Влияние рекомбинантного гистона H1.3 на эффективность лентивирусной трансдукции клеток человека in vitro

В.В. Соловьева [1], А.А. Исаев [2], Д.Д. Генкин [3], А.А. Ризванов [1]

[1] Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

[2] Институт Стволовых Клеток Человека, Москва

[3] Фармсинтез, Санкт-Петербург

Influence of recombinant histone H1.3 on the efficiency of lentiviral transduction of human cells in vitro

V.V. Solovyeva [1], A.A. Isaev [2], D.D. Genkin [3], A.A. Rizvanov [1]

[1] Kazan (Volga region) federal university, Kazan

[2] Human Stem Cells Institute, Moscow

[3] OJSC «Pharmsynthez», Saint-Petersburg

Лентивирусные векторы широко применяют в генетической модификации клеток человека и животных (лентивирусная трансдукция) для повышения их терапевтического потенциала за счёт экспрессии рекомбинантных протекторных и трофических факторов. Генетическая модификация клеток in vitro или ex vivo позволяет достичь специфичности вирусной трансдукции, так как модифицированными оказываются лишь клетки, с которыми проводят манипуляции в лабораторных условиях. Кроме того, введение генетически модифицированных клеток, а не чистого вируса, позволяет исключить попадание свободных вирусных частиц в организм реципиента. Такой подход позволяет контролировать продукцию терапевтических генов, иммуногенность вирусных векторов и вирусную трансдукцию. На сегодняшний день используют различные подходы для повышения эффективности лентивирусной трансдукции (поликатионы, протамин сульфат и др.), однако эти методы имеют низкую эффективность или высокую токсичность. В работе впервые показано, что рекомбинантный гистон H1.3 повышает эффективность лентивирусной трансдукции более чем в 2 раза и не оказывает токсического действия на клетки-мишени в широком диапазоне исследуемых концентраций.

Ключевые слова: гистон H1.3, лентивирусы, ретровирусы, трансдукция, цитотоксичность.

Lentiviral vectors are widely used in genetic modification of human and animal cells (lentiviral transduction) to enhance their therapeutic potential by expression of recombinant protective and trophic factors. Genetic modification of cells in vitro or ex vivo achieves the specificity of viral transduction, as modified are just cells that have been manipulated in the laboratory. In addition, the introduction of genetically modified cells, but not pure virus, helps to avoid introduction of viral particles into the body of the recipient. This approach allows us to control the expression of therapeutic genes, the immunogenicity of viral vectors and viral transduction. To date, different approaches are used to improve the lentiviral transduction (polycations, protamine sulfate, etc.), but these methods suffer from limited efficacy or high toxicity. For the first time we demonstrated that the recombinant histone N1.3 increases the efficiency of lentiviral transduction by more than 2 times and has no toxic effect on target cells in a wide range of concentrations studied.

Key words: histone H1.3, lentiviruses, retroviruses, transduction, cytotoxicity.

Новым подходом, потенциально способным повысить эффективность генной и клеточной терапии, может стать использование генетических векторов на основе вирусов. Широкое применение в генной терапии нашли векторные системы на основе ретровирусов, разрешенные для клинического применения [1–4]. В настоящее время активно исследуются лентивирусы (сложные ретровирусы), которые способны инфицировать как делящиеся, так и не делящиеся клетки. Несмотря на это, применение вирусов ограничено в связи с их потенциальной онкогенностью и иммуногенностью. Комбинирование генной и клеточной терапии повышает эффективность переноса генетического материала, позволяет избежать иммунного ответа, ограничивающего введение вирусных векторов напрямую в ткани реципиента, а также способствует продлению терапевтического эффекта. Однако большинство существующих методов генетической модификации клеток in vitro имеют низкую эффективность или высокую токсичность.

На сегодняшний день используют различные подходы для повышения эффективности вирусной трансдукции (применение поликатион декстрана [5], поликатион полибрена [6], протамин сульфата [7] и др.), однако эти методы обладают рядом недостатков, препятствующих их применению в клинике. В связи с этим, остро стоит вопрос поиска новых эффективных и биологически безопасных методов генетической модификации клеток.

Гистоновые и другие ядерные белки могут служить эффективными векторами для переноса генов в клетки. Трансфекция эукариотических клеток комплексами нуклеиновых кислот с гистонами (гистонофекция) эффективно проходит с различными представителями семейства гистонных белков [8–16]. Механизм гистонофекции рассмотрен ранее в обзоре [17]. Рекомбинантный гистон H1.3 в составе препарата «Онкохист» уже прошел в Европе I стадию клинических испытаний, доказавших его безопасность, а также косвенно подтвердивших эффективность при лечении острого миелоидного лейкоза и неходжкинской лимфомы. Гистон H1.3 имеет выраженный положительный заряд, как и поликатион полибрена и протамин сульфат, что, предположительно, может

e-mail: rizvanov@gmail.com

приводить к повышению вирусной трансдукции по схожему механизму действия. Таким образом, биологически безопасный рекомбинантный гистон H1.3 может стать эффективным заменителем известных ранее катионных препаратов для повышения эффективности вирусной трансдукции.

Целью работы явилось исследование влияние рекомбинантного гистона H1.3 на эффективность инфицирования (трансдукции) клеток рекомбинантным лентивирусом.

Материал и методы

Культуры клеток. Все работы с культурами клеток проводили в стерильном ламинарном боксе с соблюдением общепринятых правил работы в лаборатории II класса биобезопасности. Эмбриональные клетки почки человека HEK-293T (ATCC, CRL-11268) и клетки линии HeLa (ATCC, CCL-2) культивировали в среде Игла, модифицированной по методу Дульбекко (Sigma, США), с добавлением 10% сыворотки крови плодов коровы (Sigma, США), 2 мМ L-глутамина и 1% смеси антибиотиков пенициллина и стрептомицина (Sigma, США). Клетки инкубировали при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO_2. Пересев клеток проводили при плотности клеточного монослоя 90% с применением 0,25% раствора 1x трипсина-ЭДТА (Sigma, США).

Определение цитотоксичности гистона H1.3. Цитотоксичность гистона H1.3 определяли колориметрически MTS-тестом [18, 19] с помощью реагента CellTiter 96® AQueous MTS Reagent Powder (Promega, США) на планшетном анализаторе CERES 900HDi (Bio-TekInstruments Inc., США) через 24, 48 и 72 ч. после добавления гистона H1.3 в концентрации 50, 250 и 1000 мкг/мл к клеткам линии HeLa (в 4-х повторностях). Оптическую плотность измеряли при длине волны 490 нм. Статистический анализ проводили с помощью программы Microsoft Excel 2007, используя *t*-критерий Стьюдента.

Получение рекомбинантного лентивируса. Рекомбинантный лентивирус (GFP-LV), экспрессирующий зеленый флуоресцентный белок (green fluorescent protein, GFP), получали с помощью котрансфекции клеток HEK-293T плазмидами, кодирующими разные компоненты рекомбинантного вируса: оболочечная плазмида pCMV-VSV-G (AddGene № 8454), упаковочная плазмида psPAX2 (AddGene № 12260) и векторная плазмида pWPT-GFP (AddGene № 12255). Трансфекцию осуществляли стандартным кальций-фосфатным методом [20].

Трансдукция клеток линии HeLa рекомбинантным лентивирусом. Клетки линии HeLa культивировали в 24-луночном планшете до плотности клеточного монослоя 50%. Далее клетки инфицировали рекомбинантным лентивирусом GFP-LV, экспрессирующим GFP. Для этого к клеткам HeLa добавляли рекомбинантный лентивирус, или смесь лентивируса с гистоном H1.3, или смесь лентивируса с протамин сульфатом. Гистон H1.3 «Онкогист» добавляли в лунку в количестве 125 мкг на 500 мкл среды (конечная концентрация 250 мкг/мл). Протамин сульфат добавляли в лунку в количестве 5 мкг на 500 мкл среды (конечная концентрация 10 мкг/мл). Клетки инкубировали в течение 48 ч, после чего определяли степень инфицирования клеток рекомбинантным лентивирусом по экспрессии и флуоресценции GFP на проточном цитометре Guava easyCyte 8HT (Millipore, США) и на инвертированном флуоресцентном микроскопе AxioOberver.Z1 (Carl Zeiss, Германия).

Результаты и обсуждение

Эксперименты по исследованию цитотоксичности гистона H1.3 на клетки линии HeLa показали, что в широком диапазоне исследуемых концентраций гистон H1.3 не оказывает токсического действия на культуру клеток HeLa. Гистон H1.3 в концентрациях 50 мкг/мл и 250 мкг/мл не оказывал токсического действия на жизнеспособность клеток линии HeLa на протяжении 72 ч. инкубации. Добавление 1000 мкг/мл гистона H1.3 оказывало токсический эффект на клетки, начиная с 24 ч инкубации. Их жизнеспособность была статистически значимо ниже по сравнению с контролем без добавления гистона H1.3 (рис. 1). Для дальнейшего исследования влияния гистона H1.3 на лентивирусную трансдукцию была выбрана нетоксичная концентрация – 250 мкг/мл.

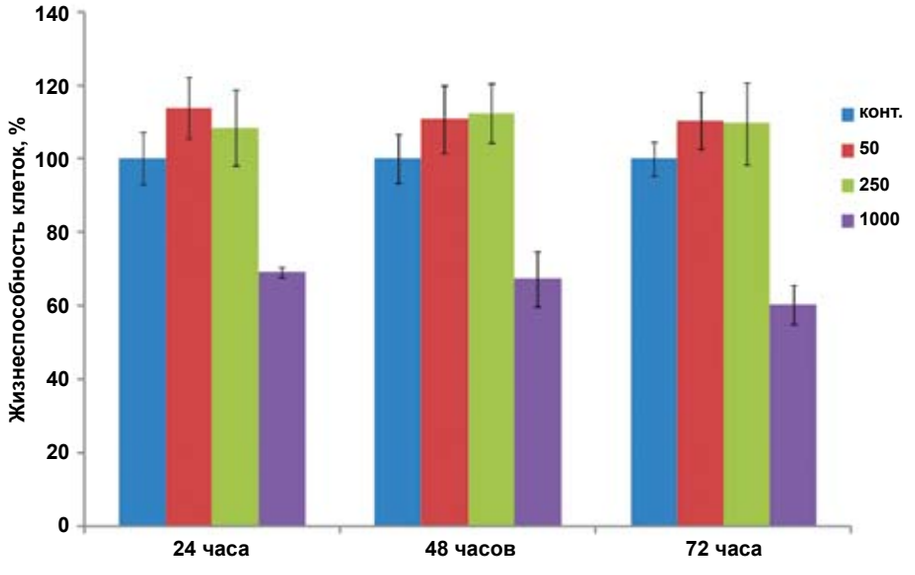

Рис. 1.
Цитотоксичность гистона H1.3 на клетки линии HeLa. Определение жизнеспособности с помощью MTS–теста через 24, 48 и 72 ч инкубации с гистоном H1.3.
Конт. – контроль без добавления гистона H1.3; 50, 250, 1000 – концентрации гистона H1.3 (мкг/мл) в эксперименте. Результаты представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение (n = 4)

В работе использовали рекомбинантный лентивирус GFP-LV на основе ВИЧ-1, экспрессирующий GFP. На рис. 2 приведены данные проточной цитофлуориметрии клеток, трансдуцированных рекомбинантным лентивирусом GFP-LV. Культуру клеток или раствор лентивируса обрабатывали рекомбинантным гистоном H1.3 в различных комбинациях. Эффективность вирусной трансдукции определяли по экспрессии репортерного гена *gfp*. Ген *gfp* входит в состав генома рекомбинантного лентивируса и, в данном случае, ведёт себя как типичный вирусный ген. Для экспрессии лентивирусных генов необходимо, чтобы провирус встроился (интегрировался) в геном клетки хозяина. После встраивания в геном клетки хозяина начинается экспрессия вирусных генов – транскрипция мРНК и трансляция белка. Таким образом, наличие зеленой флуоресценции клеток свидетельствует об успешной вирусной трансдукции.

В связи с тем, что популяция клеток обладает естественной гетерогенностью по уровню автофлуоресценции, пороговое значение флуоресценции было выбрано таким образом, что 99,5% клеток считались не флуоресцирующими, а 0,5% клеток, соответственно, считались ложно-положительными по флуоресценции (рис. 2А). После лентивирусной трансдукции без добавления гистона H1.3 или протамин сульфата 9,21% клеток HeLa обладали флуоресценцией (рис. 2Б). При лентивирусной трансдукции с добавлением протамин сульфата 12,73% клеток обладали зеленой флуоресценцией (рис. 2В). Таким образом, добавление протамин сульфата повысило эффективность вирусной трансдукции на 38,22% по сравнению с GFP-LV без добавок. Обработка клеток рекомбинантным гистоном H1.3 перед лентивирусной трансдукцией не привела к увеличению эффективности трансдукции, при этом только 8,16% клеток обладали флуоресценцией (рис. 2Г). Обработка клеток рекомбинантным гистоном H1.3 после лентивирусной трансдукции повысила эффективность вирусной трансдукции на 213,59% по отношению с GFP-LV без добавок. При этом 27,19% клеток обладали флуоресценцией (рис. 2Д). При трансдукции смесью рекомбинантного лентивируса GFP-LV и рекомбинантного гистона H1.3 23,75% клеток обладали флуоресценцией. Таким образом, смесь GFP-LV с H1.3 повысила эффективность вирусной трансдукции на 186,57% по сравнению с GFP-LV без добавок (рис. 2Е).

Таким образом, показано, что рекомбинантный гистон H1.3 повышает эффективность лентивирусной трансдукции более чем в 2 раза и не оказывает токсического действия на клетки-мишени в широком диапазоне исследуемых концентраций.

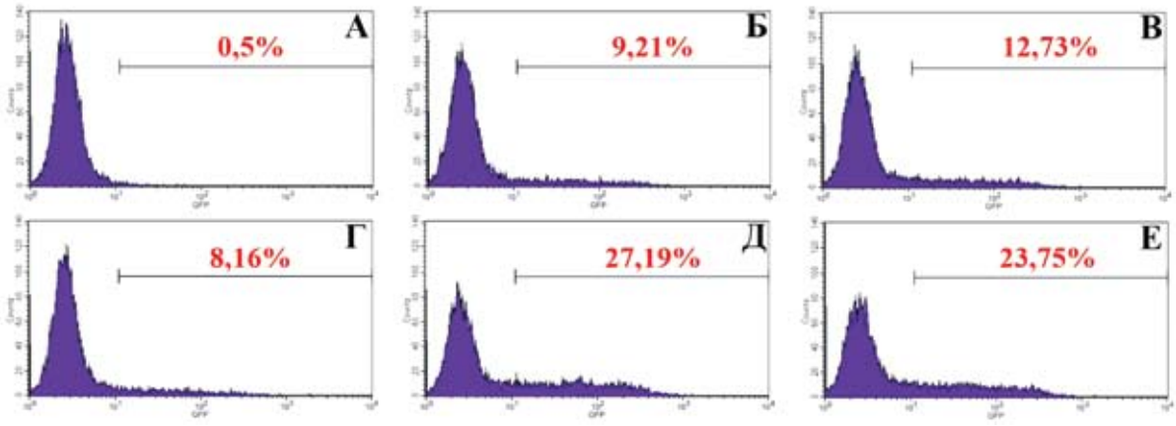

Рис. 2. Гистограммы распределения GFP–флуоресценции в культуре клеток HeLa, 48 ч после лентивирусной трансдукции:
А – не трансдуцированные клетки (контроль фоновой флуоресценции);
Б – клетки, трансдуцированные рекомбинантным лентивирусом GFP–LV;
В – клетки, трансдуцированные GFP–LV с добавлением протамин сульфата;
Г – клетки, предварительно обработанные рекомбинантным гистоном H1.3 и затем трансдуцированные GFP–LV;
Д – клетки, трансдуцированные GFP–LV и затем обработанные гистоном H1.3;
Е – клетки, трансдуцированные смесью лентивируса GFP–LV и гистона H1.3.
Проточная цитофлуориметрия.

Благодарности

Работа финансировалась ОАО «Институт стволовых клеток человека». Работа выполнена на оборудовании Федерального центра коллективного пользования физико-химических исследований веществ и материалов (ФЦКП ФХИ) и Научно-образовательного центра фармацевтики Казанского (Приволжского) федерального университета.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Seroogy C.M., Fathman C.G. The application of gene therapy in autoimmune diseases. Gene Ther. 2000; 7(1): 9–13.

2. Kohn D.B., Bauer G., Rice C.R. et al., A clinical trial of retroviral-mediated transfer of a rev-responsive element decoy gene into CD34(+) cells from the bone marrow of human immunodeficiency virus-1-infected children. Blood 1999; 94(1): 368–71.

3. Nemunaitis J., Fong T., Robbins J.M. et al. Phase I trial of interferon-gamma (IFN-gamma) retroviral vector administered

intratumorally to patients with metastatic melanoma. Cancer Gene Ther. 1999; 6(4): 322–30.

4. Shand N., Weber F., Mariani L. et al. A phase 1-2 clinical trial of gene therapy for recurrent glioblastoma multiforme by tumor transduction with the herpes simplex thymidine kinase gene followed by ganciclovir. GLI328 European-Canadian Study Group. Hum. Gene Ther. 1999; 10(14): 2325–35.

5. Duc-Nguyen H., Enhancing effect of diethylaminoethyl-dextran on the focus-forming titer of a murine sarcoma virus (Harvey strain). J. Virol. 1968; ([6): 643–4.

6. Manning J.S., Hackett A.J., Darby N.B. Effect of polycations on sensitivity of BALD-3T3 cells to murine leukemia and sarcoma virus infectivity. Appl. Microbiol. 1971; 22(6): 1162–3.

7. Cornetta K., Anderson W.F. Protamine sulfate as an effective alternative to polybrene in retroviral-mediated gene-transfer: implications for human gene therapy. J. Virol. Methods. 1989; 23(2): 187–94.

8. Zaitsev S., Buchwalow I., Haberland A. et al. Histone H1-mediated transfection: role of calcium in the cellular uptake and intracellular fate of H1-DNA complexes. Acta Histochem. 2002; 104(1): 85–92.

9. Budker V., Hagstrom J.E., Lapina O. et al. Protein/amphipathic polyamine complexes enable highly efficient transfection with minimal toxicity. Biotechniques 1997; 23(1): 139: 142–7.

10. Fritz J.D., Herweijer H., Zhang G. et al. Gene transfer into mammalian cells using histone-condensed plasmid DNA. Hum. Gene Ther. 1996; 7(12): 1395–404.

11. Haberland A., Knaus T., Zaitsev S.V. et al. Histone H1-mediated transfection: serum inhibition can be overcome by $Ca2^{+}$ ions. Pharm. Res. 2000; 17(2): 229–35.

12. Lucius H., Haberland A., Zaitsev S. et al. Structure of transfection-active histone H1/DNA complexes. Mol. Biol. Rep. 2001; 28(3): 157–65.

13. Zaitsev S.V., Haberland A., Otto A. et al. H1 and HMG17 extracted from calf thymus nuclei are efficient DNA carriers in gene transfer. Gene Ther. 1997; 4(6): 586–92.

14. Demirhan I., Hasselmayer O., Chandra A. et al., Histone-mediated transfer and expression of the HIV-1 tat gene in Jurkat cells. J. Hum. Virol. 1998; 1(7): 430–40.

15. Bottger M., Zaitsev S.V., Otto A. et al., Acid nuclear extracts as mediators of gene transfer and expression. Biochim. Biophys. Acta. 1998; 1395(1): 78–87.

16. Puebla I., Esseghir S., Mortlock A. et al. A recombinant H1 histone-based system for efficient delivery of nucleic acids. J. Biotechnol. 2003; 105(3): 215–26.

17. Соловьева В.В., Ризванов А.А. Перенос рекомбинантных нуклеиновых кислот в клетки (трансфекция) с помощью гистонов и других ядерных белков. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия 2011; 6(3): 29–40.

18. Cory A.H., Owen T.C., Barltrop J.A. et al. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. Cancer Commun. 1991; 3(7): 207–12.

19. Barltrop J.A., Owen T.C. 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazoly)-3-(4-sulfophenyl)tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans as cell-viability indicators. Bioorg. Med. Chem. Lett. 1991; 1: 611–4.

20. Pear W.S., Nolan G.P., Scott M.L. et al. Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. PNAS USA 1993; 90(18): 8392–6.

Поступила 02.08.2012