

Учреждение Российской академии наук
Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова

На правах рукописи

Кузьмин Денис Владимирович

**ИССЛЕДОВАНИЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА СОВМЕСТНОЙ
ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ЦИТОЗИНДЕЗАМИНАЗЫ И
УРАЦИЛФОСФОРИБОЗИЛТРАНСФЕРАЗЫ В ОПУХОЛЯХ**

03.01.03 – Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
к. б. н., с.н.с., Виноградова Т.В.

Москва 2011

Работа выполнена в лаборатории структуры и функций генов человека Учреждения Российской академии наук Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова.

Научный руководитель:

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Т.В. Виноградова

Официальные оппоненты:

Лебедев Ю.Б., доктор биологических наук, Учреждение Российской академии наук Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.

Эльдаров М.А., кандидат биологических наук, Учреждение Российской академии наук Центр "Биоинженерия" РАН.

Ведущая организация:

Учреждение Российской академии наук Институт биологии гена РАН.

Защита состоится «30» ноября 2011 г. в «...» часов на заседании Специализированного Совета Д002.019.01 при Учреждении Российской академии наук Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова по адресу: 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая 16/10.

С текстом диссертации можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук, Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова.

Автореферат разослан «28» октября 2011 г.

Ученый секретарь Специализированного Совета,

доктор физ.-мат. наук



В.А. Олейников

ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

По прогнозам ВОЗ заболеваемость и смертность, обусловленные онкологическими заболеваниями, во всем мире возрастет в 2 раза за период с 1999 года по 2020 год: с 10 до 20 млн. новых случаев и с 6 до 12 млн. регистрируемых смертей. В России онкологические заболевания уносят более 250 000 тысяч человек в год, рак диагностируется более чем у 500 000 ее граждан ежегодно. Несмотря на развитие и совершенствование традиционных подходов к лечению онкологических заболеваний, проблема лечения большинства форм рака остается чрезвычайно актуальной и весьма далекой от решения.

Одним из наиболее перспективных подходов к лечению онкологических заболеваний является генотерапия, которая основывается на введении терапевтических генно-инженерных конструкций в опухолевые клетки человека. Генотерапия объединяет в себе два различных терапевтических подхода: таргетную генотерапию и генную хирургию. Под таргетной генотерапией подразумевается введение генетического материала, продукт экспрессии которого приводит к устранению одной или нескольких «молекулярных причин», приведших к превращению нормальной клетки в опухолевую, например, супрессия активированных онкогенов, восстановление функциональной активности генов-супрессоров опухоли, индукция апоптоза в раковых клетках. В силу высокой специфичности таргетных генотерапевтических препаратов их воздействие всегда будет ограничено определенным типом опухоли, внутриопухолевой гетерогенностью клеток и индивидуальными генетическими особенностями пациента.

В случае генной хирургии продукт экспрессии доставляемого в клетку генетического материала прямо или опосредовано приводит к гибели всех опухолевых клеток, независимо от их индивидуальных особенностей, так как действие генной хирургии направлено на некоторое свойство, общее для всех раковых клеток: высокий митотический потенциал, активный ангиогенез и др.

Генная хирургия включает два независимых подхода: терапия онколитическими вирусами и терапия генами суицидального воздействия. Среди генов суицидального воздействия наиболее перспективными с точки зрения противоопухолевой терапии являются гены, продукты экспрессии которых способны конвертировать нетоксичное пролекарство в токсичный для раковой клетки метаболит. Использование таких генов лежит в основе генетически направленной фермент/пролекарство терапии (GDEPT, Gene-Directed Enzyme Prodrug) опухолей. Наиболее перспективными являются системы GDEPT, основанные на введении в опухолевые клетки гена, превращающего внутри них нетоксичное пролекарство в токсичный агент, способный диффундировать в соседние клетки, убивая их при условии, что

они быстро реплицируются. Это явление получило название «эффект свидетеля» («bystander effect»). Для некоторых систем GDEPT, обладающих «эффектом свидетеля», было показано, что достаточно трансфицировать 10% клеток, чтобы вызвать полную резорбцию опухоли.

Среди множества созданных на сегодняшний день систем GDEPT одной из наиболее перспективных является система с использованием цитозиндезаминазы (*FCY1*) совместно с 5-фторцитозином (5-FC). Было показано, что FCY1 способен катализировать реакцию дезаминирования 5-FC, в результате которой образуется токсичное соединение 5-фторурацил (5-FU) (Erbs, Regulier et al. 2000). 5-FU ингибирует процесс деления клеток, препятствуя синтезу ДНК и сплайсингу РНК, и является стандартным антиметаболитом для химиотерапии широкого спектра опухолей. Использование системы *FCY1/5-FC* позволит существенно снизить побочную токсичность 5-FU, так как образование и накопление антиметаболита происходит строго внутри опухолевых клеток.

С терапевтической точки зрения преимуществом системы *FCY1/5-FC* является то, что «эффект свидетеля» не зависит от наличия межклеточных контактов (Dachs, Hunt et al. 2009) и действие системы *FCY1/5-FC* направлено как против делящихся, так и неделящихся опухолевых клеток.

Выполнение настоящей работы было стимулировано необходимостью в создании эффективной GDEPT системы для дальнейшего внедрения в клинику. Были созданы и охарактеризованы по цитотоксическому эффекту системы *FCY1/5-FC* для уничтожения клеток злокачественной меланомы и герминогенного рака яичек человека, а также система, которая может работать в широком спектре опухолевых клеток. Было показано, что 5% клеток, экспрессирующих суицидальный ген, достаточно, чтобы вызывать гибель более 80% клеток опухоли.

Таким образом, высокий терапевтический потенциал созданных GDEPT систем на основе *FCY1/5-FC* позволяет надеяться на использование их в медицинской практике.

Цель работы

Целью диссертационной работы было создание генно-инженерных конструкций, несущих гибридный ген *FCUI*, состоящий из генов цитозиндезаминазы и урацилфосфорибозилтрансферазы дрожжей, под контролем различных опухолеспецифических промоторов, и исследование цитотоксического эффекта созданных экспрессионных конструкций на опухолевые клетки разного происхождения.

В ходе работы были решены следующие задачи:

1. Были созданы экспрессионные конструкции, содержащие гибридный ген цитозиндезаминазы/урацилфосфорибозилтрансферазы (*FCUI*) под контролем различных

промоторов: промотора цитомегаловируса (CMV), промотора гена *BIRC5*, промотора гена *NDUFV1*, промоторов гена *MIA* человека и гена тирозиназы (*Tyr*) мыши.

2. Проведена оценка эффективности и специфичности цитотоксического действия экспрессионных конструкций, содержащих ген *FCUI* под контролем различных опухолеспецифичных промоторов, в присутствии 5-FC на опухолевые клетки.

3. Создана модифицированная система Cre-LoxP для усиления цитотоксического эффекта экспрессионных конструкций, несущих суицидальный ген *FCUI*.

4. В экспериментах *in vitro* была проведена оценка «эффекта свидетеля» в системе *FCUI/5-FC*.

Научная новизна и практическая значимость работы

Работа была выполнена в рамках НИР «Разработка терапевтических противоопухолевых средств на основе генно-терапевтического подхода».

Настоящая работа была направлена на создание GDEPT системы на основе гибридного гена *FCUI* с перспективой её использования в качестве основы для генно-терапевтических противораковых препаратов нового поколения, что и определяет практическую значимость работы.

Были создана GDEPT система, позволяющая направленно уничтожать опухолевые клетки меланомы. Был охарактеризован не описанный ранее регуляторный элемент, высоко активный в клетках герминогенного рака яичка и с его использованием создана GDEPT система, позволяющая направленно уничтожать клетки герминогенного рака яичек. Продемонстрирован высокий цитотоксический эффект созданных систем.

Также на основе гибридного гена *FCUI* и промотора гена *BIRC5* была создана GDEPT система, работающая в широком спектре опухолей. Впервые был исследован цитотоксический эффект такой системы на опухолевых клетках различного происхождения и показано, что использование этой системы при совместной обработке 5-FC индуцирует p53-зависимую гибель более чем 70% опухолевых клеток.

Для усиления цитопатического эффекта созданной системы впервые была использована модифицированная бинарная система векторов Cre-LoxP. Было показано, что бинарная терапевтическая система векторов увеличивает чувствительность опухолевых клеток к 5-FC. При этом профиль специфичности экспрессии терапевтического гена определялся специфичностью промотора гена *BIRC5*.

На модели клеточных линий показано, что 5% клеток, экспрессирующих ген *FCUI*, достаточно для того, чтобы вызвать гибель 80% опухолевых клеток. Были подобраны оптимальные условия использования созданной терапевтической системы, что необходимо для проведения экспериментов на моделях животных.

Было продемонстрировано, что различия в величине «эффекта свидетеля» коррелируют с различиями в чувствительности клеток к основным метаболитам 5-FC и 5-FU. Полученные результаты имеют не только практическую значимость, но и позволяют понять механизмы внутриклеточного метаболизма 5-FC, а также биохимические процессы, лежащие в основе «эффекта свидетеля», опосредованного системой *FCU1/5-FC*.

Апробация работы

Результаты работы были представлены на российских и международных конференциях: Международной научной конференции по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии, посвященной 75-летию со дня рождения академика Ю.А. Овчинникова (Москва, 2010); VI Московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2011), 15-ой Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2011).

Объём работы

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

Публикации

По теме диссертационной работы опубликовано 2 статьи в зарубежных научных журналах. Результаты работы были представлены на российских и международных конференциях: International Conference on Biomolecular Science in honor of the 75th anniversary of the birth of Professor Yuri Ovchinnikov (Москва, 2009); VI Московский международный конгресс "Биотехнология: состояние и перспективы развития" (Москва, 2011); 15-ая Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2011).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Создание экспрессионных векторов, несущих гибридный ген *FCU1* в качестве гена суицидального воздействия

В качестве суицидального гена нами был выбран ген *FCY1*, так как для системы *FCY1/5-FC* ранее было показано наличие выраженного «эффекта свидетеля», независимого от наличия межклеточных контактов. Нами была выбрана цитозиндезаминаза *Saccharomyces cerevisiae*, которая по сравнению с цитозиндезаминазой бактерий имеет ряд преимуществ: 1) более высокое сродство к 5-FC, что должно обеспечивать более эффективное дезаминирование 5-FC, приводящее к образованию токсичного метаболита 5-FU; 2) большую термостабильность и 3) фермент представляет собой димер, в то время как бактериальный аналог - гексамер.

Чтобы повысить цитотоксический эффект данной GDEPT системы, мы использовали гибридный ген *FCY1-FUR1* (*FCUI*). Ранее было показано, что продукт экспрессии *FUR1* (урацилфосфорибозилтрансфераза) катализирует превращение 5-FU в 5-FUMP, который под действием клеточных ферментов превращается в наиболее токсичные метаболиты 5-FC: 5-FdUMP и 5-FUTP (Рис. 1).

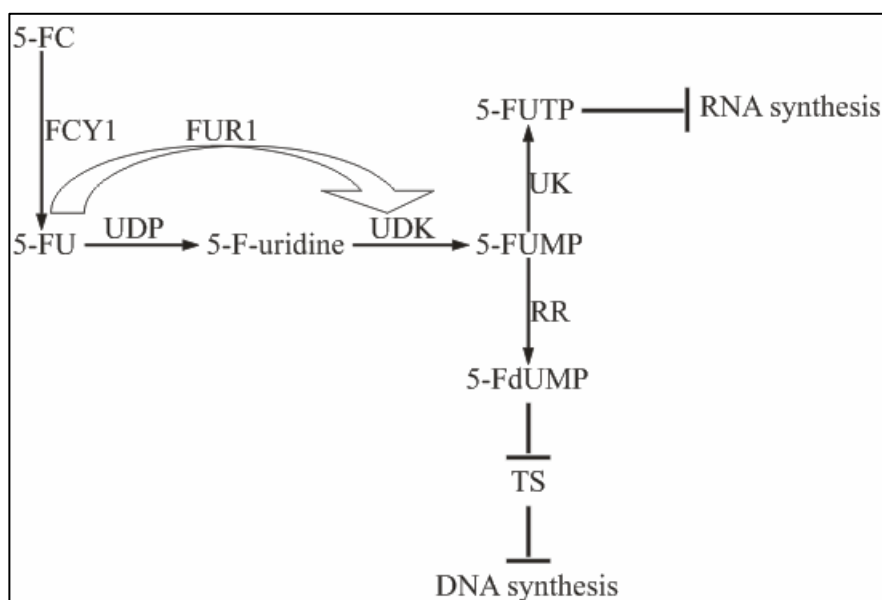


Рисунок 1. Схема основных метаболических путей 5-FC в клетках, экспрессирующих гибридный ген *FCUI*. Фермент *FUR1* способен шунтировать двухстадийную реакцию образования 5-FdUMP из 5-FU. Накопление 5-FdUMP приводит к ингибированию *TS*, вследствие чего нарушается синтез ДНК. Накопление 5-FUTP приводит к нарушению «созревания» молекул РНК. *FCY1* – цитозиндезаминаза, *FUR1* – урацилфосфорибозилтрансфераза, *UDP* – уридин фосфорилаза, *UDK* – уридин киназа, *UK* – уридинмоно- уридиндифсфат киназа, *RR* – рибонуклеотид редуктаза, *TS* – тимидилат синтаза, 5-FC – 5-фторцитозин, 5-FU – 5-фторурацил, 5-F-uridin – 5-фторуридин, 5-FUMP – 5-фторуридин-5'-монофосфат, 5-FdUMP – 5-фтор-2'-дезоксинуридин-5'-монофосфат, 5-FUTP – 5-фторуридин-5'-трифосфат (Chung-Faye, Chen et al. 2001).

Гибридный ген *FCUI* был получен путём объединения кодирующих последовательностей двух генов: *FCY1* (471 п.о., chrXVI:677,165-677,635 (данные «UCSC genome browser» 2008 г.)) и *FUR1* (642 п.о., chrVIII:362,124-362,765 (данные «UCSC genome browser» 2008 г.)), которые ранее были амплифицированы с геномной ДНК штамма *Saccharomyces cerevisiae arg4*. Стоп и старт кодоны генов *FCY1* и *FUR1* были удалены олигонуклеотидным сайт-направленным мутагенезом. Фрагменты генов были разделены кодоном, соответствующим аланину, в результате чего, образующийся гибридный белок должен был содержать аланиновый линкер между белками *FCY1* и *FUR1*.

На Рис. 2 приведена общая схема векторов, несущих гибридный ген *FCUI*. В качестве базового вектора был выбран pGL3-BV («Promega»), из которого был удалён ген люциферазы. Затем в такой модифицированный pGL3-BV вектор были последовательно (от

5'-конца к 3'-концу) клонированы два элемента: 1) промотор/промотор с энхансером, направляющий экспрессию гена *FCUI*; 2) собственно гибридный ген *FCUI* (длина 1125 п.о.). Результирующая конструкция содержала сигнал полиаденилирования вируса SV40 (Simian vacuolating virus 40). Также между промотором и геном *FCUI* из вектора pCI («Promega») была клонирована последовательность химерного интрона (133 п.о.). Ранее было показано, что данный интрон способен значительно повышать уровень экспрессии гена в клетках млекопитающих (Huang and Gorman 1990).



Рисунок 2. Общая схема строения созданных экспрессионных векторов. Стрелкой обозначен промотор, направляющий экспрессию суицидального гена; чёрной Г-образной стрелкой - точка начала транскрипции; V-образной линией - химерный интрон; прямоугольниками (слева направо) - ген *FCUI* и сигнал полиаденилирования SV40.

Для достижения достаточного терапевтического эффекта необходимо добиться высокой и в тоже время специфичной экспрессии суицидального гена.

Работа проводилась в двух направлениях: 1) создание систем для экспрессии гена *FCUI* в специфических типах опухоли – для клеток герминогенного рака яичка использовали модифицированный промотор гена *NDUFV1* (pmNUS), для клеток меланомы использовали промотор тирозиназы мыши или промотор гена *MIA* человека; 2) создание универсальной системы для экспрессии гена *FCUI* в широком спектре опухолей-мишеней – для опухолей различного происхождения использовали промотор гена *BIRC5*.

В качестве системы сравнения во всех экспериментах использовали обладающую высокой активностью, но не опухолеспецифическую экспрессионную конструкцию, содержащую гибридный ген *FCUI* под контролем сильного конститутивного промотора pCMV (Cytomegalovirus immediate early promoter).

Создание системы *FCUI/5-FC* для убийства раковых клеток меланомы

Для создания цитотоксической системы, работающей в клетках меланомы, были выбраны промоторы генов тирозиназы мыши (*Tyr*) (-355...-61, относительно точки начала транскрипции) и гена *MIA* человека (-1373...-1, относительно точки начала транскрипции) для которых было показано, что их активность строго ограничена клетками меланомы (Siders, Halloran et al. 1998). Чтобы усилить экспрессию терапевтического трансгена, направляемую промоторами pMIA и pTyr, в 5'-область обоих промоторов был клонирован тандем из трёх тканеспецифических энхансеров (enhTyr1-3) гена тирозиназы мыши (-

14614...-14822, относительно точки начала транскрипции). Были получены след экспрессионные конструкции: *enhTyr1-3-pMIA-FCUI*, *enhTyr1-3-pTyr-FCUI*.

Для оценки терапевтического потенциала созданных экспрессионных векторов были определены значения IC_{50} (концентрация вещества, при которой выживает 50% клеток) по 5-FC для трансфицированных клеток и IC_{50} по 5-FU для нетрансфицированных клеток. Клетки одной человеческой (A375), двух мышинных (B16-F1 и M3) меланомных клеточных линий и одной немеланомной клеточной линии (для контроля тканеспецифичности цитотоксического эффекта CaluI, эпидермоидная карцинома лёгких), трансфицировали (не менее 3-х трансфекций для каждой клеточной линии) экспрессионным векторами: *enhTyr1-3-pMIA-FCUI*, *enhTyr1-3-pTyr-FCUI*, *pCMV-FCUI* (в качестве положительного контроля) и (без промотора)-*FCUI* (в качестве отрицательного контроля) (Табл. 1). Через 48 ч после трансфекции клеткам добавляли среду, содержащую 5-FC (5-FU) в концентрациях (0, 10, 50, 200, 500, 1000 мкМ). Клеточную среду обновляли каждые 48 ч. Спустя 120 ч проводили MTS-тест, основанный на измерение оптической плотности клеточных сред после окраски живых клеток красителем MTS, образующим при окислении в митохондриях производное фиолетового цвета (формазан). Выживаемость клеток рассчитывали как процентное отношение оптической плотности в средах трансфицированных клеток, обработанных 5-FC, к оптической плотности в средах трансфицированных клеток, не обработанных 5-FC. С помощью математической модели нелинейной регрессии были построены графики сглаживающих кривых для экспериментальных значений выживаемости клеток (данные приведены в диссертации). Используя уравнения полученных кривых, были рассчитаны значения IC_{50} по 5-FC и 5-FU (Табл. 1).

Таблица 1. Чувствительность к 5-FC клеток, трансфицированных экспрессионными векторами, несущими гибридный ген *FCUI* под контролем различных промоторов, и чувствительность нетрансфицированных клеток к 5-FU.

Клеточная линия	IC_{50} для 5-FU, мкМ	Трансфицированные клетки: IC_{50} для 5-FC, мкМ			
		<i>pCMV-FCUI</i>	<i>enhTyr1-3-pMIA-FCUI</i>	<i>enhTyr1-3-pTyr-FCUI</i>	(без промотора) - <i>FCUI</i>
A375	18 ± 4	59 ± 2	121 ± 58	427 ± 174	–
M3	0,16 ± 0	11 ± 2	49 ± 3	53 ± 37	427 ± 83
B16-F1	0,15 ± 0,07	189 ± 13	784 ± 9	493 ± 38	–
CaluI	110 ± 18	118 ± 10	–	–	–

Значения IC_{50} определяли минимум в трёх независимых экспериментах. Разброс соответствует стандартной ошибке среднего значения (SEM). «←» - определить значение IC_{50} было невозможно.

Как видно из полученных результатов (Табл. 1), чувствительность нетрансфицированных клеток к 5-FU значительно варьирует в зависимости от типа клеточной линии; при этом чувствительность меланомных клеточных линий к 5-FU

значительно выше (до 700 раз) чувствительности клеточной линии немеланомного происхождения.

Вектор, несущий промотор рTyr мыши оказывает более сильный суицидальный эффект на клетки мышинной меланомы (M3, B16-F1) в то время как вектор, несущий промотор гена *MIA* человека, оказывает более сильный цитотоксический эффект на клетки меланомы человека (A375), то есть созданные экспрессионные конструкции сохраняют видоспецифичность. Промоторы *pMIA* и *pTyr* сохраняют меланома-специфичность, поскольку трансфекция клеток линии Calu1 векторами *enhTyr1-3-pMIA-FCUI* или *enhTyr1-3-pTyr-FCUI* не влияет на чувствительность клеток к 5-FC. Как видно из Табл. 1 созданные экспрессионные вектора *enhTyr1-3-pMIA-FCUI* или *enhTyr1-3-pTyr-FCUI* при совместной обработке 5-FC оказывают специфическое цитотоксическое действие на раковые клетки меланомы сравнимое с действием *pCMV-FCUI*.

Полученные данные указывают на высокий терапевтический потенциал созданных векторов *enhTyr1-3-pMIA-FCUI* и *enhTyr1-3-pTyr-FCUI*. Трансфекция данными экспрессионными конструкциям в присутствии 5-FC в концентрации 1 мМ вызывает высоко тканеспецифическую супрессию роста клеток меланомы, сопоставимую с эффектом вектора *pCMV-FCUI*: более 70% клеток погибало спустя 120 ч после добавления 5-FC.

Создание системы *FCUI/5-FC* для убийства клеток герминогенного рака яичка человека

Для создания цитотоксической системы, работающей в клетках герминогенного рака яичка человека, был выбран промотор гена *NDUFV1* (NADH Dehydrogenase Ubiquinone FlaVoprotein 1). На основе фрагмента промотора гена *NDUFV1* (NUS, *NDUFV1 Upstream Sequence*, координаты -3574...-1, относительно точки начала транскрипции) путём удаления высоко консервативного фрагмента длиной 91 п.о. был получен модифицированный промотор mNUS (modified NUS). Промоторную активность исходного NUS (3665 п.о.) и модифицированного mNUS (3574 п.о.) промотора гена *NDUFV1*, определяли по уровню экспрессии репортерного гена в экспериментах по транзientной трансфекции с использованием двойной люциферазной системы на панели различных опухолевых клеточных линий человека, а также культурах первичных тканей (результаты приведены в диссертации).

Было показано, что промотор pmNUS проявляет высокую активность в клетках герминогенного рака яичка (линии Tera-1 и EP2102) и практически не активен в клетках другого типа (результаты приведены в диссертации), то есть pmNUS является сильным, высоко тканеспецифическим промотором для недифференцированных клеток рака яичка человека.

Для оценки терапевтического потенциала системы pmNUS/*FCUI*/5-FC был создан экспрессионный вектор pmNUS-*FCUI*. Экспрессию гена *FCUI* подтверждали методом вестерн-блот анализа с антителами к цитозиндезаминазе лизатов трансфицированных клеток HEK293 и Tera-1 (данные приведены в диссертации).

Определение цитотоксического эффекта системы pmNUS/*FCUI*/5-FC проводили на клеточных линиях Tera-1 и HEK293 (трансформированные клетки почки человека). Эксперимент с клетками HEK293 являлся контролем тканеспецифичности системы. Клетки Tera-1 и HEK293 были трансфицированы конструкциями pmNUS-*FCUI*, pCMV-*FCUI* (в качестве положительного контроля) и (без промотора)-*FCUI* (в качестве отрицательного контроля). Клетки анализировали методом проточной цитометрии после двойного окрашивания клеток красителями Аннексин V – ФИТЦ / Пропидиум иодид через 48 ч после добавления 5-FC в концентрации 1 мМ.

Таблица 2 Чувствительность к 5-FC клеток Tera-1 и HEK-293, трансфицированных экспрессионными векторами, несущими гибридный ген *FCUI* под контролем промоторов pCMV и pmNUS.

Название экспрессионной конструкции [#]	Tera-1		HEK-293	
	Двойное окрашивание Аннексин V - ФИТЦ / Пропидиум иодид			
	- 5-FC	+ 5-FC	- 5-FC	+ 5-FC
(без промотора)- <i>FCUI</i>	9,0 % ± 1,7 %	10,7 % ± 2,6 %	7,4 % ± 1,7 %	8,6 % ± 2,9 %
pmNUS- <i>FCUI</i>	8,8 % ± 2,9 %	59,1 % ± 3,9 %	7,8 % ± 2,1 %	8,4 % ± 2,8 %
pCMV- <i>FCUI</i>	9,9 % ± 2,5 %	64,9 % ± 5,6 %	8,2 % ± 2,2 %	75,5 % ± 8,6 %

[#]Выживаемость клеток измеряли спустя 48 ч после добавления 5-FC. Приведенные данные отражают суммарное количество некротических и апоптотических клеток. "- 5-FC" - в клеточную среду не добавляли 5-FC; "+ 5-FC" - в клеточную среду добавляли 5-FC. Эксперимент проводили минимум в трёх повторностях.

Результаты эксперимента приведены в Табл. 2. Для обеих клеточных линий в отсутствие 5-FC выраженной гибели клеток не наблюдалось (базальная смертность составляла ~7-10%). Трансфекция конструкцией pCMV-*FCUI* при совместной обработке 5-FC индуцировала гибель ~67-84% клеток HEK293 и ~65-67% клеток Tera-1. Вектор pmNUS-*FCUI* в присутствии 5-FC оказывал цитотоксическое действие только на клетки линии Tera-1, к концу эксперимента погибало ~59-62% клеток.

Из результатов экспериментов по определению цитотоксичности следует, что терапевтическая конструкция pmNUS-*FCUI* обладает высокой тканеспецифичностью по отношению к недифференцированным клетками рака яичка, а цитотоксический эффект, опосредованный промотором pmNUS сопоставим с цитотоксическим эффектом, опосредованным промотором pCMV (Табл. 2). Полученные данные указывают на то, что созданная GEPT система может в дальнейшем быть использована как основа для генотерапевтического противоракового препарата для лечения герминогенных опухолей.

Создание системы *FCU1/5-FC* с широким спектром противоопухолевого действия

С терапевтической точки зрения более перспективным подходом является универсальных GERT систем, что достигается использованием промоторов, активных в широком спектре опухолей.

Ранее в нашей лаборатории был клонирован и охарактеризован с точки зрения специфичности и активности фрагмент промотора гена *BIRC5* (Baculoviral IAP Repet Containing 5) – pSurv4 (–1456...+42 относительно точки инициации транскрипции). Было показано, что промотор pSurv4 активен в широком спектре опухолевых клеточных линий человека, при этом в нормальных клетках его активность практически отсутствовала. Активность промотора зависела от p53 статуса опухолевых клеток: низкая в клетках с p53(+) фенотипом и относительно высокая в клетках p53(-) фенотипом (Mityaev, Kopantzev et al. 2008). Именно поэтому для создания терапевтической системы с широким спектром опухолей-мишеней был создан вектор, в котором гибридный ген *FCU1* находился под контролем промотора pSurv4.

Экспрессионной конструкцией pSurv4-*FCU1* трансфицировали клетки линий HEK293, Calu1 и A549 (карцинома лёгких человека) и определяли количество белка FCU1 в клеточных лизатах методом вестерн-блот анализа с антителами к цитозиндезаминазе. Было показано, что: 1) экспрессия гена *FCU1*, под контролем промотором pSurv4 приводит к накоплению FCU1 исключительно в клетках с мутантным p53-фенотипом (Рис. 3, дорожка №2); 2) промотор pCMV по сравнению с промотором pSurv4 обеспечивает существенно большее накопление FCU1, независимо от p53-статуса клеточной линии (Рис. 3, дорожка №1); 3) криптическая промоторная активность у базового вектора pGL3-BV отсутствует, так как FCU1 не детектировали в лизатах клеток, трансфицированных беспромоторной конструкцией, несущей один лишь ген *FCU1* (Рис. 3, дорожка №3).

Поскольку существуют данные, что белок p53 существенным образом снижает активность промотора гена *BIRC5*, полученные нами результаты, указывающие на зависимость экспрессии гена *FCU1* направляемую промотором pSurv4 от p53 статуса клеточной линии, являются ожидаемыми.

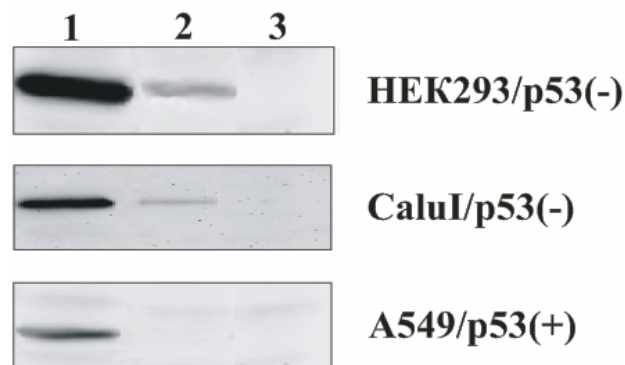


Рисунок 3. Вестерн-блот анализ содержания белка FCY1 в лизатах трансфицированных клеток линий HEK293, CaluI и A549. Трансфекции векторами 1 - pCMV-FCUI; 2 – pSurv4-FCUI; 3 – (без промотора)-FCUI. В качестве первичных антител использовали овечьи IgG («Santa-Cruz») (1:5000).

Чтобы количественно оценить цитотоксический потенциал вектора pSurv4-FCUI, клетки HEK293(p53(-)), CaluI(p53(-)) и A549(p53(+)) транзientно трансфицировали терапевтическим вектором и инкубировали с 5-FC (1 мМ). Цитотоксическое действие векторов оценивали спустя 48 ч. после трансфекции при помощи MTS-теста.

Трансфицированные и нетрансфицированные клетки были разделены на две группы, одну из которых инкубировали с 5-FC, другую - с клеточной средой. Были проведены четыре параллельных эксперимента: с нетрансфицированными клетками и клетками, трансфицированными векторами: (без промотора)-FCUI, pCMV-FCUI и pSurv4-FCUI.

Количество мёртвых клеток среди трансфицированных беспромоторным вектором и нетрансфицированных клеток было одинаково (~9-15%) и не зависело от наличия в среде 5-FC (данные приведены в диссертации). В тоже время трансфекция вектором pCMV-FCUI при совместной обработке 5-FC вызывала гибель 85, 82 и 78% опухолевых клеток линий HEK293, CaluI и A549, соответственно (Рис. 4). В аналогичном эксперименте, когда трансфицированные вектором pCMV-FCUI клетки инкубировали в среде без 5-FC, погибало менее 10% клеток (данные приведены в диссертации). Таким образом, мы показали, что цитотоксический эффект FCUI был полностью 5-FC зависимый, что хорошо согласуется с ранее опубликованными данными. Трансфекция тех же клеточных линий вектором pSurv4-FCUI вызывала гибель 68 и 52% клеток линии HEK293(p53(-)) и CaluI(p53(-)), соответственно. В случае клеток A549 с p53(+) фенотипом, трансфекция вектором pSurv4-FCUI практически не вызывала 5-FC-зависимого цитотоксического эффекта.

Из результатов, приведенных на Рис. 4 следует, что пролекарство 5-FC не обладает выраженным цитотоксическим действием даже в концентрации 1 мМ. Сопоставление данных экспериментов по цитотоксичности с результатами вестерн-блот анализа клеточных лизатов (Рис. 3 и Рис. 4) показывает, что цитотоксический эффект пропорционален количеству нарабатываемого белка FCUI.

Цитотоксический эффект вектора pSurv4-FCUI был значительно слабее по сравнению с эффектом вектора pCMV-FCUI: в 5,5 раз в клетках с p53(+) фенотипом и в 2 раза в клетках

p53(-) фенотипами. При этом профиль специфичности цитотоксического эффекта вектора pSurv4-*FCUI* совпадает с профилем специфичности активности промотора pSurv4.

Поскольку созданная система GEPT на основе pSurv4-*FCUI*/5-FC не была достаточно эффективной, была проведена работа по усилению экспрессии гена *FCUI* для увеличения терапевтического потенциала системы.

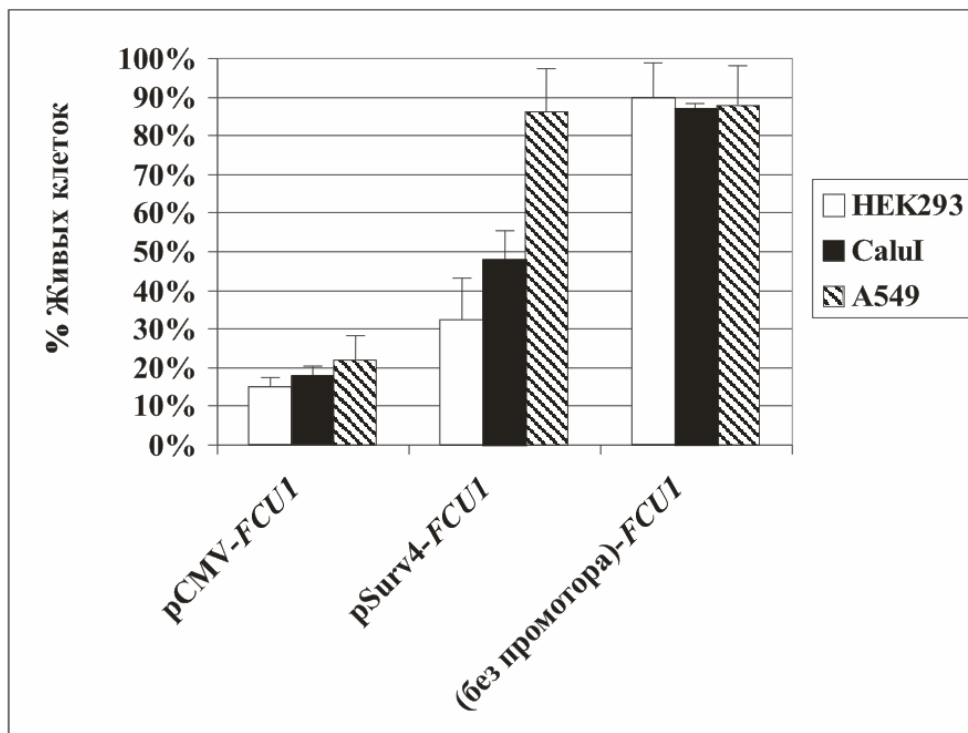


Рисунок 4. Выживаемость клеток в присутствии 5-FC, трансфицированных экспрессирующими ген *FCUI* векторами. Спустя 24 ч. после трансфекции добавляли 1 мМ 5-FC. После 120 ч инкубации в среде с 5-FC клетки окрашивали красителем MTS и измеряли оптическую плотность клеточных экстрактов. Высота столбцов отражает процент выживших клеток спустя 120 ч после начала эксперимента.

Выживаемость рассчитывали как процентное отношение оптической плотности в экстрактах клеток, обработанных 5-FC, к оптической плотности в экстрактах клеток, не обработанных 5-FC. Приведены стандартные ошибки среднего (SEM).

Введение модифицированной системы Cre-LoxP для усиления экспрессии цитотоксического гена *FCUI*

Существенным недостатком «универсальных» промоторов и, в частности, промотора гена *BIRC5*, является их относительно низкая активность, не позволяющая обеспечить наработку необходимого и достаточного количества цитотоксического белка. Для преодоления этого ограничения используют различные системы усиления экспрессии суицидального гена: введение опухолеспецифических энхансерных элементов, введение бинарной системы Tat-tar ВИЧ, Cre-LoxP и др.

В данной работе для усиления экспрессии гена *FCUI*, направляемой промотором pSurv4, была использована модифицированная система Cre-LoxP. Ранее было показано, что введение системы Cre-LoxP позволяет добиться увеличения экспрессии репортерного гена от 1,5 до 15 раз (Ueda, Iwahashi et al. 2003). Кроме того, данная система усиления позволяет сохранить специфичность экспрессии репортерного гена, так как экспрессия гена Cre-

рекомбиназы индуцируется опухолеспецифическим промотором. Принципиальная схема, использованная для усиления экспрессии суицидального гена *FCUI* под контролем промотора pSurv4, приведена на Рис. 5.

Была создана бинарная система векторов, включающая: 1) вектор-активатор (pSurv4-*Cre*), в котором последовательность, кодирующая *Cre*-рекомбиназу с сигналом ядерной локализации, находится под контролем промотора pSurv4; 2) вектор-эффектор (pCMV-*LoxP*-*Stop*-*LoxP*-*FCUI*), содержащий промотор pCMV, отделённый от гена *FCUI* «Stop»-сигналом, состоящим из тандема трёх сигналов полиаденилирования вируса SV40. С обеих сторон от «Stop»-сигнала в единой ориентации были клонированы *LoxP*-сайты, специфические для *Cre*-белка. Система *Cre*-*LoxP* была модифицирована за счёт введения двух дополнительных сигналов полиаденилирования в область между промотором pCMV и геном *FCUI*.

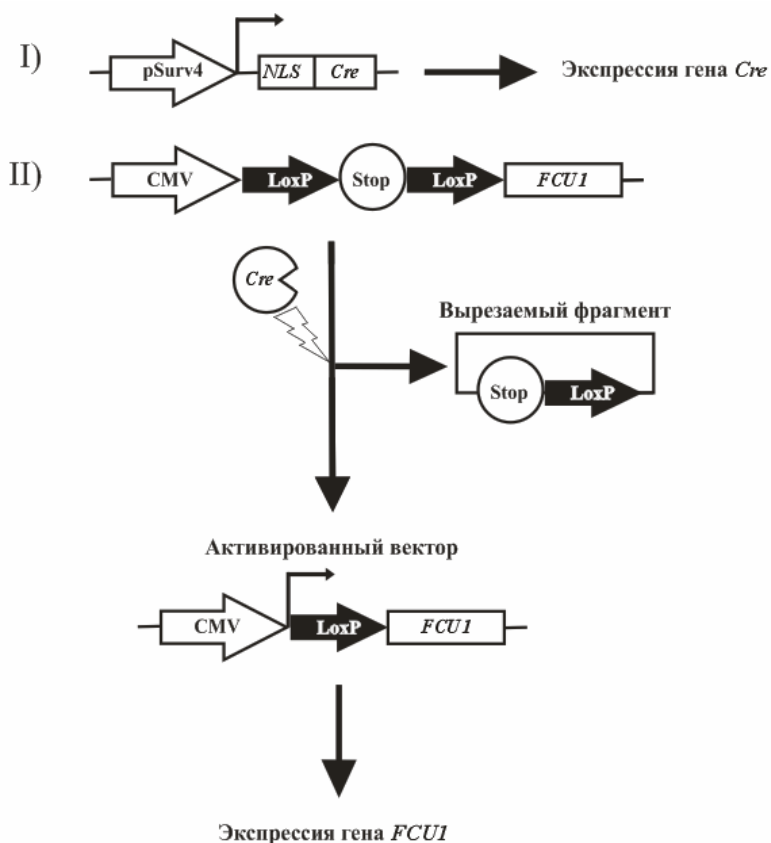


Рисунок 5. Схема работы бинарной модифицированной опухолеспецифичной системы Cre-LoxP. При попадании в опухолевую клетку активационного (pSurv4-*Cre*) и эффекторного (pCMV-*LoxP*-*Stop*-*LoxP*-*FCUI*) векторов запускается каскад событий: I) активация промотора pSurv4 в опухолевых клетках вызывает наработку *Cre*-рекомбиназы; II) наработанная *Cre*-рекомбиназа узнаёт *LoxP*-сайты в составе эффекторного вектора и вырезает фрагмент, фланкированный этими сайтами; 3) в результате удаления «*Stop*»-сигнала промотор pCMV индуцирует наработку терапевтического белка *FCUI*. Стрелками обозначены промоторы; прямоугольниками – гены; чёрными стрелками – *LoxP*-сайты; окружностью – «*Stop*»-сигнал. «*Stop*»-сигнал – последовательность, состоящая из тройного повтора сигнала полиаденилирования вируса SV40. NLS (Nuclear Localization Signal) – сигнал ядерной локализации.

Созданную бинарную систему векторов использовали для транзиентной трансфекции клеток НЕК293, Calu1 и A549 (Рис. 6) и проводили вестерн-блот анализ клеточных лизатов с антителами к цитозиндезаминазе.

Анализ показал: 1) только двойная трансфекция (вектором-активатором и вектором-эффектором) приводит к накоплению белка *FCUI*; 2) трансфекция клеток одним из векторов

бинарной системы не приводит к накоплению белка FCU1, что свидетельствует об эффективной терминеции транскрипции последовательностью, соответствующей «Stop»-сигналу (Рис. 6, дорожка № 2); 3) введение системы Cre-LoxP сохраняет зависимость экспрессии от p53-статуса, поскольку трансфекция p53(+) клеток бинарной системой векторов не приводила к накоплению белка FCU1 (Рис. 6, дорожка № 3); 4) трансфекция p53(-) клеток бинарной системой векторов приводила к накоплению белка FCU1 в количестве, сопоставимом с количеством белка, образующегося в результате трансфекции тех же клеток конструкцией pCMV-FCU1 (Рис. 6, дорожки № 1 и 3).

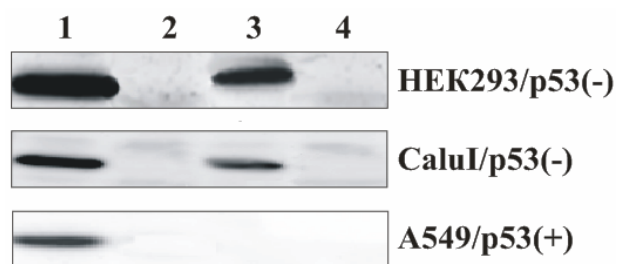


Рисунок 6. Вестерн-блот анализ содержания белка FCU1 в клетках линий HEK293, CaluI и A549, трансфицированных конструкциями, экспрессирующими ген *FCU1*. 1 – pCMV-*FCU1*; 2 – pCMV-*LoxP-Stop-LoxP-FCU1*; 3 – pCMV-*LoxP-Stop-LoxP-FCU1* и pSurv4-*Cre* (котрансфекция); 4 – (без промотора)-*FCU1*. В качестве первичных антител использовали овечьи IgG («Santa-Cruz») (1:5000). Указан p53 фенотип клеточной линии.

Таким образом, введение модифицированной бинарной системы векторов позволило существенно повысить количество белка FCU1 в клеточных линиях с p53(-) фенотипом (см. Рис. 6, дорожка №2 - без усиления).

Создание GEPT системы на основе Cre-LoxP//pCMV-Stop-FCU1/5-FC с широким спектром противоопухолевого действия

Для количественной оценки терапевтической эффективности системы было проведено сравнение чувствительности к 5-FC нескольких клеточных линий с различными p53 фенотипами, трансфицированных векторами: 1) pSurv4-*FCU1*, 2) pCMV-*FCU1*, 3) pSurv4-*Cre* и pCMV-*LoxP-Stop-LoxP-FCU1* в отношении 5:5 по количеству мкг. Это оптимальное соотношение количеств эффекторного и активационного векторов было подобрано экспериментально (данные приведены в диссертации).

Трансфицированные клетки в течение 120 ч инкубировали в среде с различными концентрациями 5-FC (0, 10, 50, 200, 500 и 1000 мкМ). Чтобы оценить исходную чувствительность клеточных линий к активированному токсичному метаболиту, не трансфицированные клетки инкубировали в среде с 5-FU, используя те же концентрации, что и для 5-FC. Выживаемость клеток оценивали при помощи MTS-теста. С помощью математической модели нелинейной регрессии были построены графики сглаживающих кривых для экспериментальных значений выживаемости клеток. Используя уравнения

полученных кривых, были рассчитаны значения IC_{50} (концентрация вещества, при которой выживает 50% клеток) для 5-FC (Табл. 3).

Была проведена оценка эффективности трансфекции исследуемых клеточных линий. Для этого клетки трансфицировали экспрессионным вектором, несущим ген *GFP* (Green Fluorescent Protein) под контролем конститутивного промотора вируса SV40. Спустя 48 ч, когда экспрессия гена *GFP* достигала наибольших значений, методом FACS-анализа (Fluorescence-Activated Cell Sorting) определяли процент трансфицированных клеток как отношение количества GFP-положительных клеток к общему числу всех трансфицированных клеток.

Таблица 3. Чувствительность (IC_{50}) к 5-FC клеток, трансфицированных экспрессионными векторами, несущими гибридный ген *FCUI* под контролем различных промоторов, и чувствительность нетрансфицированных клеток к 5-FU.

Линия клеток	p53 статус	Эффективность трансфекции, %	Нетрансфицированные клетки	Трансфицированные клетки: IC_{50} для 5-FC, мкМ		
			IC_{50} для 5-FU, мкМ	pCMV- <i>FCUI</i>	pSurv4- <i>FCUI</i>	pCMV- <i>LoxP-Stop-LoxP-FCUI</i> + pSurv4- <i>Cre</i>
HEK293	-	20	13 ± 7	50 ± 9	1160 ± 17	264 ± 57
Calu1	-	11	110 ± 18	118 ± 10	1010 ± 98	189 ± 81
HT1080	+	22	4 ± 2	233 ± 13	ND	ND
A549	+	7	900 ± 204	946 ± 180	ND	ND

«-» - фенотип дефектный по p53 белку, «+» - фенотип с активным белком p53, «-» - определить значение IC_{50} было невозможно. Значения IC_{50} определяли минимум в трёх независимых экспериментах. Разброс соответствует стандартной ошибке среднего значения (SEM).

Из приведенных данных следует, что котрансфекция эффекторным и активационным векторами клеток с p53(-) фенотипом (HEK293 и Calu1) повышает чувствительность этих клеток к 5-FC по сравнению с чувствительностью клеток, трансфицированных одним лишь pSurv4-*FCUI* вектором, в 4 и 5 раз, соответственно. Полученный результат демонстрирует высокую эффективность использования системы Cre-LoxP для повышения чувствительности клеток данного типа к 5-FC. Котрансфекция системой векторов pSurv4-*Cre* и pCMV-*LoxP-Stop-LoxP-FCUI* даже при высоких концентрациях 5-FC практически не вызывает гибели клеток линий A549 и HT1080 (фибросаркома человека), имеющих p53(+) фенотип. В связи с этим в экспериментах для этих двух линий значения IC_{50} для 5-FC определить не удалось. Клетки, трансфицированные вектором pCMV-*FCUI*, демонстрировали различную чувствительность к 5-FC. Из результатов, полученных на нетрансфицированных клетках, следует, что чувствительность к 5-FU значительно варьирует в зависимости от типа клеточной линии.

Наблюдаемые различия в терапевтическом эффекте вектора pCMV-*FCUI* мы

связываем с различиями в эффективности трансфекции клеток, а так же с различиями в чувствительности к 5-FU (Табл. 3). Чувствительность нетрансфицированных клеток к 5-FU значительно выше чувствительности к 5-FC клеток, трансфицированных вектором *pCMV-FCU1*, что может быть объяснено следующими причинами: 1) в клетке может происходить неполное дезаминирование 5-FC; 2) часть молекул 5-FC могут подвергаться модификации со стороны второго фермента, урацилфосфорибозилтрансферазы, и, таким образом, включаться в другие внутриклеточные метаболические пути; 3) часть образовавшегося 5-FU под действие клеточного фермента дигидропиримидиндегидрогеназы может быть конвертировано в β -аланин и, таким образом, не участвовать в реализации цитотоксического эффекта.

Таким образом, созданная модифицированная система Cre-LoxP, в которой экспрессия гена *Cre* направляется промотором *pSurv4*, повышает накопление белка FCU1 и приводит к увеличению цитотоксического эффекта в присутствии 5-FC по сравнению с прямой регуляцией экспрессией гена *FCU1* промотором *pSurv4* в 4 и 5 раз в клеточных линиях с фенотипом p53(-) (HEK293 и Calu1, соответственно). Двойная трансфекция векторами *pSurv4-Cre* и *pCMV-LoxP-Stop-LoxP-FCU1* в присутствии 5-FC оказывает цитотоксический эффект, сопоставимый с эффектом вектора *pCMV-FCU1*. При этом система Cre-LoxP повторяет профиль специфичности промотора *pSurv4*. Полученные результаты указывают на то, что созданная система векторов *pSurv4-Cre* и *pCMV-LoxP-Stop-LoxP-FCU1* может быть использована как базовая для дальнейших доклинических испытаний.

Оценка «эффекта свидетеля» в системе *FCU1/5-FC* на опухолевых клеточных линиях человека

Как уже говорилось выше, одним из условий эффективности системы GDEPT является наличие «эффекта свидетеля» («bystander effect»), который может быть измерен как отношение количества нетрансфицированных опухолевых клеток, подвергшихся цитотоксическому воздействию со стороны продуцируемого GDEPT системой токсического агента, к числу клеток, экспрессирующих суицидальный ген.

Для оценки «эффекта свидетеля» в созданной системе *FCU1/5-FC* был использован метод мозаичных культур. Определяя долю клеток, экспрессирующих ген *FCU1*, и сравнивая её с долей клеток, погибающих к концу эксперимента, мы могли оценивать вклад высвобождающегося и свободно диффундирующего в соседние клетки активного метаболита 5-FU в реализацию цитотоксического эффекта системы *FCU1/5-FC*.

Определение «эффекта свидетеля» было проведено для четырёх клеточных линий, HEK293, Calu1, A549 и HT1080, которые были использованы для изучения различных параметров системы *FCU1/5-FC*. Клетки трансфицировали экспрессионным вектором

pCMV-*FCUI*, активным во всех четырёх клеточных линиях, и вектором, который содержал ген *GFP* под контролем промотора вируса SV40 (для определения уровня трансфекции). Смешивая трансфицированные и нетрансфицированные клетки в различных процентных соотношениях, были созданы четыре мозаичные культуры, в которых количество клеток, подвергшихся трансфекции составляло 10%, 25%, 50% и 75%. В качестве контролей были использованы две немозаичные культуры, состоящие из 100% клеток, подвергшихся трансфекции, и 100% нетрансфицированных клеток. Клетки инкубировали с 5-FC (1 мМ) в течение 120 ч, после чего выживаемость определяли при помощи MTS-теста (Рис. 7).

реальную долю клеток, экспрессирующих ген *FCUI* (*FCUI*⁺-клетки) в составе мозаичной культуры, определяли по числу GFP-положительных клеток при помощи проточной цитофлуориметрии через 48 ч после трансфекции. Определив эффективность трансфекции для каждой клеточной линии и умножив эту величину на процентное содержание трансфицированных клеток (0, 10, 25, 50, 75 и 100%) рассчитывали фактическую долю *FCUI*⁺-клеток в составе мозаичной культуры. Каждый эксперимент проводили в трёх повторностях (Рис. 7).

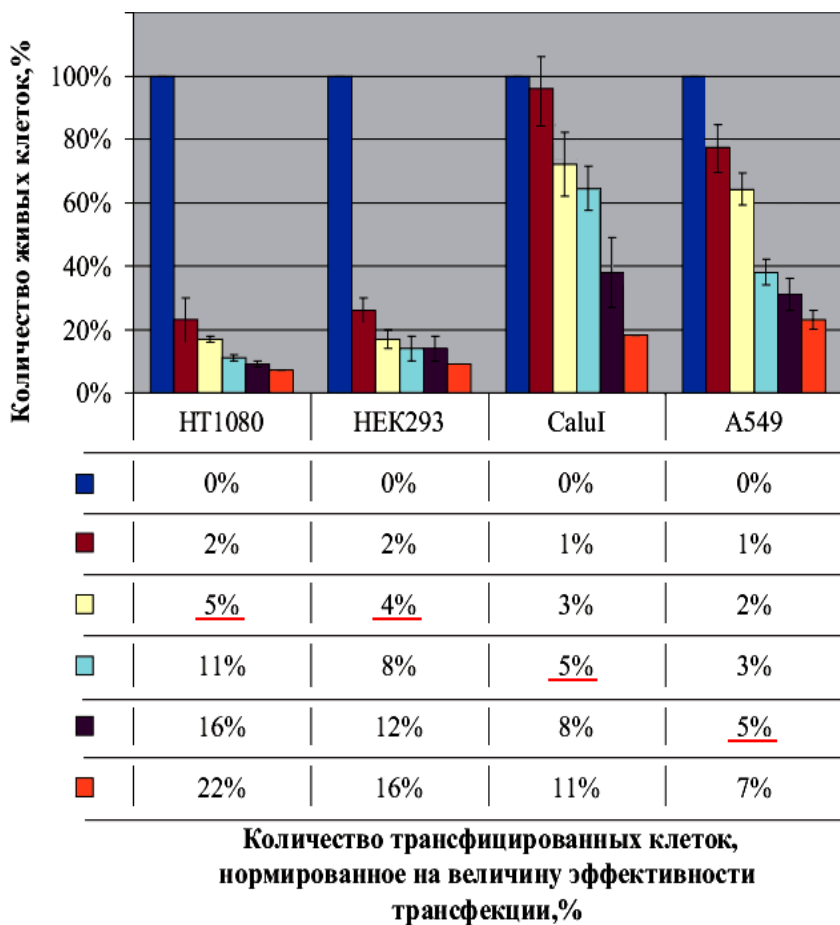


Рисунок 7. Определение «эффекта свидетеля» в системе *FCUI*/5-FC. Высота столбцов отражает среднее значение выживаемости клеток в MTS-тесте, рассчитанное как процентное отношение оптической плотности в средах трансфицированных клеток, обработанных 5-FC, к оптической плотности в средах трансфицированных клеток, не обработанных 5-FC. Под диаграммой приведены фактические значения доли *FCUI*⁺-клеток, рассчитанные для каждой клеточной линии как произведение эффективности трансфекции и процентного содержания трансфицированных клеток. Разброс значений соответствует стандартной ошибке среднего (SEM). Каждый эксперимент проводили минимум в трёх повторностях.

Результаты экспериментов, приведенные на

Рис. 7, указывают на то, что «эффект свидетеля» в ряду анализируемых клеточных линий изменяется следующим образом: HT1080 > HEK293 > A549 > Calu1.

Для того, чтобы оценить «эффект свидетеля» в разных клеточных линиях и исключить влияние эффективности трансфекции, мы определяли долю мёртвых опухолевых клеток при одинаковом числе $FCUI^+$ -клеток. Долю мёртвых клеток рассчитывали как «100% клеток - % выживших клеток» (Табл. 4, Рис. 7).

Таблица 4. Зависимость «эффекта свидетеля» в системе $FCUI/5-FC$ от индивидуальных особенностей клеточной линии.

Клеточная линия	Количество мёртвых клеток, %, при 5% $FCUI^+$ -клеток	IC ₅₀ для 5-FU, мкМ
HT1080	82 ± 11	4 ± 2
НЕК293	84 ± 7	13 ± 7
A549	65 ± 2	900 ± 204
CaluI	38 ± 4	110 ± 18

Значения IC₅₀ определяли минимум в трёх независимых экспериментах. Разброс соответствует стандартной ошибке среднего значения (SEM).

Из результатов эксперимента следует, что достаточно 5% клеток, экспрессирующих $FCUI$, чтобы вызвать гибель более 80% клеток опухоли для клеточных линий HT1080 и НЕК293. Для клеток линии A549 эта цифра составляет 65%, а для клеточной линии CaluI - 38%. Несмотря на более высокую чувствительность к 5-FU клеток CaluI по сравнению с клетками A549, «эффект свидетеля» для клеток A549 был выше. Данное явление может быть обусловлено более эффективным метаболизмом образующегося 5-FU в клетках CaluI, что может приводить к высвобождению из $FCUI^+$ -клеток CaluI меньшего количества токсичного метаболита.

Для оценки вклада второго фермента FUR1 в реализацию цитотоксического эффекта системы $FCUI/5-FC$ было проведено сравнение чувствительности трансфицированных и нетрансфицированных клеток к 5-FU. Клетки четырёх клеточных линий HT1080, НЕК293, CaluI и A549 были трансфицированы вектором pCMV- $FCUI$ и инкубировались с 5-FU в течение 120 ч. Полученные результаты суммированы в Табл. 5.

Полученные результаты (Табл. 5) косвенно указывают на то, что продукт экспрессии гибридного гена $FCUI$ обладает активностями каждого из двух ферментов: FCY1 и FUR1. Из результатов, приведенных в Табл. 5, следует, что FUR1 повышает чувствительность клеточной линии НЕК293 к 5-FU в 26 раз, CaluI – в 9 раз, A549 и HT1080 – в 2 раза. Исходя из того, что значения IC₅₀ по 5-FC для трансфицированных клеток выше значений IC₅₀ по 5-FU для тех же, но нетрансфицированных клеток (Табл. 5) (при сохраняющейся величине эффективности трансфекции), можно сделать вывод о том, что лимитирующей стадией в реализации цитотоксического эффекта можно считать стадию накопления 5-FU внутри клетки. На примере клеточной линии A549 с низкой чувствительностью к 5-FU, можно

видеть, что использование второго фермента в разы повышает эффективность 5-FC-зависимой супрессии.

Таблица. 5. Чувствительность к 5-FU нетрансфицированных клеток и клеток, трансфицированных конструкцией pCMV-FCUI.

Клеточная линия	IC ₅₀ для 5-FU, мкМ	Трансфицированные клетки IC ₅₀ для 5-FU, мкМ	Трансфицированные клетки IC ₅₀ для 5-FC, мкМ
HEK293	13 ± 7	0,5 ± 0,02	50 ± 9
CaluI	110 ± 18	12 ± 3	240 ± 10
HT1080	4 ± 2	2 ± 0,5	233 ± 13
A549	900 ± 204	420 ± 120	946 ± 180

Значения IC₅₀ определяли минимум в трёх независимых экспериментах. Разброс соответствует стандартной ошибке среднего значения (SEM).

Таким образом, в данной работе были созданы и охарактеризованы по цитотоксическому эффекту GEPDT системы на основе FCUI/5-FC, в которых суицидальный ген находился под контролем различных регуляторных элементов. Созданные цитотоксические системы, обладая опухолеспецифичностью, продемонстрировали цитотоксический эффект, сопоставимый с системой, в которой экспрессию суицидального гена направляет сильный конститутивный промотор pCMV. При этом показано, что система FCUI/5-FC обладает высоким «эффектом свидетеля»: менее 5 % клеток, экспрессирующих ген FCUI достаточно, вызвать гибель более 80% клеток опухоли. Приведенные выше данные также указывают на то, что созданная система FCUI/5-FC эффективна с точки зрения терапии опухолей обладающих устойчивостью к 5-FU.

ВЫВОДЫ

1. Получены экспрессионные конструкции, содержащие гибридный ген *FCUI*, кодирующий белок, состоящий из цитозиндезаминазы и фосфорибозилтрансферазы дрожжей, под контролем различных регуляторных элементов: раннего промотора цитомегаловируса (pCMV), промотора pSurv4 гена *BIRC5*, кодирующего сурвивин человека, промотора pmNUS гена *NDUFV1*, промоторов pTug гена тирозиназы мыши и pMIA гена *MIA* человека.
2. Показано, что в культурах клеток *FCUI* под контролем этих промоторов способен эффективно конвертировать нетоксичный предшественник 5-фторцитозин в цитотоксичные продукты дезаминирования и фосфорибозилирования: 5-фторурацил, 5-фтор-УМФ, и 5-фтор-УТФ.
3. Показано, что экспрессия гибридного гена *FCUI*, находящегося под контролем промотора pSurv4, носит p53-зависимый характер. Цитотоксический эффект системы pSurv4/*FCUI*/5-фторцитозин снижен или практически отсутствует в клетках, содержащих белок p53 дикого типа.
4. Сконструирована система усиления опухолеспецифической экспрессии гена *FCUI*, в которой используется сочетание двух экспрессирующих конструкций: гена рекомбиназы *Cre* под контролем промотора pSurv4 и гена *FCUI*, отделенного от промотора pCMV терминатором транскрипции вируса SV40, который содержит по краям сайты узнавания рекомбиназы *Cre* (loxP-сайты). Показано, что одновременное введение этих двух конструкций в клеточные линии с фенотипом p53(-) приводит в присутствии 5-фторцитозина к увеличению цитотоксического эффекта в 4-5 раз по сравнению с прямой регуляцией экспрессии *FCUI* промотором pSurv4. Это происходит за счет *Cre* зависимого удаления терминатора, приводящего к экспрессии гена *FCUI* под контролем сильного промотора pCMV. Использование системы *Cre-LoxP* не приводит к усилению экспрессии гена *FCUI* в клетках с фенотипом p53(+).
5. Показано, что экспрессия гена *FCUI*, направляемая промотором pmNUS, вызывает высоко тканеспецифическую, 5-фторцитозин-зависимую супрессию клеток опухолей яичка герминогенного происхождения (Tera-1): более 60% клеток погибает спустя 48 часов после добавления в среду 5-фторцитозина. Цитотоксический эффект, обусловленный экспрессией гена *FCUI* под контролем промотора pmNUS в присутствии 5-фторцитозина, сопоставим с цитотоксическим эффектом, вызываемым экспрессией гибридного гена *FCUI* под контролем промотора pCMV.

6. Показано, что экспрессия гена *FCUI*, в клетках меланомного происхождения направляемая меланомо-специфическими регуляторными элементами (тандем из трёх энхансеров тирозиназы мыши в сочетании с промоторами рТуг мыши или рМІА человека), в присутствии 5-фторцитозина вызывает высоко тканеспецифическую супрессию роста клеток: более 70% клеток погибает спустя 120 часов после добавления 5-фторцитозина.

7. Полученные системы могут использоваться для целей генно-терапевтического лечения рака.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ДИССЕРТАЦИИ ИЗЛОЖЕНЫ В СЛЕДУЮЩИХ ПУБЛИКАЦИЯХ

Публикации в научных журналах

1. **Denis V. Kuzmin**, Tatyana V. Vinogradova, Eugene P. Kopantzev and Eugene D. Sverdlov. Cre-LoxP Mediated Strong Enhancement of pBIRC5 Promoter Driven Suicide of Cancer Cells with CD/UPRT and Fluorocytosine. The Open Gene Therapy Journal, 2010, 3, 31-39.
2. **Kuzmin D.**, Gogvadze E, Kholodenko R, Grzela DP, Mityaev M, Vinogradova T, Kopantzev E, Malakhova G, Suntsova M, Sokov D, Ivics Z, Buzdin A. Novel strong tissue specific promoter for gene expression in human germ cells. BMC Biotechnol, 2010, **10**:58.

Материалы российских и международных конференций

1. **Koosmin D.V.**, Mityaev M.V., Vinogradova T.V., Kopantsev E.P., Sverdlov E.D. Study of the influence of gene- engineered constructs, carrying gene of suicidal action under the control of tumor specific promoter in the human cancer cell lines. International Conference on Biomolecular Science in honor of the 75th anniversary of the birth of Professor Yuri Ovchinnikov. Moscow, Russia, September 29 – October 2, 2009. Abstract book, v.2, p.119.
2. **Koosmin D.V.**, Kuzmich A.I., Vinogradova T.V., Kopantsev E.P., Sverdlov E.D. Study Of The pBIRC5 Promoter Driven Suicide Of Cancer Cells With CD/UPRT And Fluorocytosine. VI Московский международный конгресс "Биотехнология: состояние и перспективы развития", Москва, 21-25 марта 2011 г., сборник тезисов устных и стендовых докладов, стр. 76-77.
3. **Кузьмин Д.В.**, Кузьмич А.И., Виноградова Т.В., Копанцев Е.П., Сverdlov Е.Д. Индукция гибели раковых клеток человека системой CD/UPRT/5-FC под контролем различных промоторов. 15-ая Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2011), сборник тезисов устных и стендовых докладов, стр. 156-157.