

УДК 577.21

# Использование терминаторов транскрипции для создания трансгенных линий клеток яичников китайского хомячка (СНО) со стабильным и высоким уровнем экспрессии репортерного гена

Н. Б. Гасанов, С. В. Тоцаков, П. Г. Георгиев, О. Г. Максименко\*  
Институт биологии гена РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 34/5  
\*E-mail: mog@genebiology.ru  
Поступила в редакцию 25.03.2015

**РЕФЕРАТ** Клеточные линии млекопитающих широко используются для получения клеток-продуцентов рекомбинантных белков. Обычно стабильные трансгенные клеточные линии содержат много встроеного экспрессионного вектора в одном месте генома. Транскрипция через трансген может быть одной из причин репрессии целевого гена при длительном культивировании таких клеточных линий. В настоящей работе с целью предотвращения транскрипции через трансген использовали известные терминаторы транскрипции вируса SV40,  $\beta$ - и  $\gamma$ -глобиновых генов человека. Показано, что терминаторы транскрипции увеличивают и стабилизируют экспрессию репортерного гена *EGFP* в трансгенных линиях клеток яичников китайского хомячка (СНО). Таким образом, терминаторы транскрипции могут использоваться для получения культур клеток млекопитающих с высоким и стабильным уровнем наработки целевого белка.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** рекомбинантные белки, продукция белков в клеточных линиях, терминация транскрипции, инсуляторы, СНО.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** РБ – рекомбинантный белок; СНО – культура клеток яичников китайского хомячка; S/MAR – последовательности ДНК, ассоциированные с белками ядерного матрикса; инсуляторы – регуляторные элементы, которые блокируют взаимодействие между энхансером и промотором; UCOE – регуляторные элементы, содержащие сильные промоторы генов «домашнего хозяйства»; STAR – регуляторные элементы, которые защищают от HP1-зависимой репрессии; EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) – усиленный зеленый флуоресцентный белок; CMV – цитомегаловирус; SV40 – обезьяний вирус 40; HSV – вирус простого герпеса.

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время все большее число лекарственных препаратов получают в биореакторах, основанных на культурах клеток, и, прежде всего, клеток яичников китайского хомячка (СНО) [1, 2]. Однако основную проблему при производстве рекомбинантных белков в культурах клеток представляет крайне высокая себестоимость продукта. Один из способов оптимизации производства – усовершенствование векторов для получения трансгенов, что позволяет значительно снизить затраты в процессе получения и поддержания эффективных клеточных линий-продуцентов.

В биотехнологии наибольшее распространение для получения клеточных линий-продуцентов це-

левых белков получил метод трансфекции линейаризованной плазмидной ДНК [3, 4]. С помощью этого метода можно получить клеточные линии, которые содержат много копий экспрессионного вектора, обычно встроенных в одно, реже – в несколько геномных сайтов. Для экспрессии трансгена обычно применяют вирусные промоторы – цитомегаловирусный (CMV) и ранний промотор вируса SV40, а также сильные клеточные промоторы генов «домашнего хозяйства» [5].

С целью повышения эффективности трансфекции и стабильности экспрессии трансгена с начала 1990-х годов широко используют последовательности ДНК, обычно А/Т-богатые, которые, как показано в экспериментах *in vitro*, взаимодействуют с фрак-

цией ядерного матрикса (MAR, matrix attachment region) [6–8]. Существующая модель предполагает, что MAR-элементы, взаимодействуя с белками ядерного скелета, снижают зависимость уровня экспрессии генов, фланкированных MAR, от негативного эффекта окружающего хроматина.

Кроме этого, для защиты транскрипции трансгена от репрессии и негативного эффекта окружающего генома широко используют известные инсуляторы [9–11]. В биотехнологии наиболее часто применяют инсулятор HS4 (1.2 т.п.н.), найденный на границе  $\beta$ -глобинового домена в геноме курицы. Обычно в конструкцию перед целевым геном встраивают две копии инсулятора HS4. В некоторых случаях используют комбинации известных MAR и HS4-инсулятора либо мультимеризуют его коровую часть (500 п.н.) [9]. Такие элементы увеличивают как эффективность получения трансгенов, так и уровень экспрессии самого трансгена. Однако далеко не во всех культурах клеток и организмах HS4-инсулятор работает эффективно.

В биотехнологии также используют протяженные участки ДНК, включающие промоторы генов «домашнего хозяйства» (UCOE) [12, 13], и регуляторные элементы, обладающие способностью блокировать распространение зон гетерохроматина [12, 14].

В целом, можно констатировать, что пока не найдены универсальные регуляторные элементы с понятным механизмом действия, которые можно эффективно использовать в составе векторных конструкций всех типов, предназначенных для получения высокопродуктивных клеточных линий-продуцентов различных белков. Очевидно, что механизмы супрессии «чрезмерной» транскрипции должны существовать даже у самых сильных промоторов. Один из таких механизмов ограничения транскрипции – РНК-интерференция [15, 16]. Часто эффекты репрессии при встройке трансгена связаны с транскрипцией, проходящей через трансген. Например, транскрипция через энхансер приводит к инактивации его активности [17]. Длинные некодирующие РНК могут также рекрутировать на регуляторные элементы репрессивные комплексы [18]. На основе фактов, указывающих на негативную роль транскрипции, идущей через регуляторные элементы, в экспрессии трансгена, можно предположить, что прерывание транскрипции на границах трансгена должно позитивно влиять на процесс стабилизации экспрессии трансгена. В то же время только часть исследованных инсуляторов эффективно терминирует транскрипцию [19].

В данной работе с целью тестирования роли прерывания транскрипции в защите экспрессии трансгена использовали последовательности хорошо из-

ученных терминаторов транскрипции из  $\beta$ - ( $\beta$ t) и  $\gamma$ - ( $\gamma$ t) глобиновых генов [20, 21]. В качестве контроля использовали две копии наиболее хорошо описанного инсулятора HS4 (2×Ins) из  $\beta$ -глобинового локуса кур [22]. Показано, что терминаторы транскрипции способны значительно увеличивать стабильность экспрессии репортерного гена в клеточных пулах. При выведении отдельных стабильных клеточных линий конструкции с терминаторами характеризовались более высоким уровнем наработки продукта трансляции репортерного гена.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Создание конструкций

Для получения серии конструкций в вектор pEGFPN1 по сайту рестрикции PciI, расположенному перед геном *EGFP* выше цитомегаловирусного промотора на расстоянии 640 п.н. от точки старта транскрипции, встраивали различные последовательности: две tandemные копии коровой части инсулятора HS4 из  $\beta$ -глобинового локуса курицы (2×Ins) длиной 476 п.н., терминатор транскрипции SV40 (SV40pA) длиной 868 п.н., терминатор транскрипции из  $\beta$ -глобинового локуса человека ( $\beta$ t) длиной 1130 п.н., комбинированный элемент, состоящий из  $\beta$ t и 2×Ins. Для получения конструкции  $\beta$ t\_EGFP\_ $\gamma$ t в конструкцию  $\beta$ t\_EGFP по сайту рестрикции AflIII был встроены терминатор из  $\gamma$ -глобинового гена человека ( $\gamma$ t) длиной 1336 п.н.

### Получение трансфицированных клеточных линий

Экспрессию репортерного гена анализировали на культуре клеток яичников китайского хомячка (CHO-K1), наиболее широко применяемой в биотехнологической практике для наработки целевых белков.

Клетки CHO-K1 культивировали на среде DMEM, содержащей 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ L-глутамин, 35 мг/л L-пролина, а также коммерческий антибиотик Мусокилл-АВ (PAA Laboratories) в рабочей концентрации. Клетки пересевали 1 раз в 5 дней при концентрации  $10^5$  клеток/см<sup>2</sup> с разведением 1 : 20. Клетки культивировали при температуре 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> и высокой влажности. Культуру клеток трансфицировали рекомбинантными плазмидами. С целью более эффективной интеграции трансгенной конструкции плазмиды линейаризовали рестриктазой AraI. Трансфекцию проводили согласно следующему протоколу. Клетки, достигшие 70–80% от монослоя ( $8 \times 10^4$  клеток/см<sup>2</sup>), промыли культуральной средой, не содержащей сыворотки. Подготавливали смесь для трансфекции: 3–4

мкг линейризованной плазмидной ДНК смешивали с 375 мкл культуральной среды, не содержащей сыворотки. В отдельной пробирке с таким же количеством аналогичной среды смешивали коммерческий трансфицирующий реагент Lipofectamine 2000, количество которого рассчитывали исходя из соотношения 3 мкл реактива на 1 мкг плазмидной ДНК. После этого растворы объединяли и инкубировали при комнатной температуре в течение 30–40 мин. Трансфекционную смесь наслаивали на промытые клетки. Через 4–6 ч после начала трансфекции трансфекционную смесь заменяли на культуральную среду DMEM с сывороткой.

Анализ уровня экспрессии репортерного гена оценивали по интенсивности флуоресценции на вторые сутки после трансфекции (36–48 ч) при помощи проточной цитофлуориметрии на приборе MACSQuant Analyzer VYB (Miltenyi Biotec). В качестве отрицательного контроля использовали нетрансфицированные клетки линии CHO-K1.

#### Цитофлуориметрический анализ

Для проведения цитофлуориметрического анализа клетки промывали фосфатно-солевым буфером, обрабатывали трипсином и снимали с чашек Петри. Затем дважды отмывали от трипсина и тщательно ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере. Полученную суспензию ( $10^6$  клеток в 1 мл буфера) переносили в 5 мл круглодонные пробирки.

Напряжение каналов проточного цитофлуориметра подбирали таким образом, чтобы не учитывать аутофлуоресценцию нетрансфицированных клеток. После проведения калибровки все образцы измеряли при постоянных значениях напряжений. Так, если в клетках детектировалась флуоресценция EGFP, на логарифмической шкале по соответствующему каналу фиксировалось появление клеток в области, превышающей значение «10», и все количественные значения уровня экспрессии гена измеряли именно в этой области.

#### Поддержание пулов трансфицированных клеток

После проведения трансфекции пулы клеток культивировали согласно приведенному выше протоколу. Клетки, не содержащие трансген, удаляли путем селекции пулов трансфицированных клеток при помощи коммерческого антибиотика генетина (Geneticin, Invitrogen), вводимого в концентрации 800 мкг/мл. Поскольку в результате подавления транскрипционной активности трансгена выработка продукта гена устойчивости к антибиотику с течением времени снижается, после культивирования клеток в течение 77 сут концентрация антибиотика была постепенно снижена до 200 мкг/мл.

#### Получение индивидуальных клонов

Пулы культивируемых клеток снимали с планшетов и разводили в 10 мл культуральной среды. После этого подсчитывали концентрацию клеток при помощи автоматического счетчика Scepter (Millipore) и разводили их таким образом, чтобы в 1 мл среды содержалось 2–3 клетки. Полученную суспензию переносили в 24-луночные планшеты (1 мл на лунку).

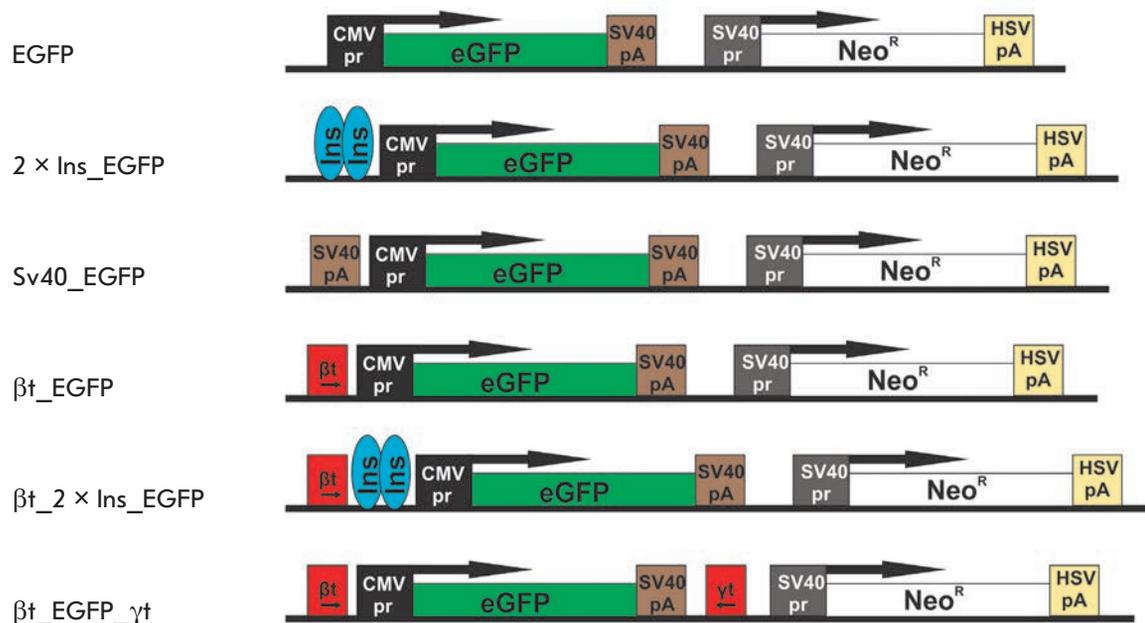
После 2 недель культивирования на среде DMEM, содержащей антибиотик Geneticin в концентрации 800 мкг/мл, проводили цитофлуориметрический анализ выживших клонов. Дальнейшее поддержание полученных линий и определение уровня экспрессии EGFP осуществляли согласно методике для пулов трансфицированных клеток. Интенсивность флуоресценции EGFP измеряли через каждые 15 сут.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении потенциальной роли терминаторов транскрипции в стабилизации уровня экспрессии трансгена в CHO-клетках в качестве репортерного использовали ген усиленного зеленого флуоресцентного белка (EGFP) под контролем CMV-промотора. Все опытные конструкции сравнивали с контролем, плазмидой pEGFPN1 (Clontech), содержащей в своем составе ген EGFP под контролем CMV-промотора (CMVpr) и терминатора транскрипции вируса SV40 (SV40pA) (конструкция EGFP на рис. 1). Помимо репортерного гена, данная плазида содержит ген устойчивости к антибиотику неомицину (Neo<sup>R</sup>) под контролем промотора SV40 (SV40pr) и терминатора транскрипции гена тимидинкиназы вируса простого герпеса (HSVpA). В данном случае ген неомицинустойчивости необходим для селекции трансфицированных клеток.

С целью оценки влияния процесса прерывания транскрипции, инициируемой перед встроенным трансгеном, на экспрессию репортерного гена использовали хорошо изученные терминаторы транскрипции гена β-глобина (βt) и SV40pA. В конструкциях (SV40\_EGFP и βt\_EGFP) эти терминаторы были встроены в прямой ориентации непосредственно выше CMV-промотора (рис. 1). Для полной изоляции репортерного гена от транскрипции, инициируемой в окружающем хроматине, создана производная конструкции βt\_EGFP (рис. 1), в которой в дополнение к β-глобиновому терминатору с 3'-стороны репортерного гена EGFP был встроена в обратной ориентации терминатор транскрипции из гена γ-глобина (βt\_EGFP\_γt). В такой конструкции репортерный ген защищен с обеих сторон от транскрипции, инициируемой из окружающего хроматина.

Для сравнения эффективности терминаторов транскрипции с известными на данный момент ре-



**Рис. 1.** Схемы конструкций, использованных для тестирования ДНК-элементов в культуре клеток CHO-K1. EGFP – контрольная плаزمида рEGFPN1, в которой ДНК-элементы отсутствуют. 2×Ins\_EGFP – контрольная конструкция, в которой выше цитомегаловирусного промотора встроены две копии инсультатора из β-глобинового локуса кур. SV40\_EGFP, βt\_EGFP, βt\_2×Ins\_EGFP – конструкции с терминаторами транскрипции, встроеными выше цитомегаловирусного промотора. βt\_EGFP\_γt – конструкция с терминаторами транскрипции, окружающими репортерный ген EGFP. Промоторы отмечены черным (цитомегаловирусный) и серым (вируса SV40) квадратами, терминаторы транскрипции – коричневыми (SV40), желтыми (тимидинкиназы вируса HSV), красными (β- и γ-глобиновые гены) квадратами. Гены изображены зелеными (EGFP) и белыми (неомицинустойчивость) прямоугольниками, стрелки показывают направление транскрипции. Инсультаторы представлены в виде голубых овалов

гуляторными элементами, стабилизирующими экспрессию трансгена в CHO-клетках, использовали элемент, состоящий из двух копий коровой части инсультатора HS4, встроеного непосредственно перед CMV-промотором (2×Ins\_EGFP, рис. 1). Наконец, для изучения кооперативного эффекта разных по функциям регуляторных элементов, инсультатора и терминатора транскрипции, была создана конструкция βt\_2×Ins\_EGFP, в которой перед двумя копиями инсультатора встроено β-глобиновое терминатор (рис. 1).

Уровень экспрессии репортерного гена при трансфекции разных вариантов конструкции определяли на культуре клеток яичников китайского хомячка (CHO-K1), наиболее широко применяемой в биотехнологической практике для наработки целевых белков. При этом трансфекцию проводили традиционным методом с помощью липосом.

Для определения степени подавления трансгена в пулах клеток, трансфицированных контрольными (рEGFP\_N1 и 2×Ins\_EGFP) и экспериментальными

(SV40\_EGFP, βt\_pEGFP, βt\_2×Ins\_EGFP, βt\_EGFP\_γt) конструкциями, каждые 15 сут при помощи проточной цитофлуориметрии оценивали уровень экспрессии репортерного гена (рис. 2). Средний уровень экспрессии гена EGFP в пуле клеток в определенный момент времени определяли по процентному содержанию клеток, значение интенсивности флуоресценции которых было больше «10» по логарифмической шкале, т.е. клеток, нарабатывающих значимое количество данного белка. При этом в данном эксперименте показателем эффективности того или иного регуляторного элемента для достижения высокого и стабильного уровня наработки белка служило отношение процентного содержания клеток, экспрессирующих EGFP, в пуле клеток, несущих конструкцию с данным элементом, к процентному содержанию экспрессирующих EGFP клеток с контрольной плазмидой (EGFP).

Результаты определения уровня экспрессии EGFP на протяжении 150 сут культивирования суммарной популяции трансфицированных клеток (что соот-

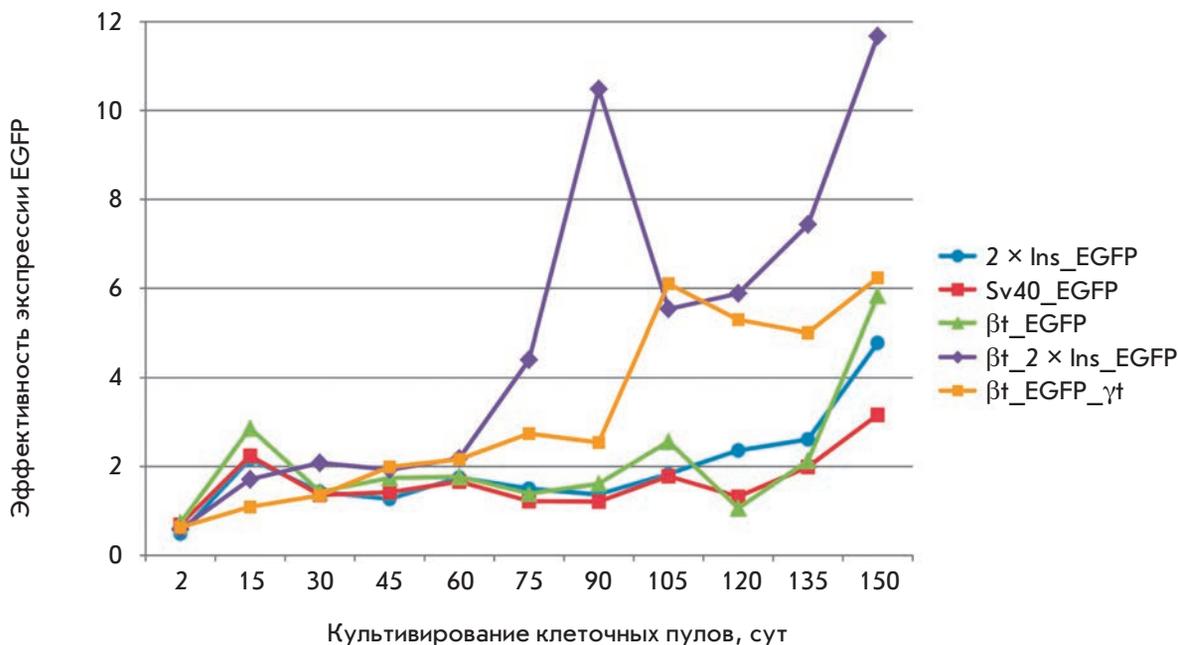


Рис. 2. Анализ уровня экспрессии репортерного гена *EGFP* в клеточных пулах, трансфицированных конструкциями. На гистограмме представлены результаты измерения флуоресценции стабильных клеточных пулов каждые 15 сут при помощи проточной цитофлуориметрии. На оси абсцисс – временные промежутки измерений. На оси ординат – эффективность экспрессии *EGFP*, определенная как отношение процентного содержания клеток, экспрессирующих *EGFP*, в пуле клеток, несущих конструкцию с данным элементом ( $2 \times \text{Ins\_EGFP}$ ,  $\text{SV40\_EGFP}$ ,  $\beta t\_EGFP$ ,  $\beta t\_2 \times \text{Ins\_EGFP}$ ,  $\beta t\_EGFP\_ \gamma t$ ), к процентному содержанию экспрессирующих *EGFP* клеток с контрольной плазмидой (*EGFP*). Средний уровень экспрессии гена *EGFP* в пуле клеток в определенный момент времени оценивали по процентному содержанию клеток с значением интенсивности флуоресценции больше «10» по логарифмической шкале в соответствующем канале. На гистограмме каждая кривая соответствует отдельной конструкции

ветствует примерно 30 пассажирам) свидетельствуют о том, что использование терминатора транскрипции перед промотором целевого гена значительно повышает эффективность наработки белка в ходе длительного культивирования: более чем в 3 раза – с терминатором SV40, в 5 раз – с терминатором  $\beta t$  в конце периода испытаний (рис. 2). Аналогичный эффект оказывал и регуляторный элемент, состоящий из двух копий инсуляторов.

Несколько более значительное увеличение уровня экспрессии *EGFP* наблюдалось в пуле клеток, трансфицированных плазмидой  $\beta t\_EGFP\_ \gamma t$ , в которой репортерный ген окружен терминаторами транскрипции (рис. 2). Таким образом, защита репортерного гена (с двух сторон) от транскрипции, инициируемой вне трансгена, повышает стабильность и эффективность экспрессии. Наконец, самые лучшие результаты (12-кратное увеличение) получены при комбинации терминатора транскрипции и двух копий инсулятора в плазмиде  $\beta t\_2 \times \text{Ins\_EGFP}$  (рис. 2). Можно сделать вывод, что два регуляторных элемента с разным механизмом действия аддитивно влияют

на стабильность и эффективность экспрессии репортерного гена.

На практике рекомбинантные белки нарабатывают, отбирая стабильные клеточные линии, полученные из одной трансфицированной клетки и, следовательно, имеющие однородный генотип, что позволяет исключить влияние различных негативных факторов и выделить самый эффективный клон с оптимальным местом интеграции конструкции в геноме.

Из суммарных клеточных популяций методом лимитирующих разведений после 30 сут культивирования были получены индивидуальные клеточные клоны. Основным количественным показателем экспрессионной активности репортерного гена в данном случае служила медиана распределения клеток по интенсивности флуоресценции.

Исходно получили 10 индивидуальных клонов с конструкцией *EGFP*, 17 – с конструкцией  $2 \times \text{Ins\_EGFP}$ , 10 – с конструкцией  $\text{SV40\_EGFP}$  и 10 – с конструкцией  $\beta t\_EGFP$ . Из них достаточно высокий уровень экспрессии *EGFP* имели два клон с кон-

Результаты анализа временного профиля экспрессии гена *EGFP* в индивидуальных клеточных клонах

Клон	Интенсивность флуоресценции (медиана распределения), 30 сут	Интенсивность флуоресценции (медиана распределения), 90 сут	Снижение активности экспрессии	Среднее значение
EGFP #1	23.71	2.35	0.1	0.1
EGFP #2	16.11	1.7	0.11	
2 × Ins_EGFP #1	69.78	9.73	0.14	0.13
2 × Ins_EGFP #2	116.52	3.59	0.03	
2 × Ins_EGFP #3	103.66	16.6	0.16	
2 × Ins_EGFP #4	33.08	5.99	0.18	
2 × Ins_EGFP #5	77.74	10.55	0.14	
SV40_EGFP #1	67.93	13.1	0.19	0.76
SV40_EGFP #2	339.82	82.79	0.24	
SV40_EGFP #3	50.25	134.45	2.68	
SV40_EGFP #4	7.04	2.37	0.34	
SV40_EGFP #5	3.31	1.24	0.37	
βt_EGFP #1	78.44	15.54	0.2	2.07
βt_EGFP #2	79.86	19.63	0.25	
βt_EGFP #3	76.35	14.46	0.19	
βt_EGFP #4	2.19	13.34	6.09	
βt_EGFP #5	15.75	56.74	3.6	

струкцией EGFP, пять клонов – 2×Ins\_EGFP, пять – SV40\_EGFP и шесть – βt\_EGFP.

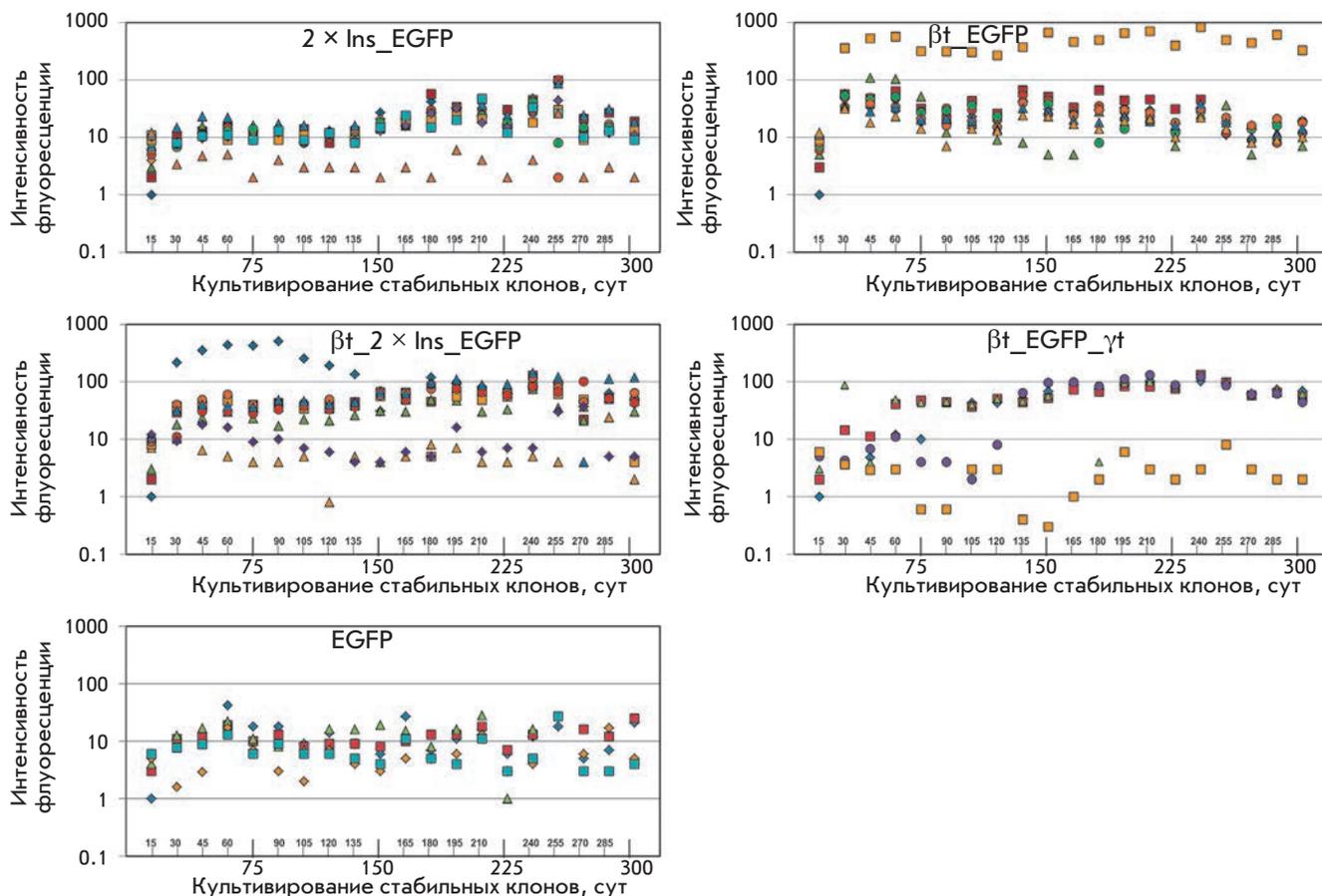
Необходимо отметить, что клоны с контрольной конструкцией исходно экспрессировали белок EGFP значительно слабее, чем клоны с конструкциями 2×Ins\_EGFP, SV40\_EGFP, βt\_EGFP (см. таблицу).

После культивирования в течение 2.5 месяцев уровень экспрессии *EGFP* в стабильных клеточных клонах с конструкциями EGFP и 2×Ins\_EGFP снизился приблизительно в 10 раз. При этом экспрессионная активность клонов, содержащих конструкции SV40\_pEGFP и βt\_pEGFP, составила в среднем около 75% от исходной.

Результаты измерения стабильных клеточных пулов показали, что наиболее эффективные клетки, характеризующиеся стабильной экспрессией репортерного гена, отбираются приблизительно после 90 сут культивирования. Поэтому с целью более детального изучения клонов, полученных из стабилизированной популяции клеток, провели еще одну процедуру выведения индивидуальных клеточных клонов из суммарных популяций методом лимитирующих разведений после 90 сут культивирования стабильных пулов.

Как и в предыдущем эксперименте, основным количественным показателем экспрессионной активности репортерного гена служила медиана распределения клеток по интенсивности флуоресценции. Исходно получено по 12 индивидуальных клонов с конструкциями EGFP, 2×Ins\_EGFP, βt\_

EGFP, βt\_2×Ins\_EGFP, βt\_EGFP\_γt. К концу эксперимента (300 суток культивирования клеточного клона) часть клонов погибла, поэтому представлены данные для пяти клонов с конструкцией EGFP, 12 – с конструкцией 2×Ins\_EGFP, 9 – с βt\_EGFP, 9 – с βt\_2×Ins\_EGFP, пять – с βt\_EGFP\_γt (рис. 3). Результаты измерений показывают, что полученные клоны EGFP имеют стабильный, но крайне низкий уровень флуоресценции (значения в среднем колеблются около 10). Чуть выше значения у клонов 2×Ins\_EGFP, среди которых только один клон имеет низкую активность, в то время как остальные попадают в район от 10 до 100. Клоны βt\_EGFP характеризуются еще более высокими средними значениями по сравнению с 2×Ins\_EGFP. Кроме этого, один из клонов βt\_EGFP показал сверхвысокие уровни флуоресценции (попал в район от 100 до 1000). Клоны βt\_2×Ins\_EGFP неожиданно разделились на две группы: одна (два клона) имела низкие значения флуоресценции, сравнимые со значениями клонов с конструкцией EGFP, тогда как у второй группы значения оказались гораздо более высокими (около 100), в среднем большими, чем у клонов 2×Ins\_EGFP и βt\_EGFP. Возможно, полученные различия в результатах связаны с использованием более сложной комбинации регуляторных элементов, нестабильной в определенных участках генома. Сходным образом проявилась активность и у клонов βt\_EGFP\_γt, среди которых один клон имел крайне низкий уровень флуоресценции, при этом остальные оказались в области высоко-



**Рис. 3.** Анализ уровня экспрессии репортерного гена *EGFP* в стабильных клеточных клонах, выведенных из трансфицированных пулов клеток. На гистограммах представлены результаты измерения флуоресценции стабильных клеточных клонов каждые 15 сут при помощи проточной цитофлуориметрии. На оси абсцисс приведены временные промежутки измерений. На оси ординат – логарифмическая шкала интенсивности флуоресценции *EGFP*, которую определяли как медиану распределения. Средний уровень экспрессии гена *EGFP* в пуле клеток в определенный момент времени оценивали как величину, прямо пропорциональную связанную с интенсивностью флуоресценции *EGFP*. Каждая точка на гистограмме соответствует отдельному клеточному клону

кой флуоресценции (в районе 100). По результатам данной серии опытов можно сделать вывод о высокой эффективности терминаторов транскрипции в процессе установления и поддержания высокого уровня синтеза целевого белка. При этом комбинированный элемент (терминатор, соединенный с инсулятором) и вариант с репортерным геном, окруженным терминаторами, характеризуются более высокими показателями эффективности синтеза целевого белка. Однако эти конструкции требуют более внимательного отбора клонов, так как некоторые клоны оказались по неизвестным причинам неэффективными.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленной работе показано, что терминаторы транскрипции, которые потенциально могут

изолировать трансген от транскрипционных сигналов, обладают способностью поддерживать уровень транскрипции трансгена на стабильно высоком уровне на протяжении достаточно длительного периода культивирования клеточных линий СНО-К1. Установлено также, что терминатор более эффективно по сравнению с инсулятором поддерживает стабильный уровень экспрессии трансгена в клонах. Более того комбинация терминатора транскрипции и инсулятора обладает аддитивным эффектом, усиливающим и стабилизирующим экспрессию трансгена. ●

*Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 14-24-00166).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kim J.Y., Kim Y.G., Lee G.M. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2012. V. 93. P. 917–930.
2. Hacker D.L., De Jesus M., Wurm F.M. // *Biotech. Advances.* 2009. P. 1023–1027.
3. Khan K.H. // *Adv. Pharm. Bull.* 2013. V. 3. P. 257–263.
4. Browne S.M., Al-Rubeai M. // *Trends Biotech.* 2007. V. 25. P. 425–432.
5. Lai T., Yang Y., Ng S.K. // *Pharmaceuticals (Basel)*. 2013. V. 6. P. 579–603.
6. Kim J.M., Kim J.S., Park D.H., Kang H.S., Yoon J., Baek K., Yoon Y. // *J. Biotech.* 2004. V. 107. P. 95–105.
7. Girod P.A., Zahn-Zabal M., Mermod N. // *Biotech. Bioeng.* 2005. V. 91. P. 1–11.
8. Harraghy N., Gaussin A., Mermod N. // *Curr. Gene Ther.* 2008. V. 8. P. 353–366.
9. Recillas-Targa F., Valadez-Graham V., Farrell C.M. // *BioEssays*. 2004. V. 26. P. 796–807.
10. Kwaks T.H., Otte A.P. // *Trends Biotechnol.* 2006. V. 24. P. 137–142.
11. Maksimenko O.G., Deykin A.V., Khodarovich Y.M., Georgiev P.G. // *Acta Naturae*. 2013. V. 5. № 1(16). P. 33–46.
12. Palazzoli F., Bire S., Bigot Y., Bonnin-Rouleux F. // *Nat. Biotechnol.* 2011. V. 29. P. 593–597.
13. Antoniou M., Harland L., Mustoe T., Williams S., Holdstock J., Yague E., Mulcahy T., Griffiths M., Edwards S., Ioannou P.A., et al. // *Genomics*. 2003. V. 82. P. 269–279.
14. Kwaks T.H.J., Barnett P., Hemrika W., Siersma T., Sewalt R.G., Satijn D.P., Brons J.F., van Blokland R., Kwakman P., Kruckeberg A.L., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2003. V. 21. P. 553–558.
15. Saxena A., Carninci P. // *BioEssays*. 2011. V. 33. P. 830–839.
16. Martjanov I., Ramadass A., Barros A.S., Chow N., Akoulitchev A. // *Nature*. 2007. V. 445. P. 666–670.
17. Erokhin M., Davydova A., Parshikov A., Studitsky V.M., Georgiev P., Chetverina D. // *Epigenetics Chromatin*. 2013. V. 6. P. 31.
18. Khalil A.M., Guttman M., Huarte M., Garber M., Raj A., Rivea M.D., Thomas K., Presser A., Bernstein B.E., van Oudenaarden A., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009. V. 106. P. 11667–11672.
19. Silicheva M., Golovnin A., Pomerantseva E., Parshikov A., Georgiev P., Maksimenko O. // *Nucleic Acids Res.* 2010. V. 38. P. 39–47.
20. Nojima T., Dienstbier M., Murphy S., Proudfoot N.J., Dye M.J. // *Cell Rep.* 2013. V. 25. P. 1080–1092.
21. Plant K.E., Dye M.J., Lafaille C., Proudfoot N.J. // *Mol. Cell Biol.* 2005. V. 25. P. 3276–3285.
22. Hanawa H., Yamamoto M., Zhao H., Shimada T., Persons D.A. // *Mol. Therapy*. 2009. V. 17. P. 667–674.