для полусухого переноса TRANS-BLOT SD SEMI-DRY TRANSFER CELL («Bio-Rad», США). Далее проводили блоттинг при напряжении 15 В в течение 1 часа.

После переноса поверхность мембраны блокировали раствором 5% обезжиренного молока в PBS-T буфере (PBS, содержащий 0,1% Твин 20) в течение часа при комнатной температуре. Затем в течение ночи мембрану инкубировали в растворе 5% обезжиренного молока в PBS-T буфере, содержащем первичные антитела к вышеперечисленным белкам. На следующий день мембрану отмывали буфером PBS-T четыре раза по десять минут, инкубировали в течение часа при комнатной температуре в растворе 5% обезжиренного молока в PBS-T буфере, содержащем конъюгированные с пероксидазой хрена вторичные антитела, и снова отмывали буфером PBS-T. Мембрану проявляли в растворе, содержащем перекись водорода и люминол (система реагентов Immun-Star HRP Chemiluminescent ("Bio-Rad Laboratories", США)). Люминесценцию регистрировали с помощью прибора Bio-Rad VersaDoc MP4000, данные обрабатывали, используя компьютерную программу Quantity One.

2.2.8. Определение промоторной активности методом двойной люциферазной детекции

Клетки трансфицировали в 24-луночных планшетах с помощью липофектамина 2000 («Invitrogen») согласно рекомендациям производителя. Для трансфекции клеток одной лунки

использовали 0.88 мкг плазмидной ДНК, содержащей репортерную плазмиду со вставкой гена люциферазы светлячка, и нормировочную плазмиду pRL-ТК (“Promega”) в соотношении 10:1. Далее клетки в течение 48 ч культивировали в среде DMEM/F12 (1:1) без антибиотиков, содержащей 10% ЭТС, среду удаляли, клетки лизировали в буфере PLB и измеряли активность люцифераз светлячка и *Renilla reniformis* в клеточных экстрактах с помощью набора реактивов Dual-Luciferase Reporter Assay System (“Promega”) на люминометре GENios Pro (“Tecan”, Швейцария). В параллельных экспериментах клетки трансфицировали беспромоторной плазмидой pGL3-BV и плазмидой pGL3-PV (положительный контроль), содержащей ген люциферазы светлячка под контролем раннего промотора вируса SV40.

Плазмиду pRL-ТК, которая обеспечивала конститутивную экспрессию люциферазы *R. reniformis*, использовали в качестве внутреннего контроля для снижения погрешности, связанной с различиями в эффективности трансфекций в серии независимых опытов. Значения активности люциферазы светлячка нормировали по активности люциферазы *R. reniformis*. Проводили не менее трех независимых трансфекций каждой экспериментальной конструкцией.

2.2.9. Измерение поглощения ^{125}I клетками в условиях *in vitro* (RIUA)

Исследуемые клетки (стабильно трансфицированные либо через 2-3 суток после транзientной трансфекции) открепляли от субстрата, считали и рассеивали по 250000 клеток на лунку в 24-луночный планшет. Клетки затем культивировали в течение 24 ч в среде DMEM/F12 (1:1), содержащей 10% ЭТС, 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 0.25 мкг/мл амфотерицина (“Invitrogen”), после чего измеряли поглощение радиойодида.

Поглощение ^{125}I *in vitro* измеряли согласно ранее опубликованной методике [Weiss, Philp, Grollman, 1984]. Для этого культуральную среду отсасывали стерильной пипеткой, клетки однократно промывали модифицированным буфером HBSS, содержащим 10 мМ HEPES. Поглощение йодида инициировали, добавляя 0.5 мл модифицированного буфера HBSS, содержащего 10 мМ HEPES, 10 мкМ йодид натрия и 0.2 мкКи/мл Na^{125}I (0.1 мкКи на лунку). Для изучения ингибирования НИС перхлоратом натрия в отдельные лунки к трансфицированным клеткам добавляли аналогичный радиоактивный раствор, содержащий дополнительно 50 мкМ NaClO_4 , дальнейшие манипуляции проводили одинаково. Клетки инкубировали с радиоактивным изотопом в течение 1 ч при $+37^\circ\text{C}$ во влажной камере, после чего реакцию быстро останавливали, пипеткой удаляя радиоактивный раствор, а затем однократно промывали клетки 0.8 мл холодного фосфатно-солевого буфера (PBS). Затем клетки лизировали в 0.5 мл 0.3 М NaOH при $+4^\circ\text{C}$ в течение 20 мин, после чего измеряли

активность ^{125}I в клеточных лизатах с помощью автоматического гамма-счетчика 1470 Wallac Wizard (“PerkinElmer”).

Для нормализации образцов по количеству клеток, в начале эксперимента исследуемые клетки рассеивали также в 96-луночный планшет (по 50000 клеток на лунку), после чего культивировали их в течение 24 ч в среде DMEM/F12 (1:1), содержащей 10% ЭТС, 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 0.25 мкг/мл амфотерицина (“Invitrogen”). После этого оценивали жизнеспособность трансфицированных клеток на момент проведения эксперимента (RIUA) с помощью CellTiter96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (“Promega”) согласно протоколу производителя. Значения радиоактивности ^{125}I в лизатах клеток нормировали по числу жизнеспособных клеток. Для каждой генетической конструкции или стабильно трансфицированной линии проводили не менее трех независимых экспериментов, для которых рассчитывали среднее поглощение радиойодида.

2.2.10. Измерение пероксидазной активности в экстрактах клеток и кондиционированных средах

Перед проведением эксперимента транзитивно трансфицированные клетки культивировали в течение 48 часов в среде DMEM/F12 (1:1), содержащей 10% ЭТС, 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 0.25 мкг/мл амфотерицина (“Invitrogen”). После этого кондиционированные среды собирали, очищали от остатков клеток путем центрифугирования и хранили при -70C . Клетки открепляли от субстрата, промывали PBS, считали и замораживали при -70C .

Далее пробы размораживали и проводили анализ пероксидазной активности в них с помощью оценки окисления хромогенного субстрата ТМВ. Для этого в лунки прозрачного 96-луночного планшета вносили по 200 мкл раствора ТМВ One Solution (Promega), затем добавляли по 10 мкл размороженного экстракта клеток, соответствующего 10000 клеток в суспензии PBS, либо по 10 мкл размороженной кондиционированной среды. Инкубировали 1 час при комнатной температуре в темноте. Далее добавляли по 50 мкл 1 М H_2SO_4 , после чего измеряли поглощение при 450 нм и 540 нм на планшетном ридере. Относительную пероксидазную активность образцов рассчитывали как поглощение света при 450 нм за вычетом поглощения при 540 нм, нормированное на соответствующую разницу для лунок, в которых субстрат инкубировался с чистым буфером PBS. Для кондиционированных сред данное значение дополнительно нормировали на общее количество трансфицированных клеток, собранных из лунки культурального планшета при сборе проб.

2.2.11. Получение стабильно трансфицированных клеток с помощью лентивирусного вектора pLVX-Puro

Получение лентивирусных частиц

Путем липофекции клетки HEK293T котрансфицировали в 25 см² культуральном матрасе 3 мкг целевой плазмиды, содержащей экспрессионную кассету в составе лентивирусного вектора pLVX-Puro (“Clontech”, США), 3 мкг плазмиды pVSV-G (“Clontech”) и 3 мкг плазмиды pCMV-dR8.91. Плазида pVSV-G использовалась для экспрессии белка вирусной оболочки, плазида pCMV-dR8.91 использовалась в качестве пакующей системы. Далее клетки в течение 48 ч культивировали в среде DMEM/F12 (1:1) без антибиотиков, содержащей 10% ЭТС. После этого собирали кондиционированную культуральную среду, проводили ее очистку путем центрифугирования при 1000 об/мин в течение 5 минут и пропускания получившегося супернатанта через 0,45 мкм фильтр. Содержащий лентивирусные частицы фильтрат распределяли по 1 мл в криопробирки и хранили при -70°C.

Инфекция клеток М3 лентивирусными частицами, отбор стабильно трансфицированных клеток

Клетки М3 рассевали в 25 см² культуральный матрас в среде DMEM/F12 (1:1) без антибиотиков, содержащей 10% ЭТС, инкубировали в CO₂-инкубаторе до достижения 60-90% плотности. После этого заменяли среду на 2 мл свежей среды, содержащей полибрен в концентрации 8 мкг/мл и 1 мл фильтрата с лентивирусными частицами. Инкубировали клетки в среде с лентивирусными частицами в течение 24 часов в CO₂-инкубаторе. После этого заменяли среду на 5 мл свежей среды без лентивирусных частиц и инкубировали клетки в течение 24 часов в CO₂-инкубаторе. Далее удаляли среду, клетки открепляли от субстрата и пересевали половину клеточной суспензии в 75 см² культуральный матрас в среду DMEM/F12 (1:1), содержащую 10% ЭТС и пурамицин в концентрации 0,4 мкг/мл. Ранее было определено, что 0,4 мкг/мл является минимальной концентрацией пурамицина в среде, приводящей к гибели всех неинфицированных клеток М3. Клетки инкубировали в среде с пурамицином в CO₂-инкубаторе в течение нескольких суток, заменяя среду на новую каждые 72 часа. По достижении 100% плотности клетки открепляли от субстрата, 1/10 часть клеточной суспензии пересевали в 25-см² культуральный матрас в такую же культуральную среду, содержащую пурамицин в концентрации 0,4 мкг/мл. После этого селекцию проводили аналогичным образом, при этом клетки пересевались в новые 25-см² культуральные матрасы еще два раза.

2.2.12. Выявление распределения изотопа ^{123}I и его накопления в опухолях с помощью однофотонной эмиссионной компьютерной томографии

Данные эксперименты были выполнены совместно с лабораторией проф. А.С. Соболева, ИБГ РАН.

Для оценки эффективности доставки гена *NIS* с помощью полиплексов в опухоль в условиях *in vivo* были использованы мыши линии DBA/2 с привитыми опухолями линии мышинной меланомы М3, либо с опухолями этой же линии клеток с постоянной экспрессией гена *NIS* (М3-3ЕТ-рMIA-rNIS). Клетки данных линий были инокулированы 6-8-недельным мышам линии DBA/2 массой 16-18 г за 10-14 дней до начала эксперимента в количестве 2 млн подкожно в 50 мкл бессывороточной среды DMEM/F12, чтобы к моменту начала съемки размер опухоли составлял около 200 мм³. За 10 дней до начала эксперимента в поилку мышам добавляли гормон тироксин Т4 («Berlin-Chemie», Германия) в концентрации 5 мг/л для ингибирования экспрессии *NIS* в щитовидной железе.

За 24 часа до проведения однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ) мышам с опухолями М3 внутривенно вводили полиплексы (в количестве 80 мкг по ДНК), содержащие в своём составе плазмиду с геном *rNIS*. Контрольным группам вводили либо PBS, либо полиплексы с беспромоторной плазмидой рGL3-BV (Promega, США). Полиплексы с плазмидой, содержащей ген *rNIS*, в отдельных экспериментах вводили также за 12 и 48 часов до проведения ОФЭКТ-томографии. Для оценки ингибиторного действия перхлората последний вводили внутрибрюшинно за полчаса до начала съемки в количестве 2 мг в 200 мкл PBS.

Перед началом сканирования мышей с опухолями усыпляли в камере с 5% содержанием изофлурана («Abbott Laboratories Ltd», Великобритания) до полного обездвиживания, после чего вводили в хвостовую вену 18,5 МБк (0,5 мКи) разведенного в растворе Хэнкса (ПанЭко, Россия) препарата ^{123}I (Медрадиопрепарат, Россия) в объеме 200-400 мкл. ОФЭКТ и рентгеновскую компьютерную томографию проводили на приборе USPECT/CT II («MiLabs», Нидерланды), позволяющим проводить съемку распределения изотопа в организме мелких животных с высоким разрешением (до 0,35 мм). Для экспериментов по оценке накопления ^{123}I в трансфицированных опухолях и других органах использовали коллиматор с разрешающей способностью 1 мм. В качестве параметров сканирования выбирали количество временных рамок 12-17, количество позиций – 66-72. В качестве параметров для рентгеновской компьютерной томографии (КТ) был выбран вариант полного детального сканирования с 2 рамками. После реконструкции полученных изображений проводили их количественный анализ с помощью программы PMOD 3.4 (PMOD Technologies Ltd., Швейцария).

3. Результаты и обсуждение

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

Данная работа проводилась в несколько этапов.

3.1.1. Поиск биологического источника для получения кДНК гена *NIS*, анализ содержания транскриптов гена *NIS* в разных тканях

Анализ литературы показал, что среди последовательностей *NIS*, полученных из различных организмов, *NIS* серой крысы (*Rattus norvegicus*) наиболее соответствует поставленным задачам. Экспериментальное сравнение [Heltemes и др., 2003] показало, что при экзогенной экспрессии 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 человеческого и мышинного происхождения. В связи с этим в качестве источника кДНК *NIS* была выбрана серая крыса (*R. norvegicus*).

Ранее было показано, что экспрессия *NIS* значительно варьирует в различных тканях млекопитающих, при этом наибольшее содержание мРНК *rNIS* обнаруживалось в тканях щитовидной железы и желудка. Эти органы были выбраны для создания препаратов кДНК, содержащих кДНК *rNIS*. Из щитовидной железы и желудка взрослого самца серой крысы гуанидин изотиоционатным методом были получены препараты суммарной РНК. Также для сравнения был получен препарат суммарной РНК печени того же экземпляра (согласно известным данным в печени экспрессия *rNIS* не обнаруживается). Далее методом ОТ-ПЦР была проведена оценка содержания транскрипта *rNIS* в трех полученных препаратах РНК. Синтез первых цепей кДНК на матрице суммарной РНК проводили, используя в качестве затравки случайный гексануклеотидный праймер. В реакции ПЦР амплификацию проводили с праймерами NIS-seq3 for/NIS-nest rev (Таблица 2), специфическими к 3'-концевому участку рамки считывания *rNIS*. Различия в уровне экспрессии определяли полуколичественно по разнице в циклах, на которых можно было визуализировать продукт при электрофорезе в агарозном геле. Считали, что транскрипция гена отсутствует, если продукт реакции не детектировался после проведения 39 циклов ПЦР. Количество первых цепей кДНК, используемое в каждой реакции, выравнивали по уровню транскрипции гена *Gapdh*, определенному с помощью такой же ПЦР (праймеры GAPDH for/GAPDH rev). Полученные электрофореграммы приведены на Рисунке 2.

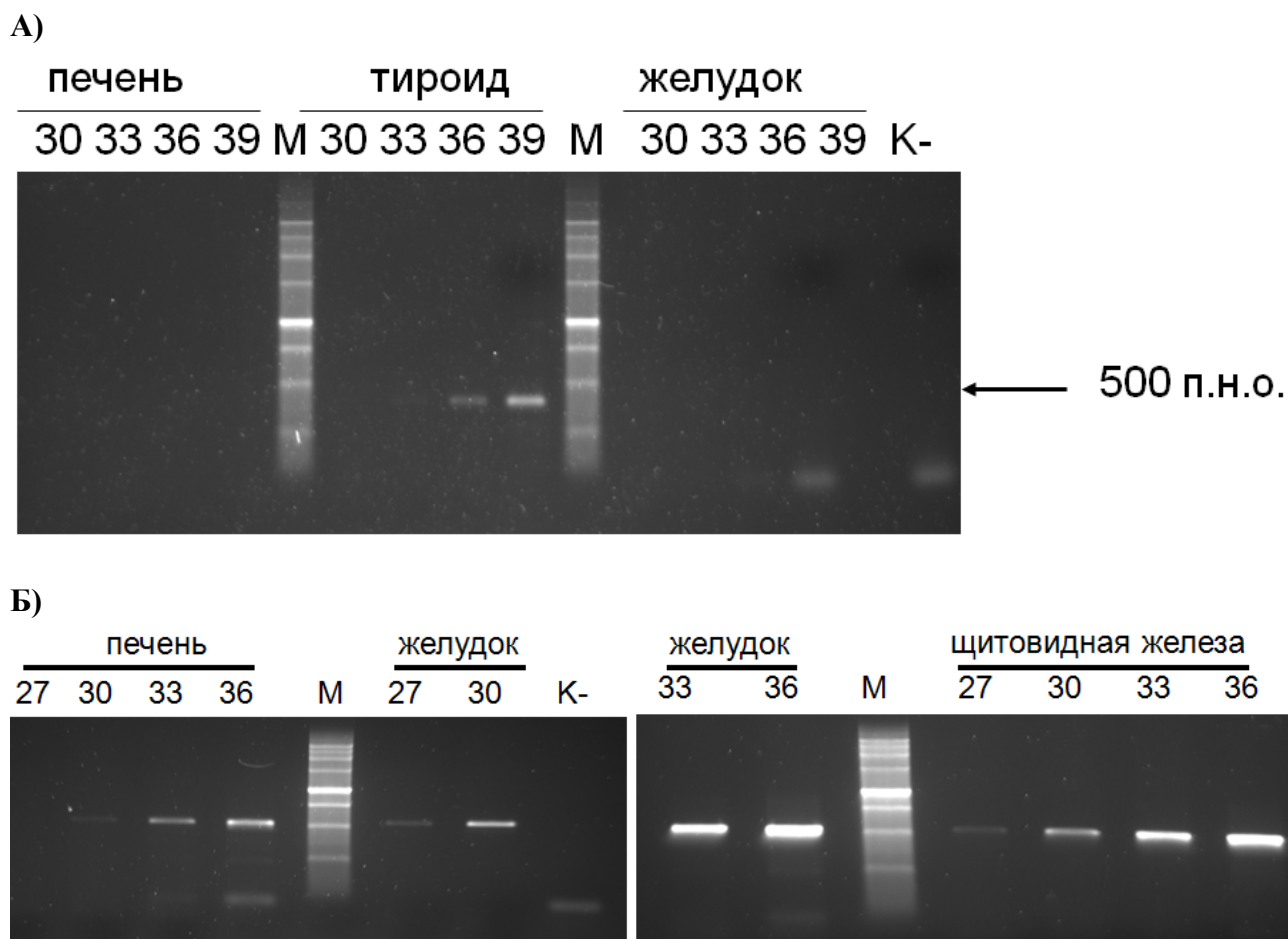


Рисунок 2. Полуколичественная оценка содержания мРНК генов *rNIS* и *Gapdh* в препаратах суммарной РНК, выделенных из разных органов серой крысы. А – электрофореграмма продуктов ПЦР с праймерами к 3'-концевому фрагменту гена *rNIS*, отобранных на 30, 33, 36 и 39 циклах амплификации (указаны сверху). Б – электрофореграмма продуктов ПЦР с праймерами к фрагменту гена *Gapdh*, отобранных на 27, 30, 33 и 36 циклах амплификации. Сверху указаны органы, из которых были получены препараты суммарной РНК. М – маркер длин 100+1500 п.н.о., К- продукты реакции амплификации, проведенной без добавления матрицы.

Согласно полученным данным фрагмент мРНК гена *NIS* обнаруживался в препарате суммарной РНК щитовидной железы, в препаратах РНК желудка и печени соответствующий транскрипт методом ОТ-ПЦР детектировать не удалось (Рисунок 2А). При этом искомым транскрипт в РНК щитовидной железы детектировался на низком уровне (продукт амплификации обнаруживался только на 36-ом цикле). В то же время транскрипт гена «домашнего хозяйства» *Gapdh* в препаратах этих органов был, по-видимому, представлен на значительно большем уровне, так как соответствующий продукт ПЦР обнаруживался на 27-

30-ом циклах амплификации. В связи с этим для клонирования кДНК гена *rNIS* в дальнейшем использовался препарат суммарной РНК, выделенной из щитовидной железы.

3.1.2. Клонирование кДНК гена *rNIS*

В связи с низким содержанием целевого транскрипта было предложено использовать стратегию обогащения препарата кДНК заданными последовательностями. Для этого на первом этапе на матрице суммарной РНК щитовидной железы крысы с помощью реакции обратной транскрипции была синтезирована одноцепочечная кДНК, при этом в качестве затравки использовали олигонуклеотид NIS-nest rev (Таблица 2), комплементарный специфическому участку на 3'-конце мРНК *rNIS*. На втором этапе на матрице полученной обогащенной кДНК методом ПЦР получили последовательность ДНК, содержащую полноразмерную рамку считывания *rNIS*. При этом для повышения специфичности реакцию амплификации целевого продукта проводили в два раунда с использованием «вложенных» праймеров (метод nested PCR). Кроме того для большей точности амплификации использовали смесь ДНК-полимераз Encyclo (Евроген), обладающую корректирующей активностью (proof-reading). Олигонуклеотиды, использованные для второго раунда ПЦР, обладали следующими характеристиками: прямой праймер rNIS for содержал иницирующий трансляцию ATG кодон, а также последовательность Козак, необходимую для повышения эффективности инициации трансляции белка в клетках млекопитающих; обратный праймер rNIS rev содержал кодон, комплементарный стоп-кодону TGA, а также сайт узнавания эндонуклеазы рестрикции KpnI, необходимый для последующих манипуляций.

Полученный ПЦР-продукт клонировали в вектор pAL-TA (Евроген) в штамме DH5α *E. coli*. Методом ПЦР с колоний были отобраны клоны, содержащие последовательность, соответствующую фрагменту *rNIS* (при этом использовались праймеры NIS-seq1 for/NIS-seq2 rev, комплементарные внутренним участкам целевой последовательности). Далее были получены препараты плазмидной ДНК отобранных клонов, которые дополнительно анализировали с помощью рестрикционного и ПЦР-анализов. После этого проводили Сэнгерское секвенирование целевой последовательности в составе плазмидной ДНК, полученной из нескольких клонов.

В результате был отобран один клон, содержащий кодирующую последовательность гена *rNIS* в составе вектора pAL-TA. По сравнению с ранее опубликованной кодирующей последовательностью (NCBI Reference Sequence: NM_052983.2) отобранный клон содержал четыре нуклеотидных замены, две из которых не приводили к замене аминокислоты, одна

замена соответствовала известному однонуклеотидному полиморфизму (приводит к замене остатка метионина на остаток валина), еще одна замена приводила к замене остатка глицина на остаток валина в С-концевом домене белка и ранее не была описана. Последняя замена была обнаружена во всех секвенированных клонах. Последовательность клонированной рамки считывания *rNIS* приведена на Рисунке 3.

ссaccatgagggtgaggccggggccgggacaccttcgggcctgggactacggcgtgttcgcaccatgctgctggtgtccacggg
 catcgggctatgggtcggcctggcccgcggtggccaacgcagtgccgacgacttcttaccggggccggcagttggcagccgttctgtgg
 ggctgtcgtggccgagtttcatgtcggctgtgcaggtgctcggggccccggcaggcagcgcgctacgggctcaagttctgtggatgt
 gcgcgggtcagttgctaacctcgtgctcacagcgttctcttcttccgatcttctaccgcctgggccttaccagcacctaccagtagtagct
 gcgcttcagccgagcgggtccggcctctgcgggacgctgcagtacttgggtggccacgatgctgtatacaggcatcgtgatctacgcgcctgcgctc
 atctgaaccaagtgaccgggttgacatctgggcatcgtcctgtccacaggaatcatctgcacctgtacactaccgtgggtggatgaaggc
 cgtggtctggacagatgtgtccaggtgtggaatgctcgttggcttctgggtgatcctggcccaggcgtcattctctgggggtccccggaa
 cgtgctcagcctcgtcagaaccattcccggatcaacctgatggactttgacctgatcctcggagccggtacaccttctggacttctcatagttggg
 tggcacactggtgtggtctccatgtacgggtgtaaccaagcccaggtacagcgtatgtggcctgccacacagagggaaaggccaactgg
 ccctgctgtcaaccagctgggctcttctgattgtggcagtgacgttctgtgtggcattgcatgtctctactacaaggactgtgacccctc
 ctacagggcgtatctcagcccccgaccgtacatgccgctgctgtgtggacattttgaggatctgcccgggtccccgggctctctcggcc
 tgtcctacagtggcaccctcagcactgcaccaccagcatcaacgccatggcagctgtgactgtggaagacctcatcaagccgaggatgct
 ggctggcacctcggaggtgtttcatctctaaagggctctcattcatctacggctctgctgctcactgtggctgctctgctcactgctggg
 aggtggtgctcctcagggttctcactgtgatgggtgcatcagtgggcctctactagggccttcacgcttgggatgctgctcccagcctgcaa
 cacgccaggcgttctcctcgggttggcagcaggcttggctgtatccctgtgggtggccgtaggggcccacactatccccctggagagcagac
 catgggggtgctgccacctcggctgcaggctgaccaacgattcggctcctcctgggcccactggagccaccaacgctccaacgggatcc
 ccagttctggaatggacacgggcccctgcctcgtgatacctttacgccatctctattacggggctctgggcacgctgaccacca
 tgcttgcgggtgctctcatcagctaccttactggtcccaccaagcgcagctccctgggtcccggattgctgtggtgggacctgtcgcagacag
 cgtctgtggcccaaggaagacactgccaccctggaggagagcctggtgaagggaccggaagacatccctgctgtgaccaagaagcccc
 tggcctcaagccagtcggcgagaccccccctgtatctggggcacgatgtggagaccaacctcagagggtaccg

Рисунок 3. Нуклеотидная последовательность клонированного гена *rNIS*

(кодирующая цепь). Слева направо приведены: последовательность Козак (выделена серым), стартовый кодон ATG рамки считывания *rNIS* (выделен зеленым), нуклеотидные замены (выделены красным), стоп-кодон TGA (выделен зеленым), сайт узнавания эндонуклеазы рестрикции KpnI (выделен желтым). Значение обнаруженных замен в кодирующей последовательности (слева направо, нумерация от первого нуклеотида стартового кодона): 655-й остаток А на G, приводит к замене 219-го кодона AUG на кодон GUG (первый кодирует Met, второй - Val), белок rNIS с такой заменой описан; 1014-й остаток А на G, синонимичная замена 338-го кодона GGA на GGG (оба кодируют Gly); 1395-й остаток G на А, синонимичная замена 465-го кодона CTG на CTA (оба кодируют Leu); 1805-й остаток G на Т, приводит к замене 602-го кодона GGC на GTC (первый кодирует Gly, второй - Val), данная замена ранее не описана.

3.1.3. Получение экспрессионных генетических конструкций, несущих ген *rNIS* под контролем различных регуляторных элементов

Для экспериментов с клетками млекопитающих было получено несколько экспрессионных конструкций, содержащих последовательность *rNIS*. Общая схема экспрессионных конструкций с геном *rNIS* схематично изображена на Рисунке 4.

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).

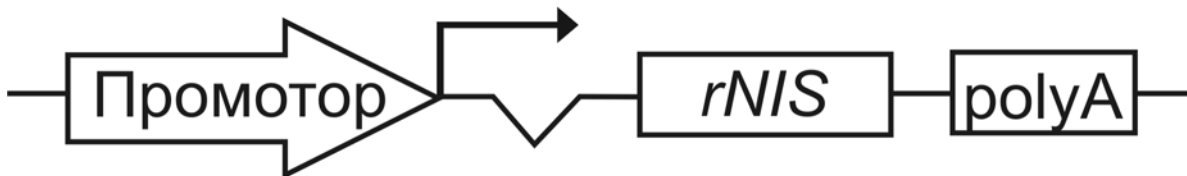


Рисунок 4. Общая схема созданных экспрессионных векторов. Стрелкой обозначен промотор, направляющий экспрессию репортерного гена; Г-образной стрелкой - точка начала транскрипции; V-образной линией - синтетический интрон; прямоугольниками (слева направо) – ген *rNIS* и сигнал полиаденилирования SV40.

Фрагмент, содержащий кодирующую последовательность *rNIS*, был вырезан по сайтам узнавания рестрикционных эндонуклеаз EcoRI и KpnI из конструкции pAL-TA-rNIS и клонирован в вектор pCI (Promega), предварительно линейаризованный по таким же сайтам. В результате была получена промежуточная конструкция pCI-rNIS, содержащая *rNIS* под контролем раннего промотора цитомегаловируса pCMV с энхансером (входят в состав pCI), см. Рисунок 5А.

Фрагмент, содержащий кодирующую последовательность *rNIS*, был вырезан по сайтам узнавания рестрикционных эндонуклеаз HindIII и XbaI из конструкции pCI-rNIS и клонирован в вектор pGL3-basic, предварительно линейаризованный по таким же сайтам (таким образом был удален ген, кодирующий люциферазу светлячка). В результате была получена экспрессионная конструкция rNIS, содержащая *rNIS* без промотора, см. Рисунок 5Б.

Фрагмент, содержащий кодирующую последовательность *rNIS*, был вырезан по сайтам узнавания рестрикционной эндонуклеазы EcoRI из конструкции pAL-TA-rNIS и

клонирован в вектор pCMV-FCU1-pGL3 (ранее получен в лаборатории Д.В. Кузьминым), предварительно линейаризованный по таким же сайтам (таким образом был удален ген *FCU1*, кодирующий гибридный белок цитозиндезаминазу-урацилфосфорибозилтрансферазу). В результате была получена экспрессионная конструкция pCMV-rNIS, содержащая *rNIS* под контролем промотора pCMV (Рисунок 5В). Аналогичным образом была получена конструкция 3ET-pMIA-rNIS, содержащая меланомоспецифический регуляторный элемент 3ET-pMIA (описан далее в тексте), см. Рисунок 5Г.

Фрагмент, содержащий кодирующую последовательность *rNIS*, был вырезан по сайтам узнавания рестрикционных эндонуклеаз HindIII и XbaI из конструкции pCI-rNIS и клонирован в вектор pmSURV-pGL3 (ранее получен в лаборатории М.В. Митяевым), предварительно линейаризованный по таким же сайтам (таким образом, был вырезан ген, кодирующий люциферазу светлячка). В результате была получена экспрессионная конструкция pmSURV-rNIS, содержащая *rNIS* под контролем промоторного участка гена *Birc5* мыши (pmSURV), см. Рисунок 5Д.

Фрагмент, содержащий кодирующую последовательность *rNIS*, был вырезан по сайтам узнавания рестрикционной эндонуклеазы EcoRI из конструкции pAL-TA-rNIS и клонирован в вектор pHТERT-CMVmin-FCU1-pGL3 (ранее получен в лаборатории Д.В. Кузьминым), предварительно линейаризованный по таким же сайтам (таким образом, был вырезан ген, кодирующий гибридный ген цитозиндезаминазы-урацилфосфорибозилтрансферазы). В результате была получена экспрессионная конструкция pHТERT-CMVmin-rNIS, содержащая *rNIS* под контролем гибридного регуляторного элемента pHТERT-CMVmin, см. Рисунок 5Е.

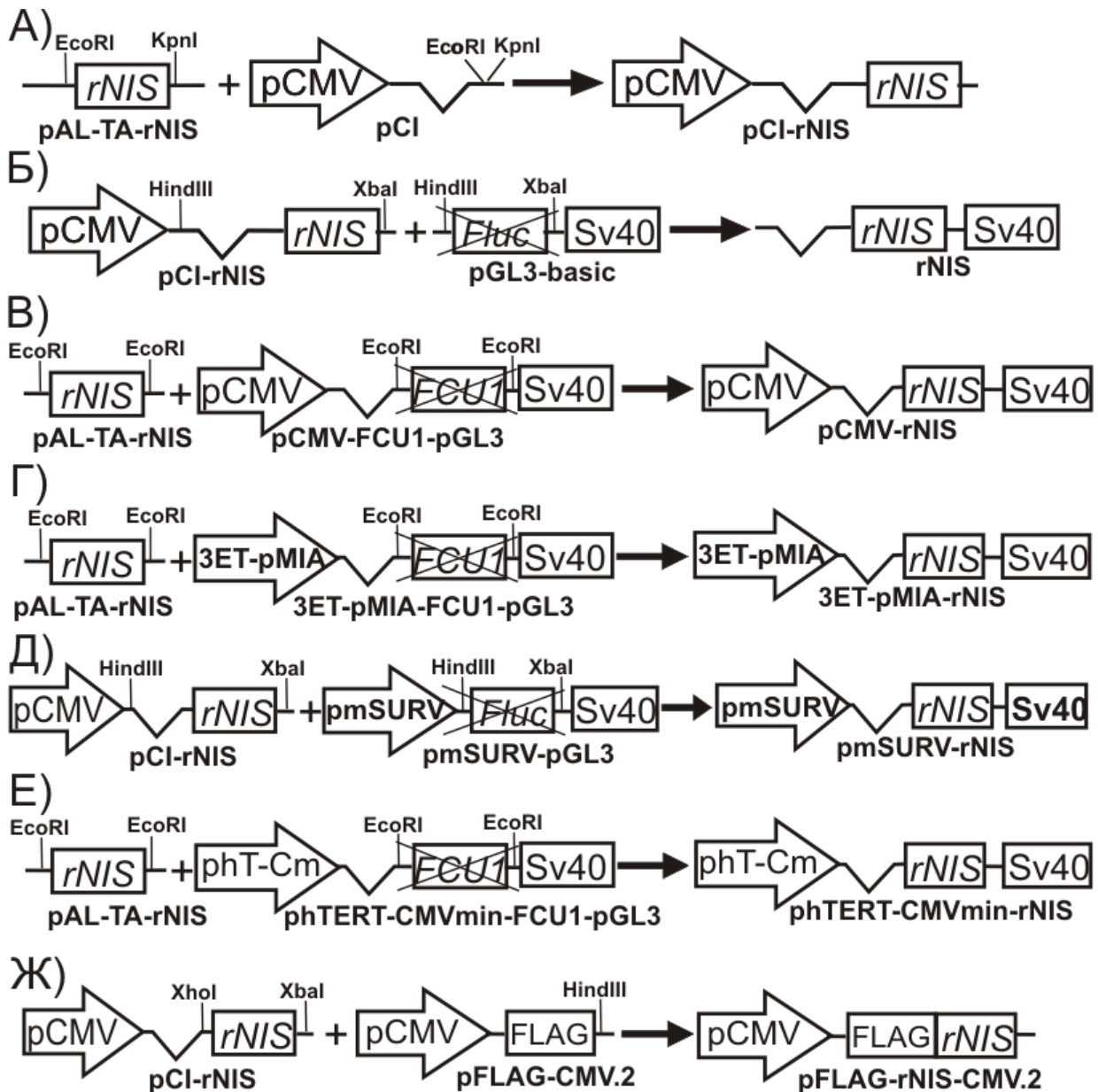


Рисунок 5. Схема получения экспрессионных векторов, содержащих *rNIS*.

Приведены схемы получения конструкций: А) pCI-rNIS, Б) rNIS, В) pCMV-rNIS, Г) 3ET-pMIA-rNIS, Д) pmSURV-rNIS, Е) pHTERT-CMVmin-rNIS, Ж) pFLAG-rNIS-CMV.2. Под схемами векторных конструкций отображены их названия, на схемах указаны входящие в состав векторов элементы, а также сайты рестрикции, по которым осуществлялся гидролиз, двумя скрещенными отрезками обозначены элементы, удаленные при клонировании. Стрелкой обозначены промоторы, направляющие экспрессию репортерного гена, pHT-Cm соответствует промотору pHTERT-CMVmin; V-образной линией - синтетический интрон; прямоугольниками – ген *rNIS*, сигнал полиаденилирования SV40, ген люциферазы светлячка (*Fluc*), ген цитозиндезаминазы-урацилфосфорибозилтрансферазы (*FCU1*), кодирующая последовательность FLAG-эпитопа.

Кроме того была создана экспрессионная конструкция pFLAG-rNIS-CMV.2, использованная в дальнейшем для оценки длины продукта трансляции полученной рамки считывания *rNIS* в клетках млекопитающих, см. Рисунок 5Ж. Данная конструкция кодирует химерный белок rNIS с FLAG-эпитопом на N-конце и содержит промотор pCMV для эффективной экспрессии гена химерного белка в клетках млекопитающих. Для создания данной конструкции вектор pFLAG-CMV.2 (Sigma Aldrich) был линейаризован по сайту узнавания рестрикционной эндонуклеазы HindIII, фрагмент, содержащий кодирующую последовательность *rNIS*, был вырезан по сайтам узнавания рестрикционных эндонуклеаз XhoI и XbaI из конструкции pCI-rNIS. Далее провели достройку концов обоих фрагментов, используя фрагмент Кленова, и лигировали между собой. Бактериальные колонии отбирались методом ПЦР с колонии, препараты плазмидной ДНК отобранных клонов дополнительно анализировали рестрикционным и ПЦР-анализами, после чего секвенировали участок стыка вектора и вставки.

Подробная характеристика экспрессионных конструкций, будет рассмотрена ниже.

3.1.4. Оценка длины продукта экспрессии клонированного *rNIS* в клетках млекопитающих

Важной характеристикой клонированного гена служит возможность его экспрессии в целевых клетках, размер и наличие пост-трансляционных модификаций у образующихся белковых продуктов. Эти параметры были изучены в условиях транзientной трансфекции двух клеточных линий человека экспрессионной конструкцией pFLAG-rNIS-CMV.2, кодирующей химерный белок FLAG-rNIS. Наличие FLAG-эпитопа на N-конце гибридного белка позволило селективно изучить его свойства в суммарном лизате трансфицированных клеток с помощью вестерн-блот анализа, при этом использовались моноклональные антитела к FLAG-эпитопу. Эксперимент проводили следующим образом: сначала проводили липофекцию клеток линии HEK293 (клетки почки эмбриона человека) или линии HT1080 (клетки фибросаркомы человека) генно-инженерными конструкциями pFLAG-rNIS-CMV.2 и pFLAG-CMV.2 (отрицательный контроль), через 48 часов после трансфекции готовили экстракты трансфицированных клеток, которые анализировали с помощью вестерн-блоттинга с использованием моноклональных антител к FLAG-эпитопу. Для выравнивания наносимых экстрактов дополнительно проводили окрашивание мембраны с антителами к белку GAPDH. Полученные данные приведены на Рисунке 6.

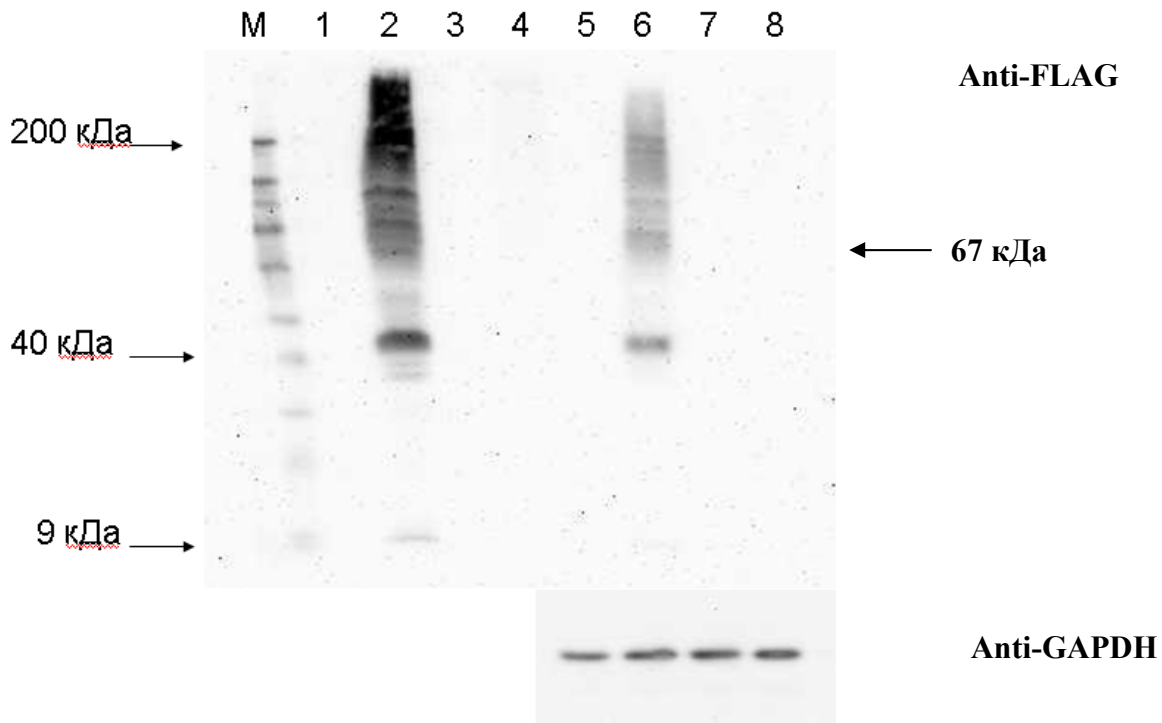


Рисунок 6. Вестерн-блот анализ лизатов клеток HT1080 и HEK293, трансфицированных pFLAG-CMV.2 и pFLAG-rNIS.3-CMV.2. На первом этапе проводили липофекцию клеток линии HEK293 (клетки почки эмбриона человека) или линии HT1080 (клетки фибросаркомы человека) генно-инженерными конструкциями pFLAG-rNIS-CMV.2 или pFLAG-CMV.2 (отрицательный контроль), через 48 часов после трансфекции готовили экстракты трансфицированных клеток, которые анализировали с помощью вестерн-блоттинга с использованием моноклональных антител к FLAG-эпиту. Для выравнивания наносимых экстрактов дополнительно проводили окрашивание мембраны с антителами к белку GAPDH. Сверху приведена фотография мембраны, окрашенной Anti-FLAG антителами, снизу – Anti-GAPDH антителами (окрашивали только дорожки с разведенными лизатами). М – белковый маркер масс 9-200 кДа, стрелками слева указано положение белков маркера, имеющих соответствующие молекулярные массы, стрелкой справа указано положение белка, соответствующего нативному FLAG-rNIS по молекулярной массе. Сверху подписаны номера образцов: 1 – лизат клеток HEK293, трансфицированных FLAG-CMV.2, 2 – лизат HEK293, трансфицированных FLAG-rNIS-CMV.2, 3 – лизат HT1080, трансфицированных FLAG-CMV.2, 4 – лизат HT1080, трансфицированных FLAG-rNIS-CMV.2, 5-8 – те же лизаты, разведенные в 10 раз.

В результате было показано высокое содержание белка FLAG-содержащего белка в клетках HEK293, трансфицированных конструкцией pFLAG-rNIS-CMV.2, и значительно меньшее (на пределе чувствительности) содержание данного белка в клетках HT1080. В

лизатах клеток обеих линий, трансфицированных рFLAG-CMV.2, FLAG-содержащие белки не детектировались, что свидетельствует о специфической работе антител Anti-FLAG. Белок с эпитопом FLAG обнаруживался в нескольких формах, различающихся по электрофоретической подвижности. Мажорные полосы соответствовали по электрофоретической подвижности белкам с молекулярной массой около 45 кДа, 65 кДа и выше 200 кДа. Наблюдаемая электрофоретическая подвижность разных форм химерного белка была сходна с картиной, полученной для белка rNIS другими исследователями [Mitrofanova и др., 2004]. Таким образом, можно заключить, что в трансфицированных конструкцией рFLAG-rNIS-CMV.2 клетках продуцировался целевой белок FLAG-rNIS. Существование различных форм белка можно объяснить наличием пост-трансляционных модификаций, в первую очередь – гликозилированием, хорошо описанным для NIS. Полученные данные свидетельствуют о правильной экспрессии клонированного гена в клетках HEK293. Низкий уровень продукции белка в клетках HT1080, вероятно, связан с более низкой эффективностью транзientной трансфекции данной клеточной линии.

3.2. Исследование активности NIS, образующегося при доставке различных экспрессионных конструкций в клетки меланомного происхождения *in vitro*

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

Ген *rNIS* был клонирован нами *de novo* и содержал нуклеотидные замены, влияние которых на активность образующегося белка было неизвестно. В связи с этим необходимо было изучить функциональную активность белка NIS, образующегося при доставке клонированного гена *rNIS* в клетки млекопитающих. В качестве клеточной модели были выбраны клетки меланомного происхождения, для которых не характерна эндогенная экспрессия натрий-йодидного симпортера. Функциональный анализ полученных конструкций проводили путем определения способности трансфицированных клеток поглощать йодид-ионы из культуральной среды. Для этого генно-инженерными конструкциями rNIS, рCMV-rNIS и рFLAG-CMV.2 (контрольная плазмида без *rNIS*, далее обозначена как К-) проводили липофекцию клеток меланомы человека (A375) и меланомы мыши (меланома Клаудмана S91, клон М3, далее – М3). 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 $^{125}\text{I}^-$, 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 $^{125}\text{I}^-$ трансфицированными клетками, проводили контрольный эксперимент, в котором клетки инкубировали с радиойодидом в той же среде, но содержащей 50 мкМ перхлората натрия. Полученные данные представлены на Рисунке 7.

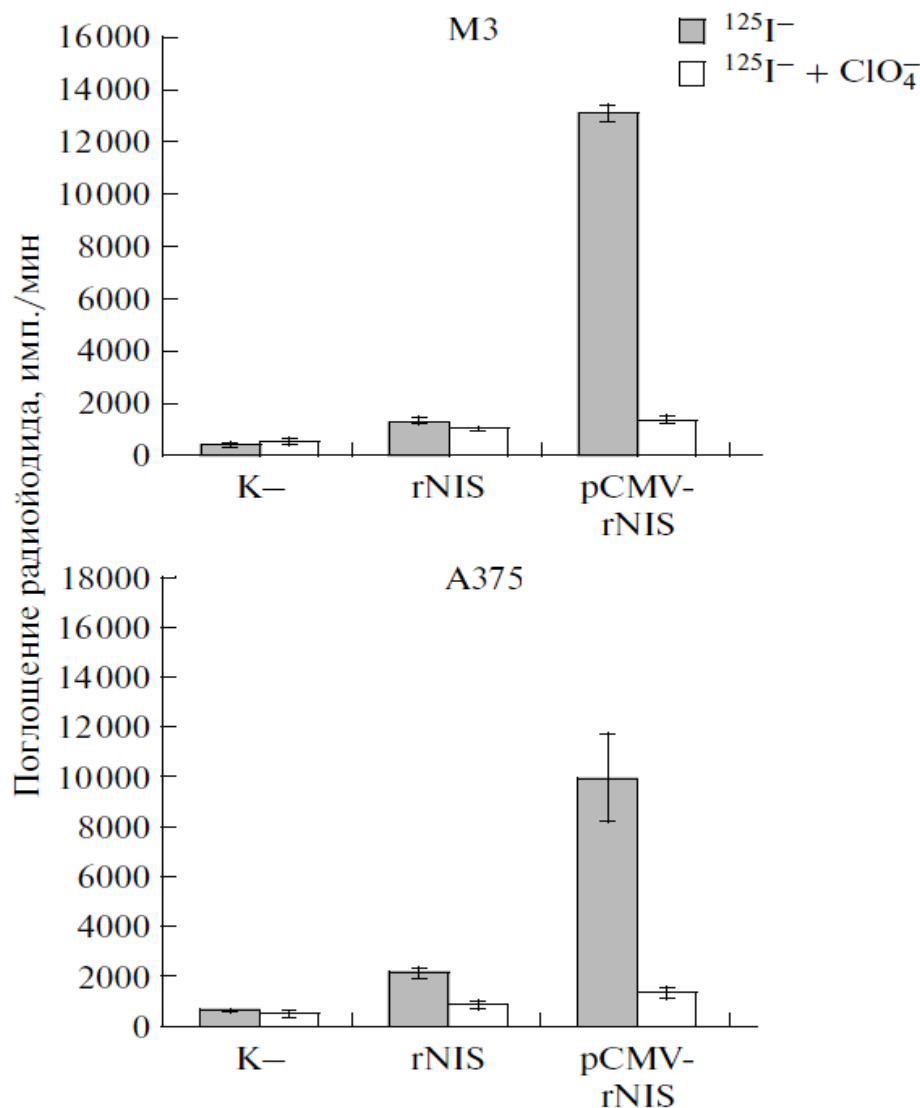


Рисунок 7. Поглощение $^{125}\text{I}^-$ в трансфицированных клетках. M3 и A375 – результаты для клеток меланомы мыши и человека соответственно. Трансфицированные клетки инкубировали в буфере с $^{125}\text{I}^-$, либо в буфере с $^{125}\text{I}^-$ и перхлоратом. Высота столбцов отражает среднюю активность 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. K– соответствует конструкции pFLAG-CMV.2.

Согласно полученным данным клетки обеих меланомных линий, трансфицированные экспрессионной конструкцией рСМV-гNIS, поглощали значительно большее количество йодид-ионов из среды по сравнению с клетками, трансфицированными контрольной плазмидой (К-). Добавление перхлората натрия при инкубации с ^{125}I приводило к значительному снижению поглощения ^{125}I 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 гNIS, также поглощали радиодид и такая активность подавлялась добавлением перхлората, однако уровень поглощения был значительно ниже по сравнению с клетками, трансфицированными рСМV-гNIS. Такой феномен, вероятно, связан с фоновой экспрессией *rNIS* в беспромоторной конструкции. В лизатах контрольных клеток (К-) обнаруживался ^{125}I , 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 клонированный ген *rNIS* при его экзогенной экспрессии в клетках млекопитающих способен обеспечивать синтез функционального NIS. Кроме того, созданная экспрессионная конструкция, несущая ген *rNIS* под контролем сильного вирусного промотора рСМV, при трансфекции *in vitro* клеток меланомного происхождения обеспечивает высокий детектируемый уровень синтеза функционального NIS.

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

Помимо сильных и конститутивно активных вирусных промоторов к перспективным регуляторным элементам, используемым для транскрипционного контроля доставляемых генов, можно отнести тканеспецифичные и опухолеспецифичные промоторы. Одной из важных задач, решаемых в процессе разработки генотерапевтических систем, является обеспечение высокого уровня экспрессии гена интереса в целевых клетках при одновременном снижении его активности в других тканях модельного организма. Как было отмечено ранее, в большинстве работ для достижения экзогенной экспрессии *NIS* в нетиреоидных опухолевых клетках используются конститутивно активные вирусные промоторы, такие как *pCMV* и *pSV40* [Riesco-Eizaguirre, Santisteban, 2006], что приводит к высокому уровню поглощения радиоизотопов целевыми клетками, однако, чревато нежелательной активностью NIS в неопухолевых тканях (при системной доставке гена *NIS* в

экспериментах *in vivo*). Для предотвращения неспецифической активности трансгенов часто используют промоторы, специфически активные только в целевых клетках или тканях. В рамках такого подхода можно использовать тканеспецифические промоторы, высокоактивные в клетках определенного происхождения, либо опухолеспецифичные промоторы, активные исключительно в клетках с опухолевым фенотипом. Однако, увеличение специфичности промоторов часто сопровождается снижением их активности. 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 *rNIS* под контролем конститутивно активного промотора цитомегаловируса (pCMV); 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 экспрессионных конструкций приведены на Рисунке 5. 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 8. 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 8. Ранее данный промотор был изучен в нашей лаборатории. Было показано, что он, как и промотор гена *BIRC5* человека, активизирует синтез репортерных генов в большинстве клеток опухолевого происхождения, но практически не активен в нормальных клетках. При этом было показано, что активность промотора мышиногo 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 8. 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.

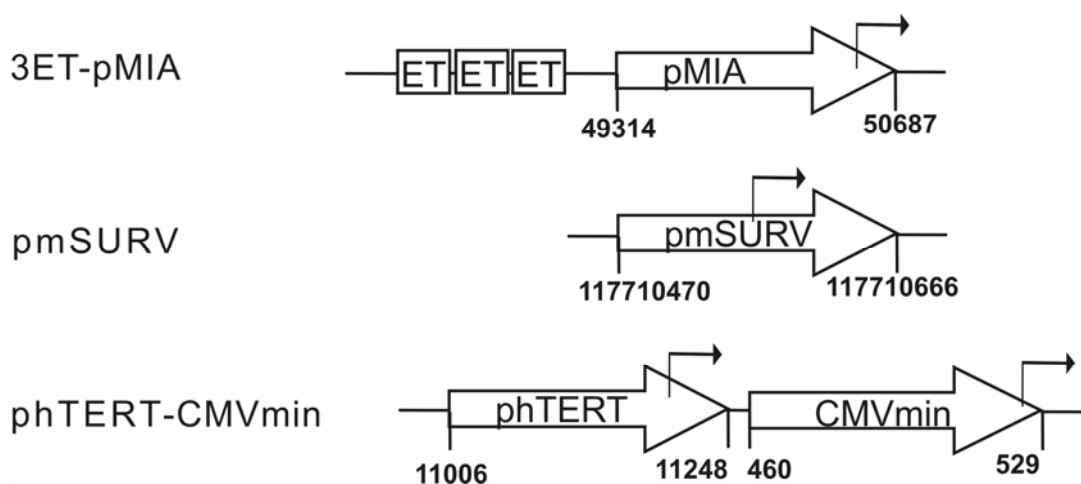


Рисунок 8. Структура используемых специфичных промоторов. Стрелкой обозначен промотор, направляющий экспрессию репортерного гена, цифрами указаны координаты относительно референсной последовательности из GeneBank (NT_011109.16 для промотора гена *MIA*, NC_000077.5 для *pmSURV*, AF128893 для промотора *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 3.

Таблица 3. Активность промоторов в транзгентно-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 3ET-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 ($\text{mean} \pm \text{SEM}$).

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
3ET-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 3ET-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 3ET-pMIA, активность этих промоторов относительно pSV40 была различна в проанализированных 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, активность выбранных регуляторных элементов значительно различалась в клетках меланомного происхождения, ряд активности изученных промоторов в клетках 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 гNIS под контролем того же набора промоторов (pCMV, phTERT-CMVmin, pmSURV и 3ET-pMIA), структура данных конструкций приведена на Рисунке 5.

Параллельно проводили трансфекцию клеток двумя контрольными конструкциями: pFLAG-CMV.2 (К-, не содержала гNIS) и гNIS (беспромоторная конструкция). Активность NIS в трансфицированных клетках определяли методом RIUA, как это описано ранее. Полученные данные представлены на Рисунке 9.

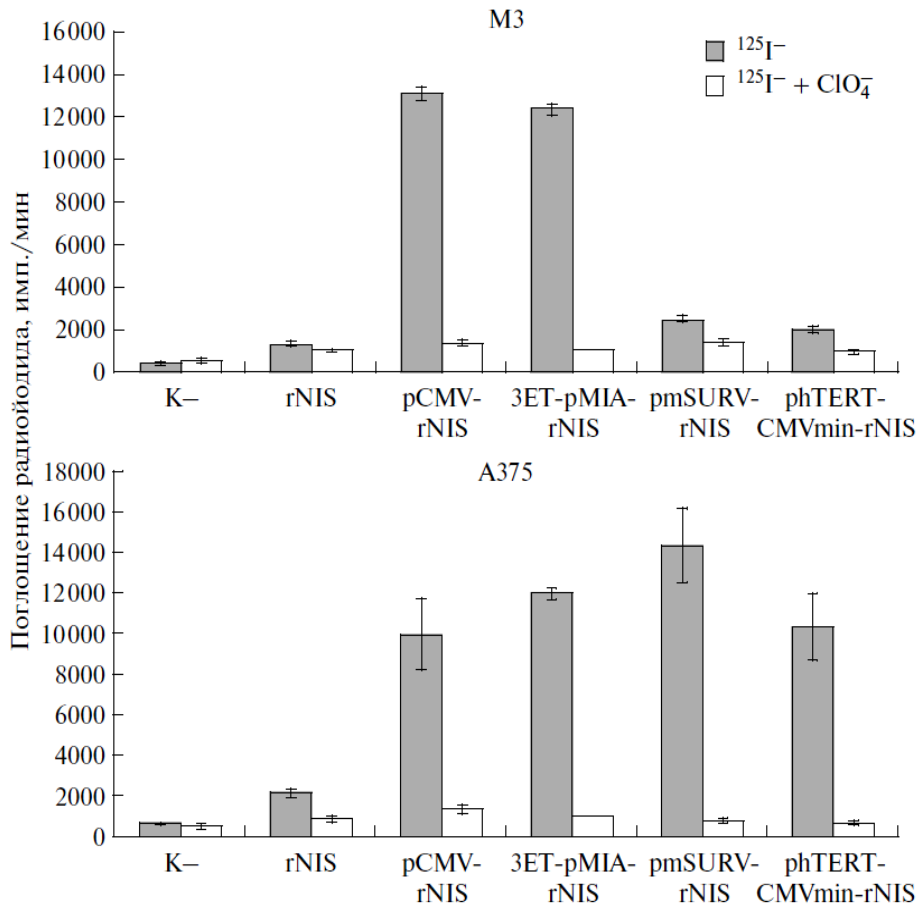


Рисунок 9. Поглощение $^{125}\text{I}^-$ в транзientно-трансфицированных клетках. M3 и A375 – результаты для клеток меланомы мыши и человека соответственно. Генетическими конструкциями проводили липофекцию клеток, через 48 часов трансфицированные клетки инкубировали в буфере с $^{125}\text{I}^-$, либо в буфере с радиоактивным йодидом и перхлоратом (ряд $^{125}\text{I}^- + \text{ClO}_4^-$), после 1 часа инкубации клетки лизировали щелочью. Высота столбцов отражает среднюю активность $^{125}\text{I}^-$ (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 $^{125}\text{I}^-$, сопоставимое с тем, что поглощали клетки, трансфицированные конструкцией с сильным промотором pCMV. Клетки A375, трансфицированные конструкциями pmSURV-rNIS и phTERT-CMVmin-rNIS, поглощали $^{125}\text{I}^-$ 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 hTERT-CMVmin-rNIS, поглощали в несколько раз меньше радиоактивного йодида, чем клетки, содержащие конструкции с более

сильными промоторами рСМV и ЗЕТ-рMIA. 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 меланомоспецифичного промотора ЗЕТ-рMIA обеспечивает в двух клеточных линиях меланомы мыши (M3) и человека (A375) высокий уровень активности NIS, сопоставимый с уровнем, обусловленным значительно более сильным промотором рСМV. Опухолеспецифичные промоторы pmSURV и phTERT-CMVmin, еще менее активные по сравнению с рСМV, обеспечивают высокий уровень активности NIS в клеточной линии меланомы человека (A375), но сравнительно низкий в линии меланомы мыши (M3).

Полученные нами данные указывают на то, что для репортерной системы на основе NIS характерна нелинейная зависимость сигнала (уровня поглощения радиоактивного йодида клетками) от уровня экспрессии гена *NIS* в клетках. В клетках меланомного происхождения в условиях транзientной трансфекции система проявляла чувствительность к различиям в активности сравнительно слабых промоторов. Мы наблюдали различия в уровне активности NIS при использовании беспромоторной конструкции и конструкций со слабыми опухолеспецифичными промоторами pmSURV и phTERT-CMVmin, а также в уровне активности NIS в клетках M3, определяемой опухолеспецифичными и меланомоспецифичным промоторами. Однако в случае более активных рСМV и ЗЕТ-рMIA уровни поглощения радиоактивного йодида были практически одинаковыми, несмотря на большие различия в активности этих промоторов. Более того, в клетках A375 активность NIS была одинаковой при использовании слабоактивных pmSURV и phTERT-CMVmin и умеренно активного ЗЕТ-рMIA, хотя различия в активности этих промоторов были явно выражены. По всей видимости, в клетках с небольшим содержанием NIS умеренное повышение количества этого белка приводит к значительному росту поглощения радиоактивного йодида. Однако дальнейшее увеличение содержания NIS не влияет на поглощение йодида клетками. Таким образом, пределы чувствительности репортерной системы на основе *rNIS* оказались значительно уже, чем у системы люциферазной детекции.

Подобную картину наблюдали другие исследователи при инфекции клеток аденовирусами Ad-rNIS [Mitrofanova и др., 2006]. Увеличение количества аденовирусных частиц при инфекции приводило к росту поглощения радиоактивного йодида лишь в определенных пределах. При высокой множественности заражения трансдуцированные клетки поглощали одинаковое количество радиоактивного йодида. Стоит отметить, что ограниченный рост поглощения радиоактивного йодида при увеличении титра аденовируса мог быть связан либо с достижением максимального уровня трансдукции клеток, либо с увеличением цитотоксичности аденовируса при высокой множественности инфекции.

Схожие данные получены в работе, выполненной с использованием системы Tet-On для доксициклин-индуцируемой экспрессии *NIS* человеческого происхождения [Vadysirisack, Shen, Jhiang, 2006]. На трех стабильно трансфицированных клеточных линиях было показано, что увеличение продукции *NIS* приводит к линейному росту содержания белка на поверхности клеток, однако способность поглощать ^{125}I растет в узком диапазоне, после чего выходит на плато. Дальнейшее повышение экспрессии гена *NIS* стимулировало синтез белка и увеличение его экспрессии на поверхности клеток, но поглощение ^{125}I не менялось, оставаясь на максимальном уровне. Авторами работы был сделан вывод, что существование предельного уровня поглощения радиоактивного йодида обусловлено не ограниченным трафиком образующегося белка на клеточную поверхность, а какими-то другими факторами (доступностью субстрата, мембранным потенциалом клеток, достижением равновесия между поглощением и вытеканием радиоактивного йодида).

Каковы возможные причины существования пределов роста поглощения йодида клетками, продуцирующими *NIS*? Можно предложить три объяснения данного феномена.

Во-первых, образующийся экзогенный *NIS* может быть токсичным для клеток. Его избыточная продукция, например, при использовании сильного промотора приводит к гибели клеток после трансфекции. В таком случае в условиях эксперимента будет измерено поглощение йодида только выжившими клетками, содержание *NIS* в которых не превышает определенных значений. Однако согласно данным MTS-анализа, который проводили также через 48 часов после трансфекции для нормализации исследуемых образцов по количеству жизнеспособных клеток, в нашем случае не наблюдалось усиление гибели клеток, трансфицированных конструкциями с более сильными промоторами рCMV и 3ET-pMIA.

Во-вторых, возможно ограничение трафика образующегося белка *NIS* на цитоплазматическую мембрану при его сверхпродукции. В условиях эксперимента определяли активность именно мембранного белка, поэтому содержание цитоплазматической фракции образующегося белка осталось неизученным. Тем не менее, подобное объяснение не подтверждается приведенными выше данными [Vadysirisack, Shen, Jhiang, 2006].

В-третьих, емкость клеток для накапливающегося радиоактивного йодида возможно ограничена. Количество захваченного радиоактивного йодида определяли после инкубации в йодсодержащем буфере в течение 60 мин, когда уже достигалось равновесие между поглощением и вытеканием йодида (согласно данным авторов использованной методики RIUA [Weiss, Philp, Grollman, 1984]). В таком случае максимальный уровень поглощения определяется количеством клеток, экспрессирующих *NIS*, их биохимическими особенностями и начальной концентрацией субстратов симпортера в среде (ионов натрия и

йодида). Можно предположить, что при непродолжительной инкубации клеток с радиоактивным йодидом различия в скорости поглощения изотопа могут быть выявлены. Однако необходимо иметь в виду, что опыты *in vivo* с использованием системы NIS/радионуклиды проводят, как правило, в течение длительного времени (десятки минут–часы, что связано со временем сканирования модельного организма), поэтому в таких экспериментах сложно выявить тонкие различия между скоростью поглощения радиоактивного йодида целевыми клетками – экспериментаторы наблюдают уже равновесное количество захваченного радиоактивного йодида. Поэтому мы изучали поглощение радиойодида именно при значительном времени инкубации. Возможно, что обнаруженное нами явление обусловлено комбинацией нескольких перечисленных факторов.

В любом случае, полученные данные указывают на то, что созданная репортерная система на основе клонированного *rNIS* 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. Эту информацию необходимо учитывать при проведении опытов *in vivo*.

3.3. Изучение диффузии радиойодида из клеток, экспрессирующих NIS, 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 радиофармпрепарата особенно важно, так как определяет дозу облучения 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 транзистентно трансфицированы плазмидой pCMV-rNIS либо контрольной плазмидой pFLAG-CMV.2. Через 48 часов после трансфекции провели изучение скорости вытекания предварительно накопленного радиойодида из клеток (I^- efflux assay). Данный эксперимент представляет

собой модифицированный метод RIUA, в котором на первом этапе клетки также инкубируют в среде с радиоiodидом, после чего среду заменяют нерадиоактивной, которую полностью обновляют через заданные промежутки времени. В конце эксперимента оставшийся в клетках радиопрепарат извлекают щелочным лизисом, определяют содержание радиоiodида в каждой фракции, суммарную активность всех фракций принимают за исходное количество захваченного радиоiodида. Полученные данные приведены на Рисунке 10.

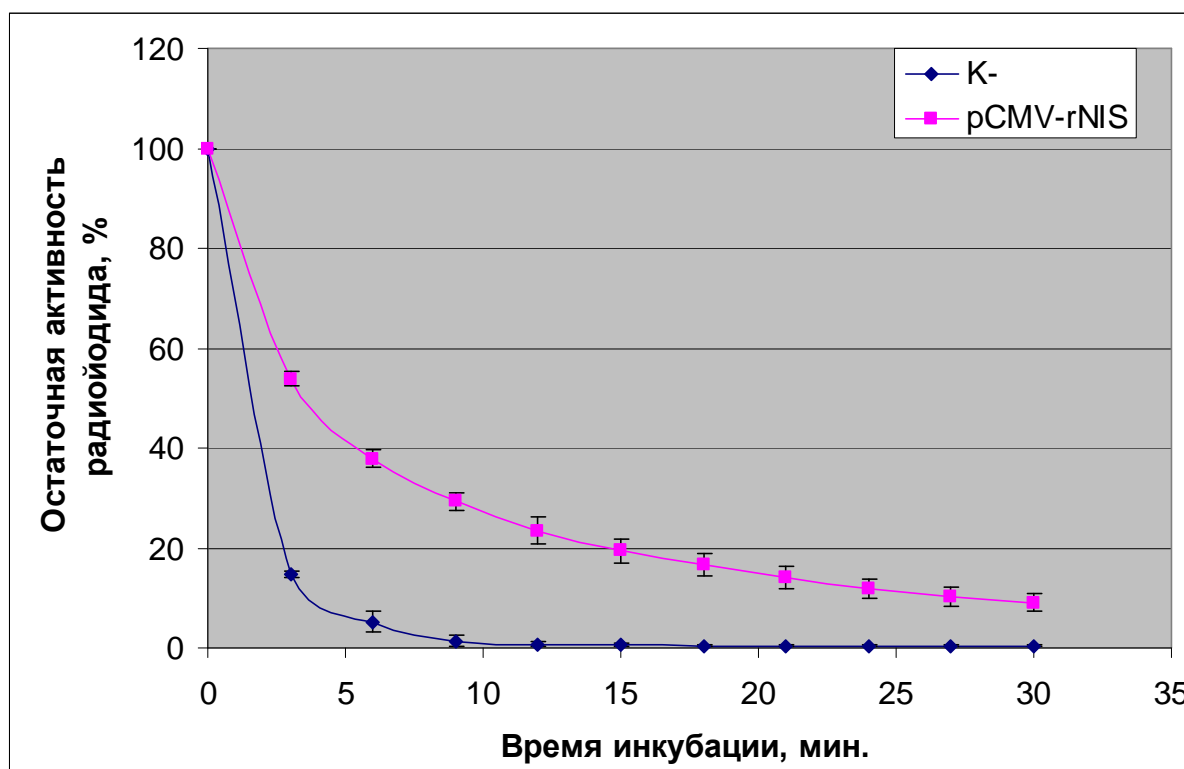


Рисунок 10. Диффузия ^{125}I из трансфицированных клеток МЗ. pFLAG-CMV.2 (K-) и pCMV-rNIS – результаты для клеток, трансфицированных соответствующими конструкциями. Трансфицированные клетки инкубировали в буфере с ^{125}I в течение 1 часа, затем буфер удаляли, после чего проводили отмывку клеток в среде 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 ^{125}I 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 радиоактивности. В контрольных клетках, трансфицированных плазмидой pFLAG-CMV.2, через час после инкубации с ^{125}I 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 ^{125}I с контрольными клетками и/или стенками культурального планшета.

Полученные данные указывают на то, что созданная система на основе rNIS при трансфекции клеток *in vitro* может обеспечивать высокий уровень захвата ^{125}I клетками, однако захваченный изотоп быстро (в течение десятков минут) вымывается из клеток. Такой недостаток системы ограничивает изучение ее терапевтического потенциала в экспериментах *in vitro*. Если такое же низкое время удержания захваченного изотопа будет наблюдаться и в условиях *in vivo*, то это может серьезно усложнить применение данной системы в диагностических и терапевтических приложениях и потребовать выработки компенсирующих технологий, например, разработки системы фиксации иода в клетке или повторных введений радиоактивного препарата. 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.

3.4. 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 называется органификация йодида, он обеспечивает синтез тиреоидных гормонов, тироксина и трийодотиронина (см. Рисунке 1). 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 ^{125}I в экспрессирующих NIS клетках, по видимому, связано с отсутствием в них системы органификации йодида. Как было отмечено, ранее предпринимались попытки воссоздать эту систему в опухолевых клетках путем переноса гена, кодирующего тиреопероксидазу. 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 (в тиреоидных фолликулах специальная ферментная система обеспечивает продукцию H_2O_2), а также различная локализация участников органификации: тиреопероксидаза экспортируется на поверхность трансфицированных клеток и функционирует во внеклеточном пространстве, тогда как повышенная концентрация йодида создается в их цитоплазме. Так или иначе, воссоздать тиреоидную систему органификации йодида в нетиреоидных опухолях (а тем более клетках в условиях *in vitro*) затруднительно в силу ее сложной многокомпонентной организации.

Мы попробовали другой подход, заключающийся в попытке внутриклеточной органификации радиойодида, захватываемого с помощью NIS. В качестве фермента, способного окислять радиойодид, была выбрана лактопероксидаза мыши (LPO). Способность лактопероксидазы окислять йодид, катализируя при этом йодирование белков по остаткам тирозина, известна давно [TAUROG, DORRIS, LAMAS, 1974]. Такая активность лактопероксидазы широко используется для ковалентного мечения в условиях *in vitro* белков и пептидов радиоактивным йодом [Marchalonis, 1969]. Лактопероксидаза в норме секретируется из клеток во внеклеточное пространство, поэтому было предложено модифицировать ее последовательность таким образом, чтобы этот фермент, накапливался в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР), где в норме наблюдается высокое содержание пероксида водорода (в других клеточных органеллах свободный пероксид быстро утилизируется антиоксидантными системами клетки) [Malinouski и др., 2011], такой вариант был назван LPO-E. Модифицированный вариант представлял собой полноразмерную лактопероксидазу, содержащую на С-конце сигнальную последовательность HDEL, способную изменять траффик секретируемых белков на удержание их в ЭПР [Pelham, 2000]. 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.

3.4.1. Клонирование кДНК гена лактопероксидазы мыши (*LPO*)

Ранее было показано, что экспрессия *LPO* значительно варьирует в различных тканях млекопитающих, при этом высокое содержание мРНК *LPO* обнаруживалось в тканях слюнных желез. Этот орган был выбран для получения препарата кДНК, потенциально содержащего кДНК *LPO*. Из трех самок мышей линии DBA были взяты и объединены подчелюстные слюнные железы. Далее гуанидин изотиоционатным методом был получен препарат суммарной РНК слюнных желез. На матрице полученной суммарной РНК с помощью реакции обратной транскрипции была синтезирована одноцепочечная кДНК, при этом в качестве затравки использовали случайный гексануклеотидный праймер. После этого на матрице полученной кДНК методом ПЦР получили последовательность ДНК, содержащую полноразмерную рамку считывания, кодирующую *LPO-E*. При этом для повышения специфичности реакцию амплификации проводили в несколько этапов с использованием «вложенных» или содержащих «довески» праймеров: на первом этапе - *LPO-nest for/LPO-nest rev* и кДНК в качестве матрицы, на втором этапе – *LPO for/LPO-M rev* и очищенный ПЦР-продукт соответствующей длины, на третьем этапе – *LPO for/LPO-MER* и разведенный продукт второго раунда ПЦР. Для большей точности амплификации использовали смесь ДНК-полимераз Encyclo (Евроген), обладающую корректирующей активностью (proof-reading). Олигонуклеотиды, использованные для последнего раунда ПЦР, обладали следующими характеристиками: прямой праймер *LPO for* содержал иницирующую трансляцию ATG кодон, а также последовательность Козак, необходимую для повышения эффективности инициации трансляции белка в клетках млекопитающих; обратный праймер *LPO-MER* содержал кодон, комплементарный стоп-кодону TAA, а также последовательность, кодирующую сигнальный пептид HDEL на С-конце образующегося белка.

Полученный ПЦР-продукт клонировали в вектор pAL-TA (Евроген) в штамме DH5 α *E.coli*. Методом ПЦР с колоний были отобраны клоны, содержащие последовательность, соответствующую фрагменту *LPO-E* (при этом использовались праймеры *LPO-seq2 for/LPO-seq3 rev*, комплементарные внутренним участкам целевой последовательности). Далее были получены препараты плазмидной ДНК отобранных клонов, которые дополнительно анализировали с помощью рестрикционного и ПЦР-анализов. После этого проводили секвенирование целевой последовательности в составе плазмидной ДНК, полученной из нескольких клонов.

В результате был отобран один клон, содержащий кодирующую последовательность гена *LPO-E* в составе вектора pAL-TA (pAL-TA-*LPO-E*). По сравнению с ранее опубликованной последовательностью белка *LPO* мыши (идентификатор в GenBank -

ААН16212.1) отобранный клон кодировал белок с одной аминокислотной заменой (337-ой аспарагил на аспартил), кроме того на С-конце содержались дополнительно Мус-эпитоп (для которого имелись специфичные антитела) и сигнальная последовательность HDEL.

Структура кодируемого белка приведена на Рисунке 11.

MKVLLHLPALLASLTLLQTAASASDDPTAETDIHDTVEEVKVWVNKAFLDSRDRLKMAM
 TTKIHSTRHLSDYLKHA KGRTRTAIRSGQVWEESLKKLSQFLTNVTGQGLDLTSLWEAGC
 DPPAPTMTCNISSPYRTITGYCNRKNPALGSANRALARWLPAEYEDGLSLPYGWTPGKM
 RNGFPLPQPRESVSNQIAAYLNEEDVLDQKRSMLFMQWGQIVDHDMDFAPEMGSDTYT
 KAQCDEHCIQGDNCFPIMFPPGDPKCLKTQGKCMPPFRAGFVCPTPPYKSLAREQINALTSFL
 DASLVYSPEPSLANRLRNLSPLGLMAVNEEVSD **D**GRPFPPFVKMKPSPCEVINATAGVPCF
 LAGDSRASEQILLATSHTLFIREHNRLATELSRLNPHWDGETLYQEARKIMGAFIQITFRD
 YLPILLGDEMQKWIPPYQGYNESVDPRISNVFTFALRFHLEIPSTVSRLDENYQPWGSESE
 LPLHTVFFNTWRLVKDGGIDPLVRGLLAKNAKLMHQNKMMTGELRNKLFQPNHTIHGFD
 LASINIQRSRDHGQPGYNSWRAFCGLSQPKTLEELSAVMKNEVLAKKLM DLYGTPSNIDIW
 LGAVA EPLVHRGRVGPLLTCLLGQQFQRIRDGDRFWWENPGVFTEKQRESLQKMSFSRLV
 CDNTGIDKVPLNPFQANAYPHGFVDCSSIDKLDLSPWASVK **E****Q****K****L****I****S****E****E****D****L****A** **HDEL**

Рисунок 11. Аминокислотная последовательность полученного LPO-E. Приведена первичная структура полноразмерного белкового продукта экспрессии клонированного гена *LPO-E* (без учета пост-трансляционного созревания). Слева направо обозначены: красным цветом выделена аминокислотная замена 337-ого аспарагила (N) на аспартил (D), желтым - Мус-эпитоп (первый остаток с N-конца эпитопа (E) соответствует С-концевому остатку LPO мыши), зеленым – сигнальный пептид HDEL.

Дополнительно была получена контрольная последовательность *LPO-M*, кодирующая белок LPO-M, лишенный последовательности HDEL на С-конце (ожидалось, что данный белок будет секретироваться из клеток аналогично природному белку LPO). Для этого на матрице клонированного гена *LPO-E*, используя праймеры LPO for/LPO-M2, был проведен ПЦР, полученный продукт клонировали в вектор pAL-TA, селекцию и последующий анализ отобранных клонов проводили аналогичным образом. Последовательность полученного клона LPO-M-pAL-TA соответствовала ожидаемой.

3.4.2. Получение экспрессионных генетических конструкций, несущих гены

LPO-E и *LPO-M*

Для экспериментов с клетками млекопитающих были получены экспрессионные конструкции pCMV-LPO-E и pCMV-LPO-M, содержащие последовательность *LPO-E* или *LPO-M* под контролем сильного вирусного промотора pCMV. Фрагмент, содержащий кодирующую последовательность *LPO-E*, был вырезан по сайтам узнавания рестрикционных эндонуклеаз EcoRI из конструкции LPO-E-pAL-TA и клонирован в вектор pCMV-FCU1-pGL3, предварительно линеаризованный по таким же сайтам (таким образом был вырезан ген, кодирующий гибридный белок цитозиндезаминазу-урацилфосфорибозилтрансферазу). В результате была получена экспрессионная конструкция pCMV-LPO-E. Аналогичным образом была получена конструкция pCMV-LPO-M. Данные конструкции структурно были сходны экспрессионным конструкциям с геном *rNIS*: получены на базе вектора pGL3-BV, кроме промотора и кодирующей последовательности генов также содержали поздний сигнал полиаденилирования вируса SV40 (Simian vacuolating virus 40) и последовательность синтетического интрона из вектора pCI между промотором и геном. Схема получения и структура данных экспрессионных конструкций приведены на Рисунке 12.

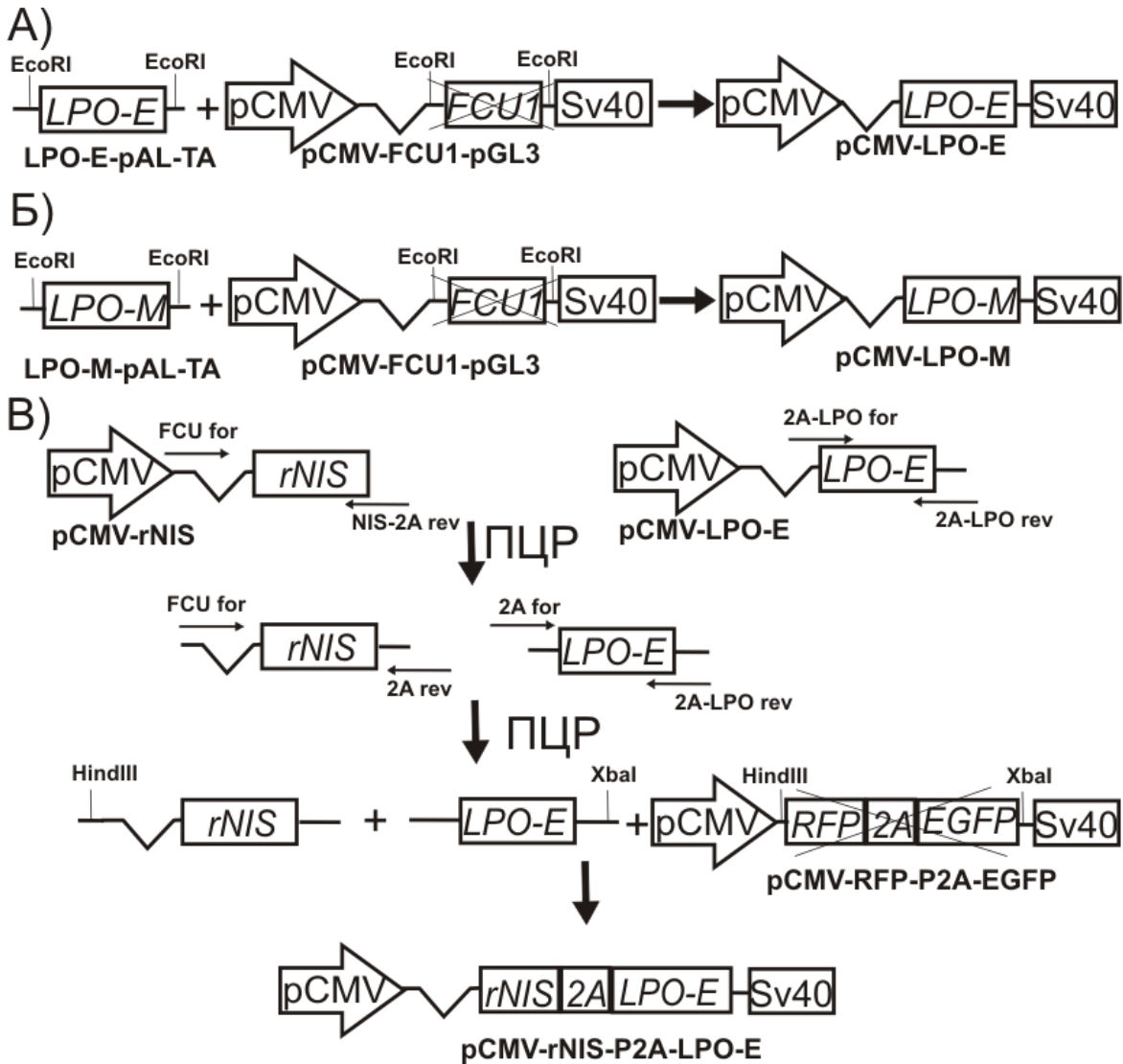


Рисунок 12. Схема получения экспрессионных конструкций с *LPO-E* (А), *LPO-M* (Б) и *rNIS-2A-LPO-E* (В). Под схемами векторных конструкций отображены их названия, на схемах указаны входящие в состав векторов элементы, а также сайты рестрикции, по которым осуществлялся гидролиз, двумя скрещенными отрезками обозначены элементы, удаленные при клонировании. Стрелкой обозначены промоторы, направляющие экспрессию репортерного гена; V-образной линией - синтетический интрон; прямоугольниками – кодирующие последовательности *LPO-E*, *LPO-M*, а также *rNIS*, *2A* и *LPO-E*, находящиеся в общей рамке считывания, сигнал полиаденилирования SV40, ген цитозиндезаминазы-урацилфосфорибозилтрансферазы (*FCU1*), последовательности *RFP*, *2A* и *EGFP*, находящиеся в общей рамке считывания. Тонкими черными стрелками обозначены олигонуклеотиды, использовавшиеся в ПЦР.

Позднее была получена экспрессионная конструкция pCMV-rNIS-2A-LPO-E, несущая под контролем pCMV гибридный ген *rNIS-2A-LPO-E*, структура и схема получения также

представлены на Рисунке 12В. Последовательность *rNIS-2A-LPO-E* представляет собой единую рамку считывания, кодирующую *rNIS*, 2A пептид из генома тешовируса свиней и модифицированный вариант лактопероксидазы (LPO-E). Трансляция на матрице мРНК с такой рамкой считывания позволяет получить два дискретных белковых продукта: *rNIS* с небольшим довеском 2A пептида и LPO-E. Такой подход в условиях транзientной трансфекции обеспечивает под контролем одного промотора одновременную продукцию обоих белков в одних и тех же клетках, что важно для функционирования предложенной системы внутриклеточного окисления захватываемого йодида. Ранее нами была разработана схема создания генетических конструкций с 2A пептидом, способных обеспечивать одновременную продукцию двух и более белковых продуктов на высоком уровне в клетках млекопитающих, в модельном эксперименте с использованием флуоресцентных белков в качестве репортеров было продемонстрирована ее высокая эффективность [Kuzmich, Vvedenskii, 2013].

Конструкцию *pCMV-rNIS-2A-LPO-E* получали следующим образом. Фрагмент, содержащий последовательность *rNIS-2A* амплифицировали в две стадии: на первом этапе проводили ПЦР на матрице плазмиды *pCMV-rNIS* с помощью праймеров FCU for/*NIS-2A* rev, на втором этапе – на матрице очищенного ПЦР-продукта с использованием праймеров FCU for/*2A* rev. Фрагмент, содержащий последовательность *2A-LPO-E* амплифицировали также в две стадии: на первом этапе проводили ПЦР на матрице плазмиды *pCMV-LPO-E* с помощью праймеров *2A-LPO* for/*2A-LPO* rev, на втором этапе – на матрице очищенного ПЦР-продукта с использованием праймеров *2A* for/*2A-LPO* rev. В обоих случаях первый раунд ПЦР проводили с помощью смеси ДНК-полимераз Encyclo, второй - с помощью полимеразы Pfu (данная полимераз не добавляет неспаренные нуклеотидные остатки на 3'-конец ПЦР-продукта). Праймеры *2A* for и *2A* rev были комплементарны последовательностям, введенным на первой стадии ПЦР, и предварительно фосфорилированы на 5'-конце с помощью полинуклеотид киназы фага T4 (Fermentas). Полученные продукты были гидролизованы по сайтам HindIII и XbaI, введенным с помощью праймеров FCU for и *2A-LPO* rev соответственно, и клонированы в вектор *pCMV-RFP-P2A-EGFP* (описан в работе [Kuzmich, Vvedenskii, 2013]), предварительно линейаризованный по таким же сайтам (таким образом был удален ген *RFP-P2A-EGFP*). Методом ПЦР с колоний были отобраны клоны, содержащие последовательность, соответствующую фрагменту *rNIS-2A-LPO-E* (при этом использовались праймеры *NIS-seq3* for/*LPO-seq1* rev, комплементарные внутренним участкам целевой последовательности). Далее были получены препараты плазмидной ДНК отобранных клонов, которые дополнительно анализировали с помощью рестрикционного и ПЦР-анализов. После этого проводили секвенирование целевой

последовательности в составе плазмидной ДНК, полученной из нескольких клонов. Отобранный клон содержал искомую последовательность без нуклеотидных замен.

3.4.3. Функциональный анализ экспрессионных конструкций с генами *LPO-E* и *LPO-M* в клетках млекопитающих

Лактопероксидаза является ферментом, катализирующим реакции окисления различных субстратов в присутствии пероксида водорода. Так как для предложенной системы внутриклеточного окисления функциональная активность этого фермента является необходимым условием, требовалось доказать, что экспрессия клонированного гена *LPO* в клетках млекопитающих приводит к образованию функциональной пероксидазы. Кроме того требовалось подтвердить, что модификация белка сигнальной последовательностью HDEL привела к нужному изменению его внутриклеточного траффика. Эти параметры были изучены в условиях транзientной трансфекции клеток линии HEK293T, характеризующихся высоким уровнем трансфекции и продукции экзогенных белков. В качестве признака продукции функциональной лактопероксидазы была измерена суммарная пероксидазная активность клеток через 48 после трансфекции исследуемыми экспрессионными конструкциями. Так как *LPO* дикого типа секретируется во внеклеточное пространство, то пероксидазная активность также была измерена в кондиционированной культуральной среде трансфицированных клеток. По соотношению пероксидазной активности в экстрактах трансфицированных клеток и в кондиционированной среде оценивали степень удержания продуцируемой *LPO* в клетках. Результаты измерения пероксидазной активности приведены на Рисунке 13.

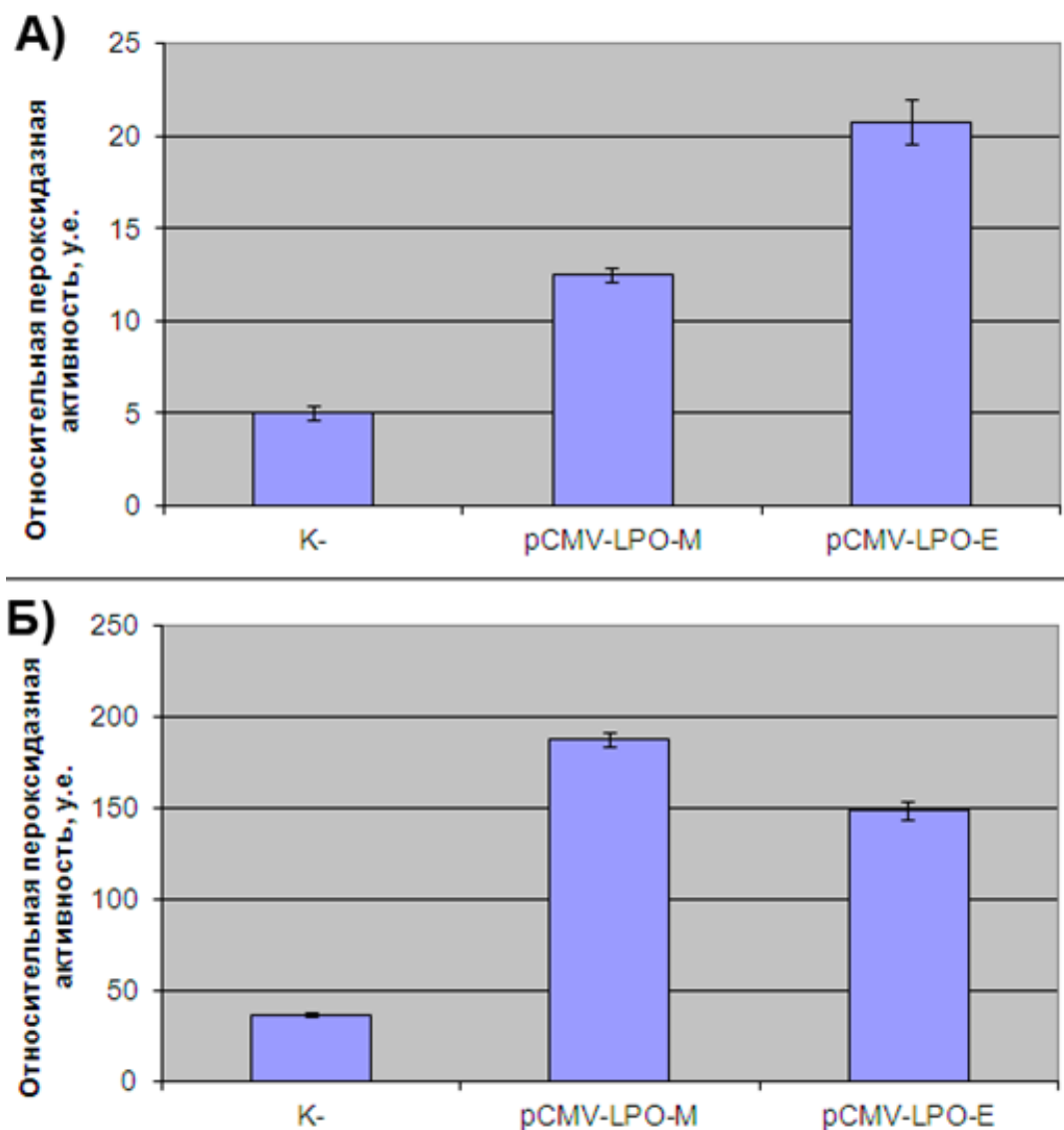


Рисунок 13. Пероксидазная активность в кондиционированных средах и экстрактах клеток линии HEK293T после трансфекции. А) и Б) – результаты измерения пероксидазной активности в клеточных экстрактах (10000 клеток) и кондиционированных средах соответственно. Генетическими конструкциями проводили липофекцию клеток HEK293T, через 48 часов собирали кондиционированные среды, а также получали экстракт клеток путем замораживания/оттаивания. В полученных образцах определяли общую пероксидазную активность по скорости окисления хромогенного субстрата ТМВ (тетраметилбензидин). Пероксидазную активность препаратов нормировали относительно скорости окисления ТМВ в присутствии PBS. Высота столбцов отражает среднюю относительную пероксидазную активность (в у.е.) образцов, полученных после двух трансфекций. Приведены стандартные отклонения (SD). Под столбцами указаны названия конструкций, использованных для трансфекции, К- соответствует нетрансфицированным клеткам.

Согласно полученным данным трансфекция клеток НЕК293Т конструкциями, содержащими последовательность *LPO-M* или *LPO-E*, приводила к значительному увеличению пероксидазной активности как в клеточных экстрактах (Рисунок 13 А) так и в кондиционированных средах (Рисунок 13 Б) по сравнению с нативными клетками. Это наблюдение свидетельствует в пользу того, что экспрессия обоих вариантов клонированного гена *LPO* в клетках млекопитающих приводит к образованию функциональной лактопероксидазы. Оба варианта гена *LPO* обеспечивали сопоставимое накопление пероксидазной активности в кондиционированных средах трансфицированных клеток (*LPO-E* обеспечивал несколько меньший уровень активности), при этом пероксидазная активность клеточных экстрактов была почти в два раза выше в случае экспрессии *LPO-E* по сравнению с *LPO-M*. По-видимому, при экзогенной экспрессии и *LPO-M* и *LPO-E* продолжали секретироваться во внеклеточное пространство (культуральную среду), но при этом значимо большая доля лактопероксидазы удерживалась внутри клеток, будучи модифицированной последовательностью HDEL (*LPO-E*). Учитывая свойства этой сигнальной последовательности, можно предположить, что такой прирост обеспечивался за счет накопления активной лактопероксидазы в ЭПР.

Таким образом, созданная экспрессионная конструкция рCMV-*LPO-E* при трансфекции клеток млекопитающих обеспечивала продукцию в них активной лактопероксидазы, при этом значительная доля этого белка удерживалась внутри клеток, предположительно в ЭПР.

Была исследована бицистронная конструкция рCMV-*rNIS-2A-LPO-E*. Так как при трансляции рамки считывания *rNIS-2A-LPO-E* образуются белковые продукты, несколько отличающиеся от *rNIS* и *LPO-E* (содержат остатки 2А-пептида на С- и N-конце соответственно), был проведен функциональный анализ конструкции рCMV-*rNIS-2A-LPO-E* в клетках млекопитающих. Для этого клетки НЕК293Т трансфицировали бицистронной конструкцией рCMV-*rNIS-2A-LPO-E*. Для сравнения клетки также трансфицировали моноцистронными конструкциями рCMV-*rNIS* или рCMV-*LPO-E*, либо контрольной плазмидой рFLAG-CMV.2 (К-). Через 72 часа после трансфекции проводили анализ активности *rNIS* методом RIUA и определение пероксидазной активности в экстрактах клеток. Результаты приведены на Рисунке 14.

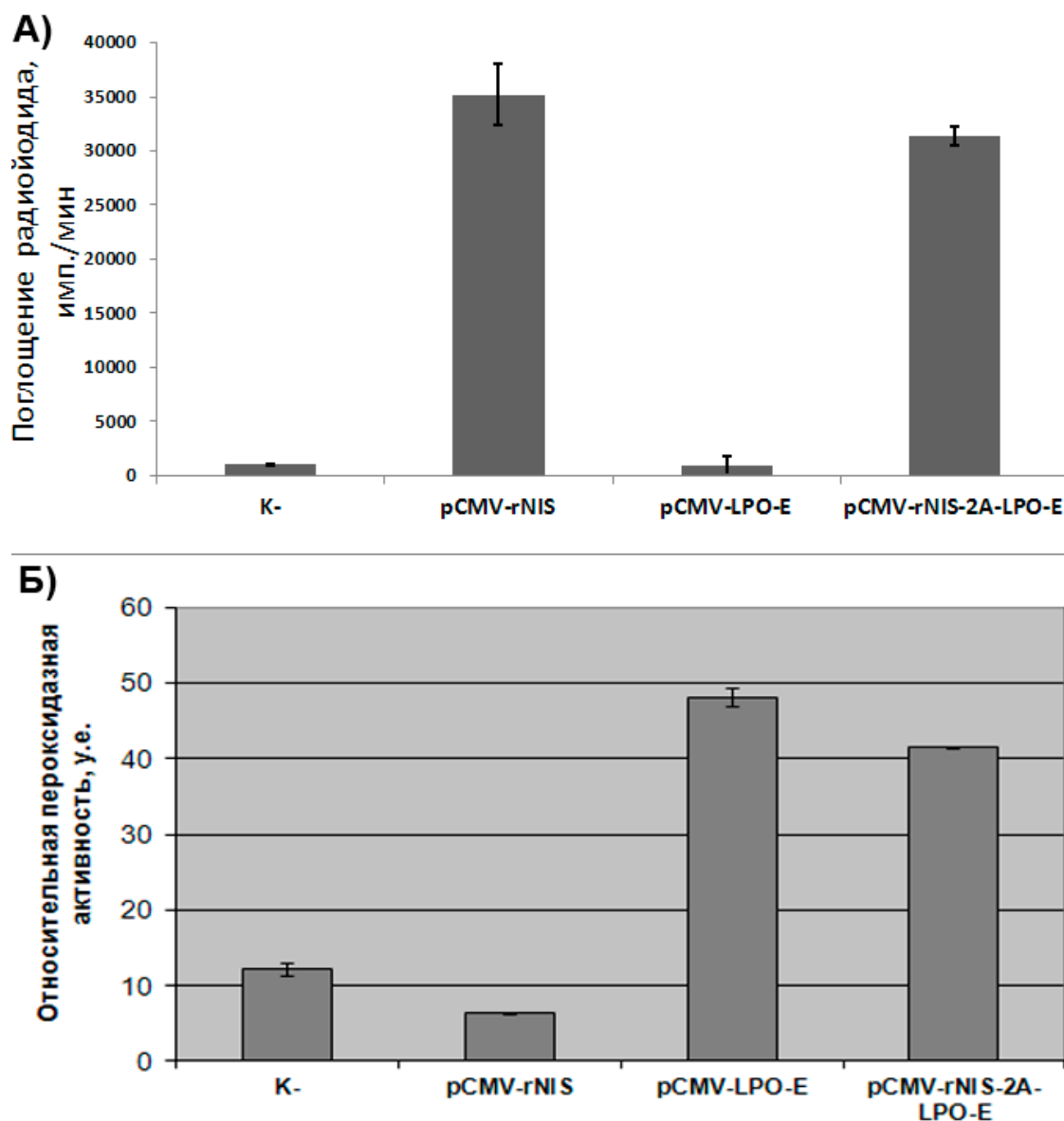


Рисунок 14. Поглощение ^{125}I (А) и пероксидазная активность (Б) в клетках НЕК293Т, транзientно-трансфицированных моно- и бицистронными конструкциями. Генетическими конструкциями проводили липофекцию клеток НЕК293Т, через 72 часа проводили измерение поглощения ^{125}I трансфицированными клетками методом RIUA, либо путем замораживания/оттаивания получали клеточный экстракт, в котором определяли общую пероксидазную активность. Peroxidase activity of reagents was normalized to the rate of oxidation of TMB in the presence of PBS. The height of the columns in histogram A reflects the average activity of ^{125}I (imp./min) in alkaline cell lysates as a minimum after two transfections, in histogram B) - average relative peroxidase activity (in u.e.) of samples obtained after two transfections. Standard deviations (SD) are given. Under the columns are indicated the names of the constructs used for transfection, K- corresponds to the construct pFLAG-CMV.2.

Согласно полученным данным трансфекция клеток НЕК293Т бицистронной конструкцией рСМV-rNIS-2A-LPO-E, содержащей последовательность *rNIS* и *LPO-E*, приводила к значительному увеличению как уровня поглощения радиойодида (Рисунок 14 А), так и пероксидазной активности в клеточных экстрактах (Рисунок 14 Б) по сравнению с контрольными клетками. При этом в обоих случаях достигнутая активность была сопоставима (хотя и несколько ниже) с той, что обеспечивалась при трансфекции соответствующей моноцистронной конструкцией (рСМV-rNIS в первом эксперименте и рСМV-LPO-E во втором). Экспрессия только лактопероксидазы LPO-E не сказывалась на уровне поглощения радиойодида трансфицированными клетками. Аналогично, экспрессия только *rNIS* не приводила к увеличению пероксидазной активности клеток по сравнению с контролем. Таким образом, можно заключить, что транзистентная трансфекция клеток линии НЕК293Т созданной бицистронной конструкцией рСМV-rNIS-2A-LPO-E приводила к продукции обоих функционально активных белков (rNIS и LPO-E) на высоком уровне.

3.4.4. Изучение диффузии ^{125}I из клеток, экспрессирующих *NIS* и *LPO-E*, в условиях *in vitro*

На последнем этапе была изучена скорость диффузии ^{125}I из клеток, трансфицированных конструкциями с *rNIS* и *LPO-E*. Для этого клетки линии НЕК293Т были транзистентно трансфицированы плазмидами рСМV-rNIS-2A-LPO-E, рСМV-rNIS, рСМV-LPO-E либо контрольной плазмидой рFLAG-CMV.2 (К-). Через 72 часа после трансфекции была изучена диффузия радиойодида из клеток (I efflux assay) аналогично тому, как это описано ранее. Полученные данные приведены на Рисунке 15.

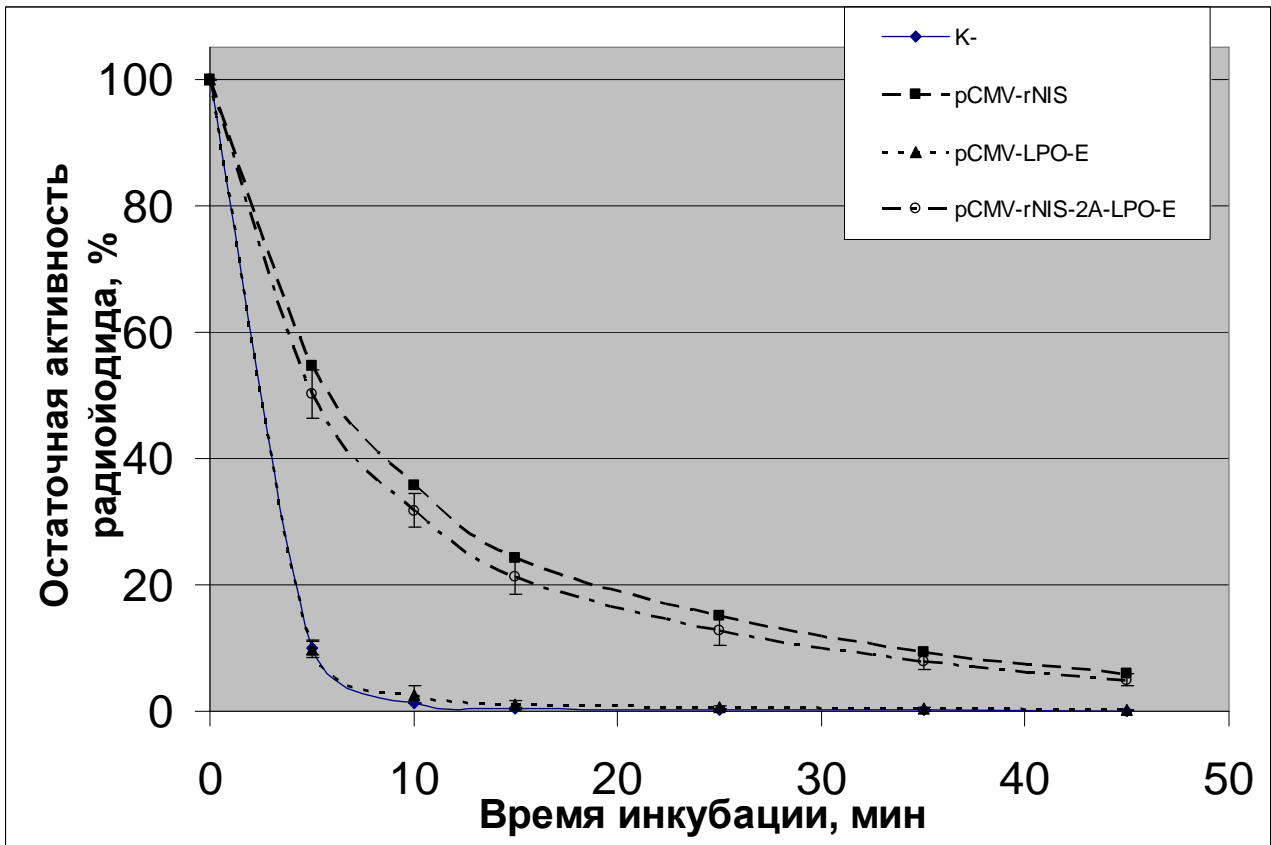


Рисунок 15. Диффузия ^{125}I из трансфицированных клеток НЕК293Т. К-, pCMV-rNIS, pCMV-LPO-E, pCMV-rNIS-2A-LPO-E – результаты для клеток, трансфицированных соответствующими конструкциями. Трансфицированные клетки инкубировали в буфере с ^{125}I в течение 1,5 часов, затем буфер удаляли, после чего проводили 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.

Согласно полученным данным клетки, трансфицированные конструкцией только с лактопероксидазой (pCMV-LPO-E), захватывали некоторое количество ^{125}I , но быстро теряли его при отмывке, что практически полностью повторяло результаты контрольного эксперимента (К-). В то же время клетки, трансфицированные конструкциями с геном *rNIS* (pCMV-rNIS и pCMV-rNIS-2A-LPO-E), при инкубации в буфере с ^{125}I захватывали значительные его количества, однако, при замене буфера на нерадиоактивный быстро теряли 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 ^{125}I из клеток, трансфицированных только *rNIS* и *rNIS* с *LPO-E* (*rNIS-2A-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 йодида в такой системе не была обнаружена. Причины отсутствия внутриклеточного окисления йодида могут быть различны. Возможно, содержание 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 должна накапливаться модифицированная лактопероксидаза. Так или иначе, предложенная система внутриклеточной органификации йодида, по-видимому, не работает либо требует серьезной доработки.

3.5. 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-позитивных клеток в условиях *in vivo*. Такую задачу значительно проще решить, 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 базе лентивирусного вектора pLVX-puro (Clontech) были получены две генно-инженерные конструкции 3ET-pMIA-rNIS-pLVX-Puro и pCMV-rNIS-pLVX-Puro, несущие экспрессионную кассету, состоящую из гена *rNIS* под контролем меланомоспецифического регуляторного элемента 3ET-pMIA либо под контролем сильного неспецифического промотора pCMV. В первой конструкции экспрессионная кассета содержала собственный синтетический интрон и сигнал полиаденилирования (Sv40), а также была «развернута» относительно лентивирусных элементов LTR для предотвращения нежелательной терминации синтеза геномной РНК лентивируса. Схема конструкций приведена на Рисунке 16А,Б.

Фрагмент, содержащий кассету 3ET-pMIA-rNIS-Sv40, был вырезан по сайтам узнавания рестрикционных эндонуклеаз ClaI из ранее полученной конструкции 3ET-pMIA-

rNIS, концы вырезанного фрагмента были достроены с помощью фрагмента Кленова, после чего он был клонирован в вектор pLVX-puro, предварительно линейаризованный по сайтам XbaI и ClaI (таким образом была удалена последовательность промотора pCMV) и также обработанный фрагментом Кленова. В результате была получена конструкция 3ET-pMIA-rNIS-pLVX-Puro.

Фрагмент, содержащий последовательность *rNIS*, был вырезан по сайтам узнавания рестрикционных эндонуклеаз XhoI и XbaI из ранее полученной конструкции pCI-rNIS и клонирован в вектор pLVX-puro, предварительно линейаризованный по тем же сайтам. В результате была получена конструкция pCMV-rNIS-pLVX-Puro. Стоит отметить, что в данной конструкции *rNIS* находилась под контролем промотора pCMV, исходно находившегося в составе вектора pLVX-puro.

На втором этапе была проведена транзientная котранфекция клеток линии HEK293T полученными конструкциями и вспомогательными плазмидами pVSV-G (Clontech) и pCMV-dR8.91, после чего были собраны супернатанты, содержащие лентивирусные частицы. Далее клетки линии МЗ инфицировали полученными лентивирусными частицами, после чего проводили отбор стабильно трансфицированных клеток в среде с пурамицином (0,4 мкг/мл). В результате были получены две клеточные линии МЗ-3ET-pMIA-rNIS и МЗ-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 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 RIUA проводили оценку способности клеток поглощать йодид-ионы из среды. Результаты приведены на Рисунке 16В.

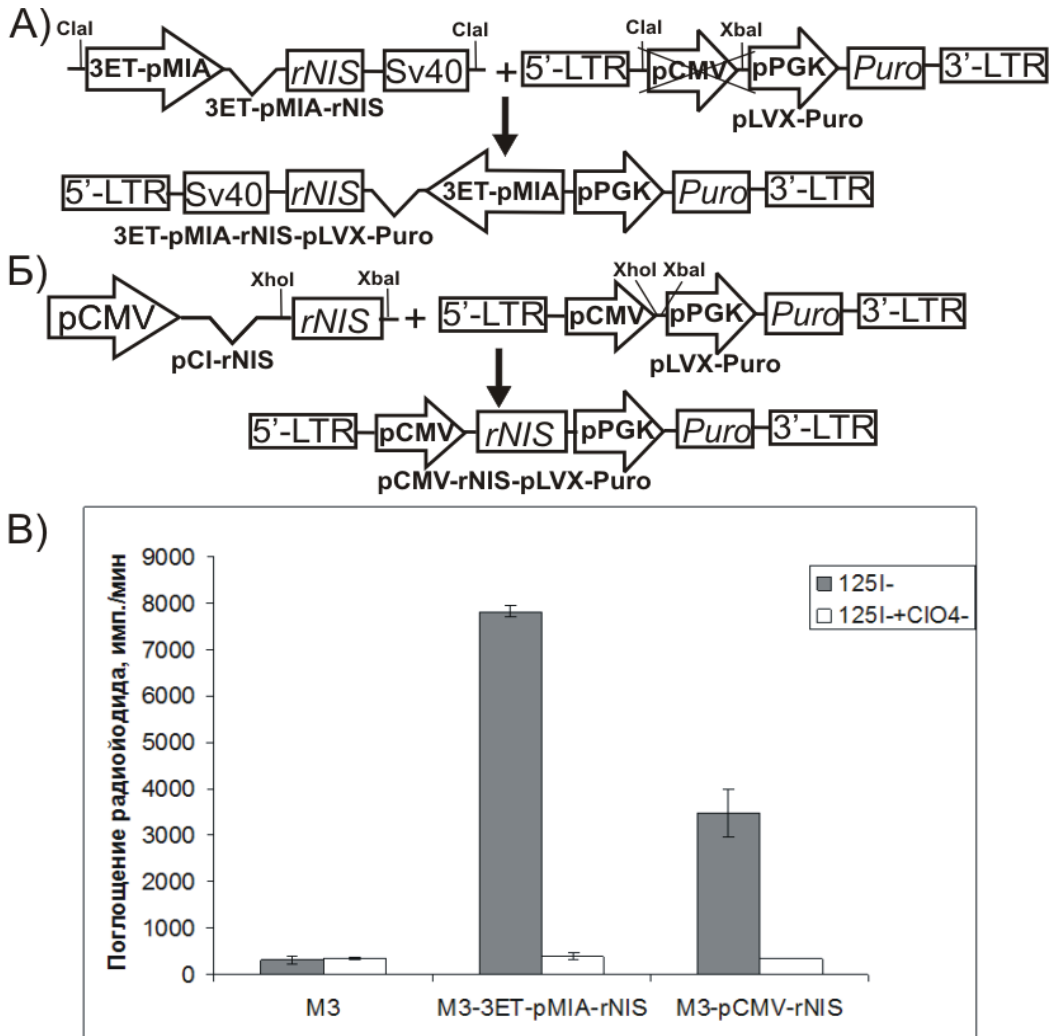


Рисунок 16. Схема получения лентивирусных векторов: А) 3ET-pMIA-rNIS-pLVX-Puro и Б) pCMV-rNIS-pLVX-Puro. Под схемами конструкций отображены их названия, на схемах указаны входящие в состав векторов элементы, а также сайты рестрикции, по которым осуществлялся гидролиз, двумя скрещенными отрезками обозначены элементы, удаленные при клонировании. Стрелкой обозначены промоторы pCMV, 3ET-pMIA и pPGK, направление стрелки соответствует направлению транскрипции; V-образной линией - синтетический интрон; прямоугольниками – LTR лентивирусного генома, кодирующая последовательность *rNIS*, сигнал полиаденилирования SV40, ген устойчивости к пуromицину *Puro*. В) 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 трансфицированные стабильно 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).

Согласно проведенному анализу, обе стабильно трансфицированные линии поглощали значительно большее количество йодид-ионов по сравнению с нативными клетками МЗ, причем поглощение ингибировалось перхлоратом натрия. Таким образом, можно заключить, что обе полученные линии продуцировали активный белок NIS. Интересно, что клетки линии МЗ-3ЕТ-рMIA-rNIS поглощали почти в два раза большее количество йодид-ионов по сравнению с клетками МЗ-рCMV-rNIS. Это неожиданно, так как экспрессионная кассета 3ЕТ-рMIA-rNIS содержит более слабый по сравнению с рCMV промотор. Такой результат может быть связан с различной архитектурой полученных лентивирусных векторов - экспрессионная кассета в 3ЕТ-рMIA-rNIS-pLVX-Puro дополнительно содержит синтетический интрон и собственный сигнал полиаденилирования, которые могут увеличивать стабильность целевого транскрипта. Также более низкая активность симпортера в МЗ-рCMV-rNIS может быть связана с подавлением вирусного промотора рCMV путем метилирования, которое может происходить при длительной культивации стабильно трансфицированных клеток (селекция полученных линий проводилась в течение нескольких недель). Ранее подобная инактивация экспрессионной кассеты рCMV-hNIS наблюдалась в линии стабильно трансфицированных нейрональных стволовых клеток [Kim и др., 2005]. В виду более высокой активности NIS для дальнейшей работы использовали линию МЗ-3ЕТ-рMIA-rNIS.

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

Полученная линия МЗ-3ЕТ-рMIA-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 ^{123}I 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 17.

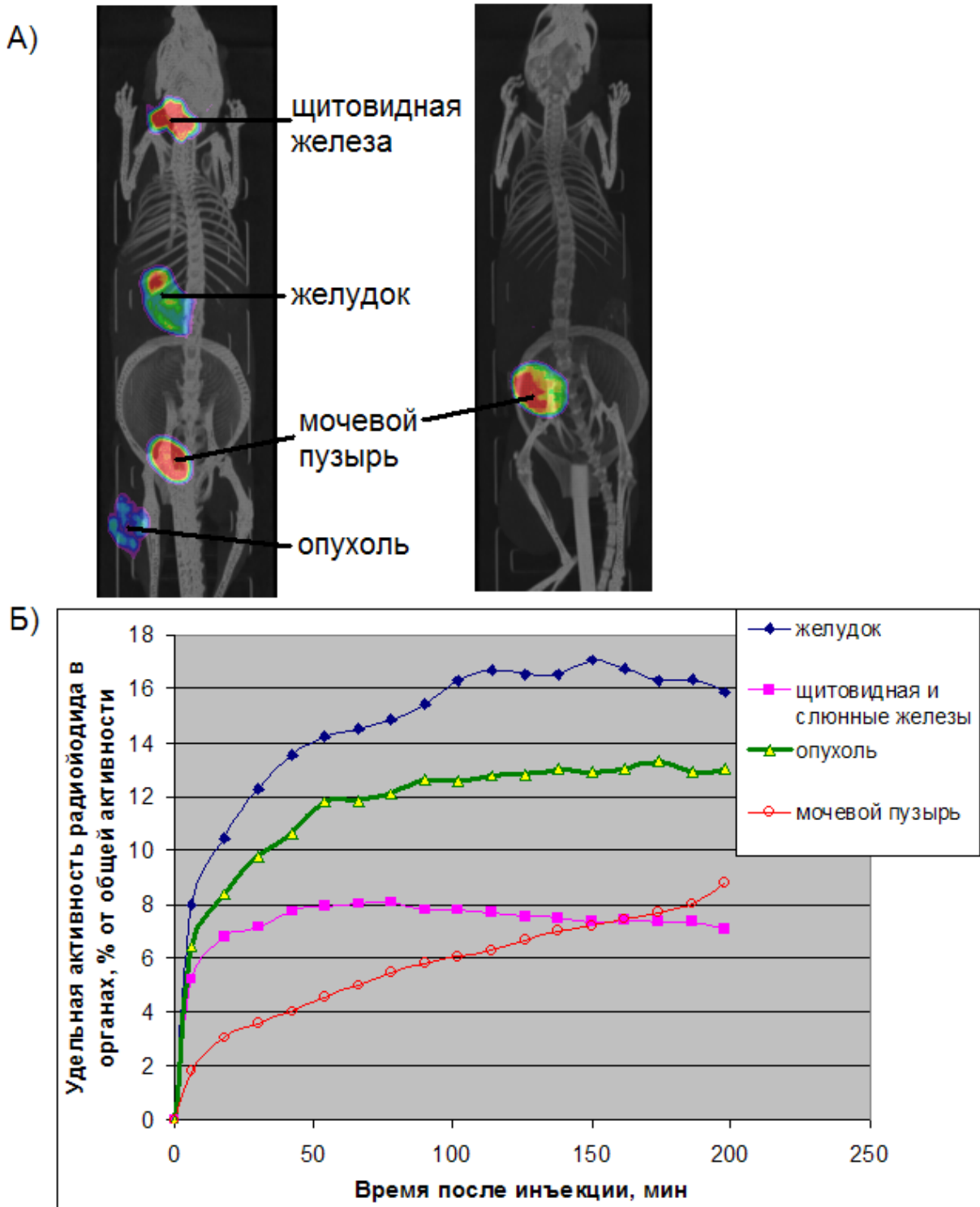


Рисунок 17. Выявление накопления ^{123}I в опухоли мышинной меланомы МЗ, стабильно экспрессирующей NIS, с помощью ОФЭКТ/КТ. А) Реконструированные 3D-проекции мышей после инъекции 18,5 МБк ^{123}I (слева), либо после инъекции радиопрепарата и перхлората натрия в качестве ингибитора NIS (справа). Б) Кинетика 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.

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 17 Б. При этом интенсивность сигнала не снижалась даже через 200 минут после инъекции, что говорит о низкой скорости выведения радиопрепарата из опухоли. Наблюдаемая картина сильно отличается 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.

3.7. 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 были выбраны 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* [Schaffert, Ogris, 2013]. Модификация полиплексов лигандами, специфичными к рецепторам, сверхэкспрессированным на поверхности целевых клеток, может улучшать селективность системной доставки, а также увеличивать захват полиплексов целевыми клетками [Ogris, Wagner, 2002]. Известно, что во многих случаях меланомы человека и мыши раковые клетки сверхэкспрессируют на поверхности меланокортиновый рецептор 1 типа (MC1R) [Salazar-Onfray и др., 2002], для которого разработан селективный пептидный лиганд MC1SP [Szardenings и др., 2000]. Ранее было показано, что в условиях *in vitro* и *in vivo* полиплексы на основе ПЭГ-ПЭИ, армированные лигандом MC1SP, обеспечивают более высокий уровень трансфекции клеток меланомы мыши М3 по сравнению с нелигандированным полиплексом [Durymanov и др., 2012], при этом в данной работе эффективность трансфекции в условиях *in vivo* оценивалась либо по содержанию целевых транскриптов в гистологических препаратах опухоли либо по величине терапевтического эффекта доставленного гена.

Мы использовали разработанную репортерную систему на основе *NIS* 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 18.

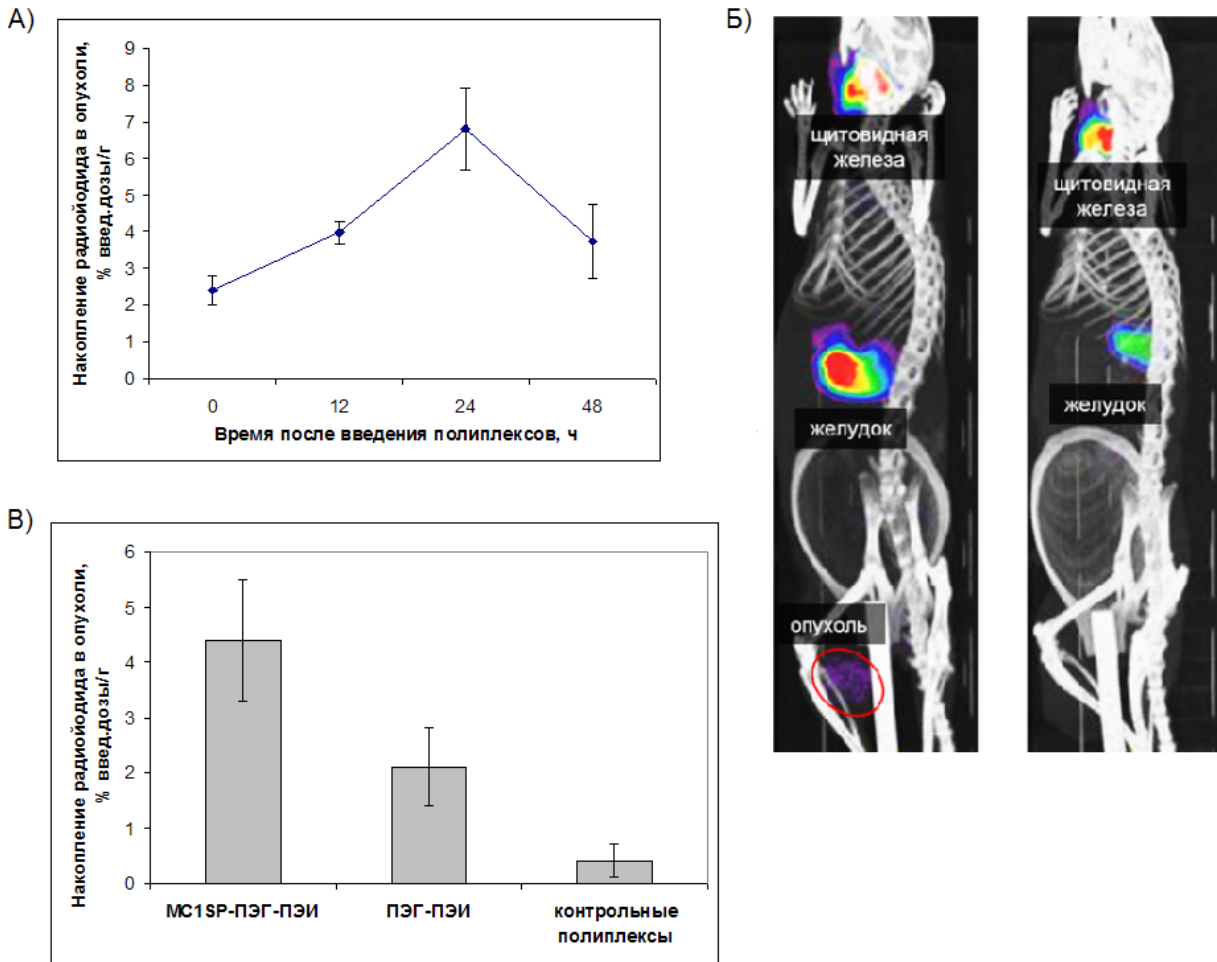


Рисунок 18. Выявление накопления ^{123}I в опухоли мышинной меланомы М3, трансфицированной полиплексами *in vivo*, с помощью ОФЭКТ/КТ. А) Кинетика изменения активности NIS в опухоли, измеренной по накоплению ^{123}I , после доставки гена *rNIS* с помощью лигандированных полиплексов (80 мкг ДНК на мышь). 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.

Согласно полученным данным максимальный уровень активности НИС в опухоли достигался через 24 часа после системного введения лигандированных полиплексов, см. Рисунок 18 А. При этом накопление радиойодида составило $6,8 \pm 1,1$ % от введенной дозы на грамм опухолевой ткани. Через 48 часов после введения полиплексов активность НИС 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 НИС (желудок и щитовидная железа) наблюдалось на более высоком уровне, см. Рисунок 18 Б. В нетрансфицированных опухолях (соответствует точке 0 ч. на Рисунке 18 А) накопление радиойодида достигало $2,4 \pm 0,4$ % от введенной дозы на грамм опухолевой ткани.

Полиплексы с MC1SP-лигандом обеспечивали почти в два раза большее накопление радиойодида в трансфицированной опухоли по сравнению с нелигандированными полиплексами, см. Рисунок 18 В. 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 [Dyumanov и др., 2012]. 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. 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 18 В). Аналогичная активность плазмиды rNIS наблюдалась при трансфекции 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». По-видимому, наблюдаемое различие 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 И ВЫВОДЫ

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 опухолью радиоiodида ($6,8 \pm 1,1$ % против $4,5 \pm 0,8$ % введённой 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 phTERT-CMVmin, 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 СОКРАЩЕНИЙ

ГТП	Генно-терапевтический препарат
КТ	Рентгеновская компьютерная томография
НИС	Натрий-йодидный симпортер
ОФЭКТ	Однофотонная эмиссионная компьютерная томография
п.н.о.	Пары нуклеотидных остатков
ПЭТ	Позитронно-эмиссионная томография
ПЭГ	Полиэтиленгликоль
ПЭИ	Полиэтиленимин
LPO	Лактопероксидаза
MC1SP	Пептид, имеющий в своем составе последовательность, связывающуюся с меланокортиновыми рецепторами первого типа, и минимальную последовательность ядерной локализации большого Т-антигена вируса SV-40
RIUA	Анализ поглощения радиоактивного йодида
TMB	Тетраметилбензидин, хромогенный субстрат пероксидаз
TPO	Тиреопероксидаза

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ahn B.-C. Sodium iodide symporter for nuclear molecular imaging and gene therapy: from bedside to bench and back. // *Theranostics*. 2012. Т. 2. № 4. С. 392–402.
2. Ahn B.-C. Requisites for successful theranostics with radionuclide-based reporter gene imaging. // *J. Drug Target*. 2014.
3. Alauddin M.M., Gelovani J.G. Radiolabeled nucleoside analogues for PET imaging of HSV1-tk gene expression. // *Curr. Top. Med. Chem.* 2010. Т. 10. № 16. С. 1617–1632.
4. Altorjay A. и др. Expression of the Na⁺/I⁻ symporter (NIS) is markedly decreased or absent in gastric cancer and intestinal metaplastic mucosa of Barrett esophagus. // *BMC Cancer*. 2007. Т. 7. № 1. С. 5.
5. Barton K.N. и др. GENIS: Gene expression of sodium iodide symporter for noninvasive imaging of gene therapy vectors and quantification of gene expression in vivo // *Mol. Ther.* 2003. Т. 8. № 3. С. 508–518.
6. Barton K.N. и др. Feasibility of adenovirus-mediated hNIS gene transfer and ¹³¹I radioiodine therapy as a definitive treatment for localized prostate cancer. // *Mol. Ther.* 2011. Т. 19. № 7. С. 1353–1359.
7. Baumann E. Uber das Thyrojodin // *Munchener medizinische Wochenschrift*. 1896. № 43. С. 309–312.
8. Blow N. In vivo molecular imaging: the inside job // *Nat. Methods*. 2009. Т. 6. № 6. С. 465–469.
9. Boland A и др. Adenovirus-mediated transfer of the thyroid sodium/iodide symporter gene into tumors for a targeted radiotherapy. // *Cancer Res*. 2000. Т. 60. № 13. С. 3484–92.
10. Boland A. и др. Transposition of the thyroid iodide uptake and organification system in nonthyroid tumor cells by adenoviral vector-mediated gene transfers. // *Thyroid*. 2002. Т. 12. № 1. С. 19–26.
11. Bonnema S.J., Hegedüs L. Radioiodine therapy in benign thyroid diseases: Effects, side effects, and factors affecting therapeutic outcome // *Endocr. Rev.* 2012. Т. 33. № 6. С. 920–980.
12. Boron W.F., Boulpaep E.L. *Medical Physiology: A Cellular and Molecular Approach*. W.B. Saunders, 2003.
13. Bosch E.H., Doorne H. Van, Vries S. De. The lactoperoxidase system: The influence of iodide and the chemical and antimicrobial stability over the period of about 18 months // *J. Appl.*

Microbiol. 2000. T. 89. № 2. C. 215–224.

14. Brader P., Serganova I., Blasberg R.G. Noninvasive molecular imaging using reporter genes. // J. Nucl. Med. 2013. T. 54. № 2. C. 167–72.

15. Brown-Grant K. Extrathyroidal Iodide Concentrating Mechanisms // *Physiol Rev.* 1961. T. 41. № 1. C. 189–213.

16. Caillou B. и др. Na⁺/I⁻ symporter distribution in human thyroid tissues: An immunohistochemical study // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1998. T. 83. № 11. C. 4102–4106.

17. Carrasco N. Iodide transport in the thyroid gland // *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr.* 1993. T. 1154. № 1. C. 65–82.

18. Cho J.Y. и др. Hormonal regulation of radioiodide uptake activity and Na⁺/I⁻ symporter expression in mammary glands // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2000. T. 85. № 8. C. 2936–2943.

19. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. // *Anal. Biochem.* 1987. T. 162. № 1. C. 156–9.

20. Chung J.-K. Sodium iodide symporter: its role in nuclear medicine. // *J. Nucl. Med.* 2002. T. 43. № 9. C. 1188–200.

21. Dai G., Levy O., Carrasco N. Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. // *Nature.* 1996. T. 379. № 6564. C. 458–460.

22. Dingli D. и др. Image-guided radiovirotherapy for multiple myeloma using a recombinant measles virus expressing the thyroidal sodium iodide symporter // *Blood.* 2004. T. 103. № 5. C. 1641–1646.

23. Dohán O. и др. The Sodium/Iodide Symporter (NIS): Characterization, Regulation, and Medical Significance // *Endocr. Rev.* 2003. T. 24. № 1. C. 48–77.

24. Durante C. и др. Long-term outcome of 444 patients with distant metastases from papillary and follicular thyroid carcinoma: Benefits and limits of radioiodine therapy // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2006. T. 91. № 8. C. 2892–2899.

25. Durymanov M.O. и др. Subcellular trafficking and transfection efficacy of polyethylenimine–polyethylene glycol polyplex nanoparticles with a ligand to melanocortin receptor-1 // *J. Control. Release.* 2012. T. 163. № 2. C. 211–219.

26. Dwyer R.M. и др. Adenovirus-mediated and targeted expression of the sodium-iodide

- symporter permits in vivo radioiodide imaging and therapy of pancreatic tumors. // *Hum. Gene Ther.* 2006a. Т. 17. № 6. С. 661–668.
27. Dwyer R.M. и др. Sodium iodide symporter-mediated radioiodide imaging and therapy of ovarian tumor xenografts in mice. // *Gene Ther.* 2006b. Т. 13. № 1. С. 60–66.
28. Eskandari S. и др. Thyroid Na⁺/I⁻ - symporter. Mechanism, stoichiometry, and specificity // *J. Biol. Chem.* 1997. Т. 272. № 43. С. 27230–27238.
29. Faivre J. и др. Long-term radioiodine retention and regression of liver cancer after sodium iodide symporter gene transfer in wistar rats. // *Cancer Res.* 2004. Т. 64. № 21. С. 8045–51.
30. Filetti S. и др. Sodium/iodide symporter: A key transport system in thyroid cancer cell metabolism // *Eur. J. Endocrinol.* 1999. Т. 141. № 5. С. 443–457.
31. Fomchenko E.I., Holland E.C. Mouse models of brain tumors and their applications in preclinical trials // *Clin. Cancer Res.* 2006. Т. 12. № 18. С. 5288–5297.
32. Heltemes L.M. и др. The rat sodium iodide symporter gene permits more effective radioisotope concentration than the human sodium iodide symporter gene in human and rodent cancer cells. // *Cancer Gene Ther.* 2003. Т. 10. № 1. С. 14–22.
33. Hingorani M. и др. The biology of the sodium iodide symporter and its potential for targeted gene delivery. // *Curr. Cancer Drug Targets.* 2010. Т. 10. № 2. С. 242–267.
34. Huang M. и др. Ectopic expression of the thyroperoxidase gene augments radioiodide uptake and retention mediated by the sodium iodide symporter in non-small cell lung cancer. // *Cancer Gene Ther.* 2001. Т. 8. № 8. С. 612–618.
35. Huang R. и др. Targeting of tumor radioiodine therapy by expression of the sodium iodide symporter under control of the survivin promoter. // *Cancer Gene Ther.* 2011. Т. 18. № 2. С. 144–52.
36. Josefsson M. и др. Sodium/iodide-symporter: Distribution in different mammals and role in entero-thyroid circulation of iodide // *Acta Physiol. Scand.* 2002. Т. 175. № 2. С. 129–137.
37. Kakinuma H. и др. Probasin Promoter (ARR2PB)-Driven, Prostate-Specific Expression of the Human Sodium Iodide Symporter (h-NIS) for Targeted Radioiodine Therapy of Prostate Cancer // *Cancer Res.* 2003. Т. 63. № 22. С. 7840–7844.
38. Kim Y.H. и др. Reversing the silencing of reporter sodium/iodide symporter transgene for stem cell tracking. // *J. Nucl. Med.* 2005. Т. 46. № 2. С. 305–311.

39. Kim Y.-H. и др. Codon-optimized Human Sodium Iodide Symporter (opt-hNIS) as a Sensitive Reporter and Efficient Therapeutic Gene // *Theranostics*. 2015. Т. 5. № 1. С. 86–96.
40. Klutz K. и др. Targeted Radioiodine Therapy of Neuroblastoma Tumors following Systemic Nonviral Delivery of the Sodium Iodide Symporter Gene // *Clin. Cancer Res.* 2009. Т. 15. № 19. С. 6079–6086.
41. Klutz K. и др. Image-Guided Tumor-Selective Radioiodine Therapy of Liver Cancer After Systemic Nonviral Delivery of the Sodium Iodide Symporter Gene // *Hum. Gene Ther.* 2011a. Т. 22. № 12. С. 1563–1574.
42. Klutz K. и др. Epidermal Growth Factor Receptor-targeted (¹³¹I)-therapy of Liver Cancer Following Systemic Delivery of the Sodium Iodide Symporter Gene. // *Mol. Ther.* 2011b.
43. Kummer C. и др. Multitracer positron emission tomographic imaging of exogenous gene expression mediated by a universal herpes simplex virus 1 amplicon vector // *Mol. Imaging*. 2007. Т. 6. № 3. С. 181–192.
44. Kuzmich A., Vvedenskii A. Quantitative comparison of gene co-expression in a bicistronic vector harboring IRES or coding sequence of porcine teschovirus 2A peptide // *Russ. J.* 2013. Т. 39. № 4. С. 406–416.
45. La Vieja A. De и др. Molecular analysis of the sodium/iodide symporter: impact on thyroid and extrathyroid pathophysiology. // *Physiol. Rev.* 2000. Т. 80. № 3. С. 1083–1105.
46. Lee S.W., Lee S.H., Biswal S. Magnetic resonance reporter gene imaging // *Theranostics*. 2012. Т. 2. № 4. С. 403–412.
47. Levy O. и др. N-linked glycosylation of the thyroid Na⁺/I⁻ symporter (NIS). Implications for its secondary structure model // *J. Biol. Chem.* 1998. Т. 273. № 35. С. 22657–22663.
48. Li W. и др. Cotransfected sodium iodide symporter and human tyroperoxidase genes following human telomerase reverse transcriptase promoter for targeted radioiodine therapy of malignant glioma cells. // *Cancer Biother. Radiopharm.* 2011. Т. 26. № 4. С. 443–451.
49. MacLaren D.C. и др. Repetitive, non-invasive imaging of the dopamine D2 receptor as a reporter gene in living animals. // *Gene Ther.* 1999. Т. 6. № 5. С. 785–791.
50. Majerus P.M., Courtois P.A. Susceptibility of *Candida albicans* to peroxidase-catalyzed oxidation products of thiocyanate, iodide and bromide. // *J. Biol. Buccale.* 1992. Т. 20. № 4. С. 241–245.

51. Malinouski M. и др. Hydrogen Peroxide Probes Directed to Different Cellular Compartments // PLoS One. 2011. Т. 6. № 1. С. e14564.
52. Mandell R.B., Mandell L.Z., Link C.J. Radioisotope concentrator gene therapy using the sodium/iodide symporter gene // Cancer Res. 1999. Т. 59. № 3. С. 661–668.
53. Marchalonis J.J. An enzymic method for the trace iodination of immunoglobulins and other proteins. // Biochem. J. 1969. Т. 113. № 2. С. 299–305.
54. Mazzaferri E.L. Thyroid remnant ¹³¹I ablation for papillary and follicular thyroid carcinoma. // Thyroid. 1997. Т. 7. № 2. С. 265–271.
55. Miletic H. и др. Bystander killing of malignant glioma by bone marrow-derived tumor-infiltrating progenitor cells expressing a suicide gene. // Mol. Ther. 2007. Т. 15. № 7. С. 1373–1381.
56. Miller J.K., Swanson E.W., Spalding G.E. Iodine absorption, excretion, recycling, and tissue distribution in the dairy cow. // J. Dairy Sci. 1975. Т. 58. № 10. С. 1578–1593.
57. Mitrofanova E. и др. Rat sodium iodide symporter for radioiodide therapy of cancer. // Clin. Cancer Res. 2004. Т. 10. № 20. С. 6969–76.
58. Mitrofanova E. и др. Rat sodium iodide symporter allows using lower dose of ¹³¹I for cancer therapy. // Gene Ther. 2006. Т. 13. № 13. С. 1052–6.
59. Nguyen J., Szoka F.C. Nucleic acid delivery: the missing pieces of the puzzle? // Acc. Chem. Res. 2012. Т. 45. № 7. С. 1153–62.
60. Nicola J.P. и др. The Na⁺/I⁻ symporter mediates active iodide uptake in the intestine. // Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2009. Т. 296. № 4. С. C654–C662.
61. Ogris M., Wagner E. Tumor-targeted gene transfer with DNA polyplexes. // Somat. Cell Mol. Genet. 2002. Т. 27. № 1-6. С. 85–95.
62. Pelham H.R. Using sorting signals to retain proteins in endoplasmic reticulum. // Methods Enzymol. 2000. Т. 327. № 1990. С. 279–83.
63. Petrich T. и др. Establishment of radioactive astatine and iodine uptake in cancer cell lines expressing the human sodium/iodide symporter // Eur. J. Nucl. Med. 2002. Т. 29. № 7. С. 842–854.
64. Petrich T. и др. Effective cancer therapy with the alpha-particle emitter [²¹¹At]astatine in a mouse model of genetically modified sodium/iodide symporter-expressing tumors. // Clin. Cancer

Res. 2006. T. 12. № 4. С. 1342–8.

65. Pinke L.A. и др. Cloning of the mouse sodium iodide symporter. // *Thyroid*. 2001. T. 11. № 10. С. 935–939.

66. Portulano C., Paroder-Belenitsky M., Carrasco N. The Na + /I – Symporter (NIS): Mechanism and Medical Impact // *Endocr. Rev.* 2014. T. 35. № 1. С. 106–149.

67. R. Penheiter A., J. Russell S., K. Carlson S. The Sodium Iodide Symporter (NIS) as an Imaging Reporter for Gene, Viral, and Cell-based Therapies // *Curr. Gene Ther.* 2012. T. 12. № 1. С. 33–47.

68. Riesco-Eizaguirre G. и др. Telomerase-driven expression of the sodium iodide symporter (NIS) for in vivo radioiodide treatment of cancer: a new broad-spectrum NIS-mediated antitumor approach. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2011. T. 96. № 9. С. E1435–43.

69. Riesco-Eizaguirre G., Santisteban P. A perspective view of sodium iodide symporter research and its clinical implications. // *Eur. J. Endocrinol.* 2006. T. 155. № 4. С. 495–512.

70. Riggs D.S. Quantitative aspects of iodine metabolism in man. // *Pharmacol. Rev.* 1952. T. 4. № 3. С. 284–370.

71. Rogers B.E. и др. In vivo localization of [¹¹¹In]-DTPA-D-Phe1-octreotide to human ovarian tumor xenografts induced to express the somatostatin receptor subtype 2 using an adenoviral vector // *Clin. Cancer Res.* 1999. T. 5. № 2. С. 383–393.

72. Russell S.J. и др. Remission of disseminated cancer after systemic oncolytic virotherapy // *Mayo Clin. Proc.* 2014. T. 89. № 7. С. 926–933.

73. Salazar-Onfray F. и др. Tissue distribution and differential expression of melanocortin 1 receptor, a malignant melanoma marker // *Br. J. Cancer.* 2002. T. 87. № 4. С. 414–422.

74. Sambrook J., W Russell D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* // Cold Spring Harb. Lab. Press. Cold Spring Harb. NY. 2001. С. 999.

75. Schaffert D., Ogris M. Nucleic Acid Carrier Systems Based on Polyethylenimine Conjugates for the Treatment of Metastatic Tumors // *Curr. Med. Chem.* 2013. T. 20. № 28. С. 3456–3470.

76. Schipper M.L. и др. Radioiodide treatment after sodium iodide symporter gene transfer is a highly effective therapy in neuroendocrine tumor cells // *Cancer Res.* 2003. T. 63. № 6. С. 1333–1338.

77. Semba R.D., Delange F. Iodine in human milk: perspectives for infant health. // *Nutr. Rev.*

2001. Т. 59. № 8 Pt 1. С. 269–278.

78. Shimura H. и др. Iodide uptake and experimental ^{131}I therapy in transplanted undifferentiated thyroid cancer cells expressing the Na^+/I^- symporter gene. // *Endocrinology*. 1997. Т. 138. № 10. С. 4493–6.

79. Smanik P.A. и др. Cloning of the human sodium iodide symporter. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996. Т. 226. № 2. С. 339–345.

80. Spitzweg C. и др. Prostate-specific antigen (PSA) promoter-driven androgen-inducible expression of sodium iodide symporter in prostate cancer cell lines // *Cancer Res*. 1999. Т. 59. № 9. С. 2136–2141.

81. Sverdlov E.D. Not gene therapy, but genetic surgery—the right strategy to attack cancer // *Mol. Genet. Microbiol. Virol.* 2009. Т. 24. № 3. С. 93–113.

82. Szardenings M. и др. New highly specific agonistic peptides for human melanocortin MC(1) receptor. // *Peptides*. 2000. Т. 21. № 2. С. 239–43.

83. Tan J., Li W., Wang P. Telomerase reverse transcriptase promoter-driven expression of iodine pump genes for targeted radioiodine therapy of malignant glioma cells // *Chin. J. Cancer*. 2011. Т. 30. № 8. С. 574–580.

84. TAUROG A., DORRIS M.L., LAMAS L. Comparison of Lactoperoxidase- and Thyroid Peroxidase-Catalyzed Iodination and Coupling* // *Endocrinology*. 1974. Т. 94. № 5. С. 1286–1294.

85. Tazebay U.H. и др. The mammary gland iodide transporter is expressed during lactation and in breast cancer. // *Nat. Med.* 2000. Т. 6. № 8. С. 871–878.

86. Vadysirisack D.D., Shen D.H., Jhiang S.M. Correlation of Na^+/I^- symporter expression and activity: implications of Na^+/I^- symporter as an imaging reporter gene. // *J. Nucl. Med.* 2006. Т. 47. № 1. С. 182–90.

87. Vandsburger M.H. и др. MRI Reporter Genes: Applications For Imaging Of Cell Survival, Proliferation, Migration and Differentiation // *NMR Biomed.* 2013. Т. 26. № 7. С. 872–884.

88. Waerzeggers Y. и др. Methods to monitor gene therapy with molecular imaging // *Methods*. 2009. Т. 48. № 2. С. 146–160.

89. Weiss S.J., Philp N.J., Grollman E.F. Iodide Transport in a Continuous Line of Cultured Cells from Rat Thyroid // *Endocrinology*. 1984. Т. 114. № 4. С. 1090–1098.

90. Weissleder R. A clearer vision for in vivo imaging. // Nat. Biotechnol. 2001. T. 19. № 4. С. 316–7.
91. Wenzel A. и др. Iodination of proteins in TPO transfected thyroid cancer cells is independent of NIS. // Mol. Cell. Endocrinol. 2003. Т. 213. № 1. С. 99–108.
92. Willhauck M.J. и др. Application of 188rhenium as an alternative radionuclide for treatment of prostate cancer after tumor-specific sodium iodide symporter gene expression. // J. Clin. Endocrinol. Metab. 2007. Т. 92. № 11. С. 4451–8.
93. Woodrum D.T., Gauger P.G. Role of 131I in the treatment of well differentiated thyroid cancer // J. Surg. Oncol. 2005. Т. 89. № 3. С. 114–121.
94. Youn H., Chung J.K. Reporter gene imaging // Am. J. Roentgenol. 2013. Т. 201. № 2. С. 206–214.