

УДК 612.017.1

# Регуляция экспрессии целевого белка (трансгена) в составе ДНК аденовирусного вектора с помощью агонистов Toll-подобных рецепторов

А. В. Багаев<sup>1</sup>, А. В. Пичугин<sup>1</sup>, Е. С. Лебедева<sup>1</sup>, А. А. Лысенко<sup>2</sup>, М. М. Шмаров<sup>2</sup>,  
Д. Ю. Логунов<sup>2</sup>, Б. С. Народицкий<sup>2</sup>, Р. И. Атауллаханов<sup>1\*</sup>, Р. М. Хаитов<sup>1</sup>, А. Л. Гинцбург<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, 115478, Москва, Каширское ш., 24, корп. 2

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

\*E-mail: ravshan.ataullakhanov@gmail.com

Поступила в редакцию 27.08.2014

**РЕФЕРАТ** Нереплицирующиеся рекомбинантные аденовирусные векторы (rAd) являются эффективным молекулярным инструментом для генной терапии и генной вакцинации. С помощью таких векторов нужные гены можно доставить и экспрессировать в клетках различных эпителиев, печени, в иммунных и кровеносных клетках животных и человека. Успех генной терапии и генной вакцинации зависит от интенсивности продукции целевого белка, кодируемого вектором. В представленной работе изучено влияние агонистов Toll-подобных рецепторов (TLR) на эффективность трансдукции и экспрессии rAd в антигенпредставляющих клетках животных и человека. Установлено, что агонисты TLR2, 4, 5, 7, 8 и 9 значительно усиливают продукцию белка в клетках, трансдуцированных rAd со вставкой гена этого белка. Эффект усиления реализуется в дендритных клетках и макрофагах, экспрессирующих цитоплазматический (GFP), мембранный (HA) или секреторный (SEAP) белки. На лабораторных мышах показано усиление экспрессии целевого белка с помощью фармацевтического агониста TLR4. В отличие от агонистов других TLR, агонист TLR3 подавляет продукцию GFP или SEAP в клетках, трансдуцированных rAd со вставкой гена этих белков. Предполагается, что усиление экспрессии целевого белка связано с активацией сигнального пути MyD88 → NF-κB, а подавление – с активацией сигнального пути TRIF → IRF. При активации обоих сигнальных путей агонистом TLR4 доминирует сигнал MyD88 → NF-κB, стимулирующий продукцию белка, кодируемого трансгеном в составе rAd.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** агонисты Toll-подобных рецепторов, генная терапия, генная иммунизация, рекомбинантные нереплицирующиеся аденовирусные векторы, экспрессия трансгенов.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** rAd – нереплицирующийся рекомбинантный аденовирусный вектор; TLR – Toll-подобный рецептор; БОЕ – бляшкообразующая единица; ПС – полная культуральная среда; БСА – бычий сывороточный альбумин; PBS – фосфатный буферный раствор; LTA – липотейхоевая кислота; Poly[I : C] – полиинозиновая : полицитидиловая кислота; LPS – липополисахарид; MPL-A – монофосфорильное производное липида А; TNF-α – фактор некроза опухоли α; GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор; CLI-095 – известен также, как TAK-242, селективный ингибитор TLR4-сигнализации; SEAP – секреторная эмбриональная щелочная фосфатаза; GFP – зеленый флуоресцентный белок; DAPI – 4',6'-диамидино-2-фенилиндолдигидрохлорид; HA – гемагглютинин вируса гриппа H1N1; CMV – цитомегаловирус; IL – интерлейкин.

## ВВЕДЕНИЕ

Нереплицирующиеся рекомбинантные аденовирусные векторы (rAd) применяются для экспрессии трансгена в клетках различного типа. В зависимости от гена rAd могут использоваться в генной

терапии (гены опухолевых супрессоров, факторов роста и др.) или генетической иммунизации (гены протективных антигенов возбудителей). В случае иммунизации антиген вырабатывается трансдуцированными клетками иммунизированного организ-

ма в течение 2–3 недель, что приводит к развитию интенсивного иммунного ответа. По такому принципу сконструированы вакцинные препараты против туберкулеза, малярии, гриппа и многих других актуальных инфекций. Большинство препаратов на основе rAd пока находятся на различных стадиях клинического изучения [1–5], и лишь один препарат зарегистрирован и разрешен к применению [6]. Однако уже накоплено достаточно сведений, чтобы считать иммуногены и вакцины на основе rAd безопасными и эффективными.

Иммунные реакции на нужный антиген, кодируемый rAd, можно усиливать с помощью агонистов Toll-подобных рецепторов (TLR) [3]. Мы создали оригинальную экспериментальную вакцину против гриппа, в состав которой входят rAd, кодирующие протективные антигены вируса гриппа, и фармацевтический агонист TLR4 – Иммуномакс® [7–9] – выделенный из растений водорастворимый высокомолекулярный кислый полисахарид с молекулярной массой более 1 МДа [10]. Использование Иммуномакса в качестве молекулярного адъюванта позволяет усилить реакции Т-клеток на антигены вируса гриппа и повысить защитные свойства вакцины. Кроме того, включение данного адъюванта в состав вакцины позволяет в 3–10 раз уменьшить дозу rAd, кодирующих антигены вируса гриппа, без потери ее иммуногенных и протективных свойств.

Иммуномакс не оказывает прямого воздействия на Т-клетки. Этот препарат активизирует антигенпредставляющие клетки, в частности дендритные клетки и макрофаги. В дендритных клетках Иммуномакс индуцирует усиленную экспрессию коактиваторных молекул, а именно: CD80, CD86, CD40, МНС класса II, а также секрецию иммуностимулирующих цитокинов IL1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL6, 8 и 12 [10]. Этих событий в антигенпредставляющих клетках вполне достаточно для проявления иммуностимулирующего действия Иммуномакса. Однако нельзя исключить, что Иммуномакс усиливает также продукцию антигенов, кодируемых трансгеном в составе rAd.

При иммунизации rAd синтез белка-антигена происходит непосредственно в антигенпредставляющих клетках, поэтому мы предположили, что Иммуномакс, наряду с коактиваторными молекулами и цитокинами, может стимулировать и продукцию белка-антигена. Такое влияние препарата могло бы вносить вклад в усиление ответа Т-клеток, распознающих антиген на поверхности антигенпредставляющих дендритных клеток.

В представленной работе нами изучена экспрессия белков, гены которых встроены в rAd, в ден-

дритных клетках и макрофагах, на которые воздействовали Иммуномаксом, а также агонистами других TLR. Полученные результаты свидетельствуют, что Иммуномакс в 2–11 раз усиливает интенсивность продукции белка-антигена в дендритных клетках и макрофагах. Усиление экспрессии наблюдалось при использовании rAd, кодирующих мембранный, цитоплазматический и секреторный белки. Подобно Иммуномаксу другой агонист TLR4 – липополисахарид из *Escherichia coli* – тоже стимулировал экспрессию трансгенных белков, кодируемых rAd. Более того, агонисты других рецепторов TLR, в частности TLR2, 5, 7, 8 и 9, усиливали экспрессию таких белков, тогда как агонист TLR3 не усиливал, а подавлял их продукцию. Сравнение внутриклеточных сигнальных путей от разных TLR позволило предположить, что сигнал, начинающийся с MyD88 и оканчивающийся фактором NF- $\kappa$ B, стимулирует, а сигнальный путь, использующий TRIF и оканчивающийся факторами транскрипции IRF-3 и IRF-7, подавляет продукцию белков, определяемую аденовирусным вектором. Сигнальный путь через MyD88 доминирует над сигналом через TRIF, поэтому при воздействии агониста TLR4, когда используются обе сигнальные ветви (MyD88 и TRIF), наблюдается усиление экспрессии трансгена.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Антитела и реагенты

Использованы следующие моноклональные антитела: CD11b-BD Horizon V450, Ly-6G APC-Cy7 (BD Pharmingen™), CD11c PE, CD19 eFluo450 (eBiosciences), F4/80 APC (BioLegend), Anti Mouse МНС II (I-A)-FITC (eBiosciences). Моноклональные антитела к гемагглютинину вируса гриппа H1N1 (HA) любезно предоставлены А.А. Куц (НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского МЗ России).

В работе были использованы агонисты Toll-подобных рецепторов: липотейхоевая кислота (LTA, лиганд TLR2), синтетический аналог двухцепочечной РНК – полиинозиновая : полицитидиловая кислота (Poly[I : C], лиганд TLR3), монофосфорильное производное липида А (MPL-A, лиганд TLR4), флагеллин (лиганд TLR5), имиквимод (лиганд TLR7/8), синтетический олигонуклеотид ODN-CpG 1826 (лиганд TLR9) – все препараты фирмы InvivoGen, а также липополисахарид из *E. coli* серотип 055:B5 (LPS, лиганд TLR4, Sigma, L-2880). Кроме того, в работе использовали рекомбинантный фактор некроза опухоли  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ , Sigma, T7539). В специальных экспериментах применяли CLI-095 (InvivoGen) – специфический ингибитор сигнального пути TLR4.

При микроскопии использовали краситель ДНК – дигидрохлорид DAPI (Sigma).

### Животные

Мышей линии BALB/c в возрасте 8–10 недель, полученных из питомника «Столбовая», содержали на стандартной диете в стандартных условиях вивария ГНЦ Института иммунологии ФМБА.

### Культуры клеток

Все культуры клеток инкубировали в полной среде (ПС), составленной из DMEM с 25 мМ HEPES, дополненной коктейлем заменимых аминокислот, 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ L-глутамина, 1 мМ пирувата натрия, 50 мкМ β-меркаптоэтанола и 10 мкг/мл гентамицина (все реактивы «ПанЭко») при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>.

Линию клеток 293/TLR4-MD2-CD14 (InvivoGen), стабильно трансфицированную TLR4 с корцепторами CD14 и MD-2, поддерживали *in vitro* в присутствии селективных антибиотиков бластицидин и гиромоцин в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Для мониторинга активности NF-κB клетки трансдуцировали лентивирусным вектором (Cleveland BioLabs), несущим репортерный ген β-галактозидазы под контролем NF-κB-зависимого промотора. Далее клетки культивировали в соответствии с рекомендациями разработчиков в присутствии дополнительного селективного антибиотика пурамицин.

Суспензии первичных клеток селезенки, костного мозга и брюшной полости мышей готовили общепринятыми методами. Дендритные клетки получали *in vitro* дифференцировкой клеток костного мозга мышей BALB/c в присутствии гранулоцитарного макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF, granulocyte-macrophage colony stimulating factor). Костный мозг вымывали из бедренных и больших берцовых костей мыши, эритроциты удаляли осмотическим лизисом, ядро-содержащие клетки дважды отмывали фосфатным буферным раствором (PBS, Amresco, E404), после чего культивировали в полной среде с добавлением 10 нг/мл GM-CSF (Sigma) в течение 7 дней как описано в [4]. К окончанию этого срока неадгезионные клетки содержали 70–75% дендритных клеток. Адгезионная часть культуры была на 95% представлена макрофагами. Для получения макрофагов сначала осторожно удаляли неадгезионные клетки, оставшийся монослой адгезионных клеток отмывали PBS (0.5% БСА), затем приливали раствор Версена («ПанЭко») и выдерживали в течение 1 ч при 4°C, после чего макрофаги смывали PBS (0.5% БСА).

Перитонеальные макрофаги получали путем вымывания клеток из перитонеальной полости intactных мышей BALB/c с помощью PBS, дополненного 1% глюкозы, 10 мМ HEPES и 0.5% бычьего сывороточного альбумина. Клетки осаждали центрифугированием, суспензировали в ПС, культивировали в течение 18–20 ч при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Затем не прилипшие к пластику клетки удаляли, осторожно промывая культуральной средой и PBS. Более 90% оставшихся на пластике, адгезионных, клеток были представлены макрофагами.

### Нереплицирующиеся рекомбинантные аденовирусные векторы со вставкой трансгена

Нереплицирующиеся рекомбинантные аденовирусные векторы rAd-SEAP, rAd-GFP и rAd-NA со вставкой генов секреторной эмбриональной щелочной фосфатазы (SEAP), зеленого флуоресцентного белка (GFP) или гемагглютинина вируса гриппа H1N1 (NA) получали на основе плазмиды pShuttle-CMV согласно рекомендациям производителя AdEasy Adenoviral vector system (Stratagene, cat. 240009), используя плазмидные конструкции pGREEN (Carolina Biological Supply Company), p310D (pRcCMV-SEAP) и pAL-NA (обе собственного изготовления). Наличие генов белков GFP, SEAP, NA в соответствующих плазмидных конструкциях pShuttle-CMV-GFP, pShuttle-CMV-SEAP, pShuttle-CMV-NA подтверждали рестрикционным анализом с использованием эндонуклеаз EcoRI, NotI и EcoRV и с помощью ПЦР.

Присутствие генов GFP, SEAP и NA в rAd подтверждали методом ПЦР. Титры препаратов rAd-GFP, rAd-SEAP и rAd-NA определяли методом бляшкообразования в культуре клеток линии HEK-293 [11].

### Трансдукция клеток нереплицирующимися рекомбинантными аденовирусными векторами

Культуры клеток трансдуцировали rAd-SEAP, rAd-GFP или rAd-NA из расчета 7–200 БОЕ на клетку. Трансдукцию клеток проводили в 50 мкл бессывороточной среды OpTmizer™ (GIBCO) в течение 1 ч, затем в культуры клеток вносили 150 мкл ПС. Трансдуцированные клетки культивировали в присутствии агониста TLR4 Иммуномакс (10 мкг/мл) или без него в течение 1–6 дней. При изучении влияния других агонистов TLR клетки инкубировали в присутствии LTA (1 мкг/мл), Poly[I : C] (10 мкг/мл), LPS (10 мкг/мл), MPL-A (5 мкг/мл), флагеллина (0.1 мкг/мл), имиквимода (1 мкг/мл), ODN-CpG 1826 (10 нг/мл). Кроме того, для активации клеток, минуя TLR, использовали TNF-α (10 нг/мл). Для ингибирования сигнала TLR4 в культуры клеток вносили CLI-095 (1 мкг/мл).

### Трансдукция нереплицирующимися рекомбинантными аденовирусными векторами *in vivo*

Для трансдукции восприимчивых клеток *in vivo* в перитонеальную полость мышей BALB/c вводили rAd-SEAP в количестве  $10^8$  БОЕ в 200 мкл физиологического раствора вместе с 10 мкг Иммуномакса или без него (по четыре мыши в каждой экспериментальной группе).

Экспрессию введенного трансгена оценивали по концентрации белка SEAP в крови мышей. С этой целью через 3 сут после введения rAd-SEAP у мышей забирали кровь из ретроорбитального синуса, получали сыворотку и измеряли содержание SEAP в образцах сыворотки.

### Измерение интенсивности продукции белков SEAP, GFP и HA, кодируемых rAd

Продукцию секреторного белка SEAP в сыворотке крови или культуральной среде определяли согласно [12] с незначительными модификациями. Тестируемую жидкость осветляли центрифугированием при 14000 *g* в течение 2 мин, затем прогревали при 65°C в течение 5 мин. Субстрат *n*-нитрофенилфосфат вносили в реакционном буфере (0.5 М CaCO<sub>3</sub>, 0.5 мМ MgCl<sub>2</sub>, pH 9.8), оптическую плотность измеряли при длине волны 405 нм. Активность SEAP выражали в мЕ/мл, считая, что 1 мЕ/мл соответствует увеличению оптической плотности на 0.04 ед./мин.

Продукцию GFP в клетках определяли методом проточной цитофлуориметрии на FACS Aria II (BD Biosciences). Интенсивность флуоресценции определяли в диапазоне длин волн 515–545 нм при лазерном возбуждении на волне 488 нм. Популяции клеток идентифицировали, окрашивая суспензию смесью меченных флуорохромом антител к поверхностным белкам CD11b, CD11c, CD19, Ly6G, F4/80, с последующим анализом на цитофлуориметре FACS Aria II. Кроме того, продукцию GFP в дендритных клетках и макрофагах, меченных антителами к CD11c или F4/80 соответственно, подтверждали с помощью конфокальной микроскопии.

Экспрессию мембранного белка HA определяли, окрашивая клетки моноклональными антителами к HA, с последующим анализом методом проточной цитофлуориметрии на приборе FACS Aria II.

### Конфокальная микроскопия

Культуры клеток инкубировали в полной среде на культуральных слайдах (SPL Life Sciences Ltd., Ю. Корея) со съёмным дном в виде предметного стекла. После инкубации клетки фиксировали в течение 20 мин в PBS, содержащем 3.7% па-

раформальдегида (Sigma), промывали PBS с 0.5% БСА и окрашивали антителами в течение 1 ч. После дополнительной отмывки в PBS клетки окрашивали DAPI (1 мкг/мл) в PBS для анализа на конфокальном микроскопе Axio Observer.Z1 (Carl Zeiss, Германия) с камерой QuantEM 512SC (Photometrics, Великобритания).

### Статистическая обработка данных

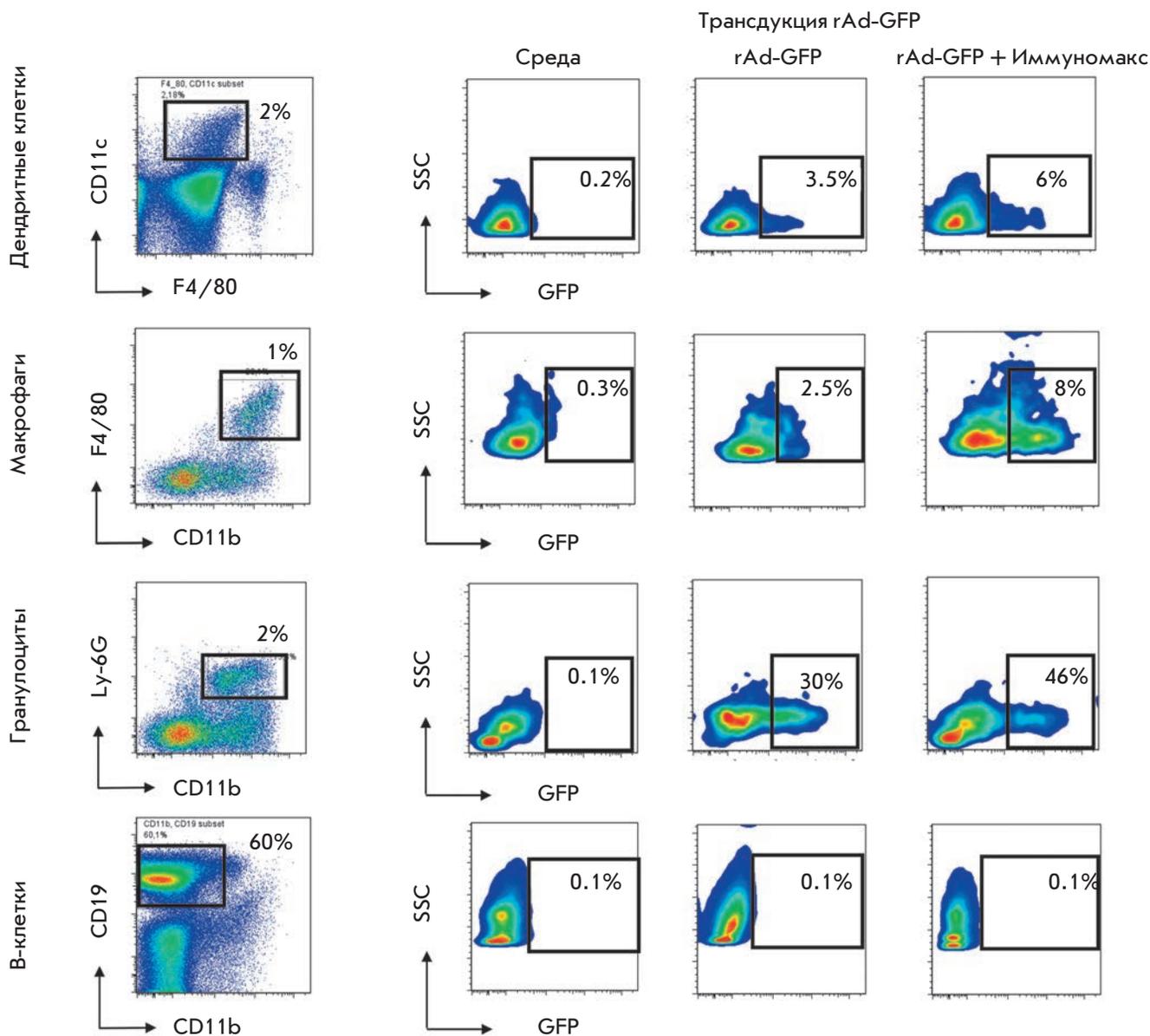
Все результаты представлены в виде средних значений и соответствующих величин стандартного отклонения. Статистическую значимость различий определяли с использованием *t*-критерия Стьюдента.

### РЕЗУЛЬТАТЫ

#### Усиление экспрессии белка, кодируемого трансгеном в составе rAd, при воздействии Иммуномакса

Нереплицирующиеся rAd трансдуцируют эпителиальные клетки и эффективно экспрессируют в них трансген. Для использования rAd с целью иммунизации важно добиться экспрессии нужного белка-антигена в антигенпредставляющих клетках, в частности в дендритных клетках и макрофагах. В данной работе мы установили, что rAd вполне успешно экспрессируются в первичных дендритных клетках и макрофагах мыши. При введении rAd-GFP в культуры клеток селезенки, костного мозга или перитонеальных макрофагов мы наблюдали экспрессию трансгена в дендритных клетках, макрофагах и гранулоцитах селезенки, дендритных клетках и макрофагах, полученных при культивировании клеток костного мозга в присутствии GM-CSF, а также в макрофагах брюшной полости (рис. 1 и 2). Экспрессия rAd в лимфоидных клетках и, в частности, в В-клетках, CD4 и CD8 Т-клетках, NK-клетках не регистрировалась. Природа клеток, экспрессирующих белок GFP, доказана нами путем одновременного окрашивания моноклональными антителами к CD11c – в случае дендритных клеток, F4/80 – макрофагов и Ly-6G – гранулоцитов. В качестве примера представлены микрофотографии дендритных клеток, содержащих на клеточной мембране молекулы CD11c и экспрессирующих GFP в цитозоле (рис. 3А).

Активация дендритных клеток Иммуномаксом одновременно с трансдукцией этих клеток rAd-GFP приводила к усиленной экспрессии белка GFP. При этом увеличивался как процент дендритных клеток, экспрессирующих GFP (рис. 1, 2, 3Б, 4А), так и интенсивность его продукции (рис. 4Б). Подобное усиление экспрессии rAd-GFP мы наблюдали и в макрофагах. Усиление экспрессии трансгена

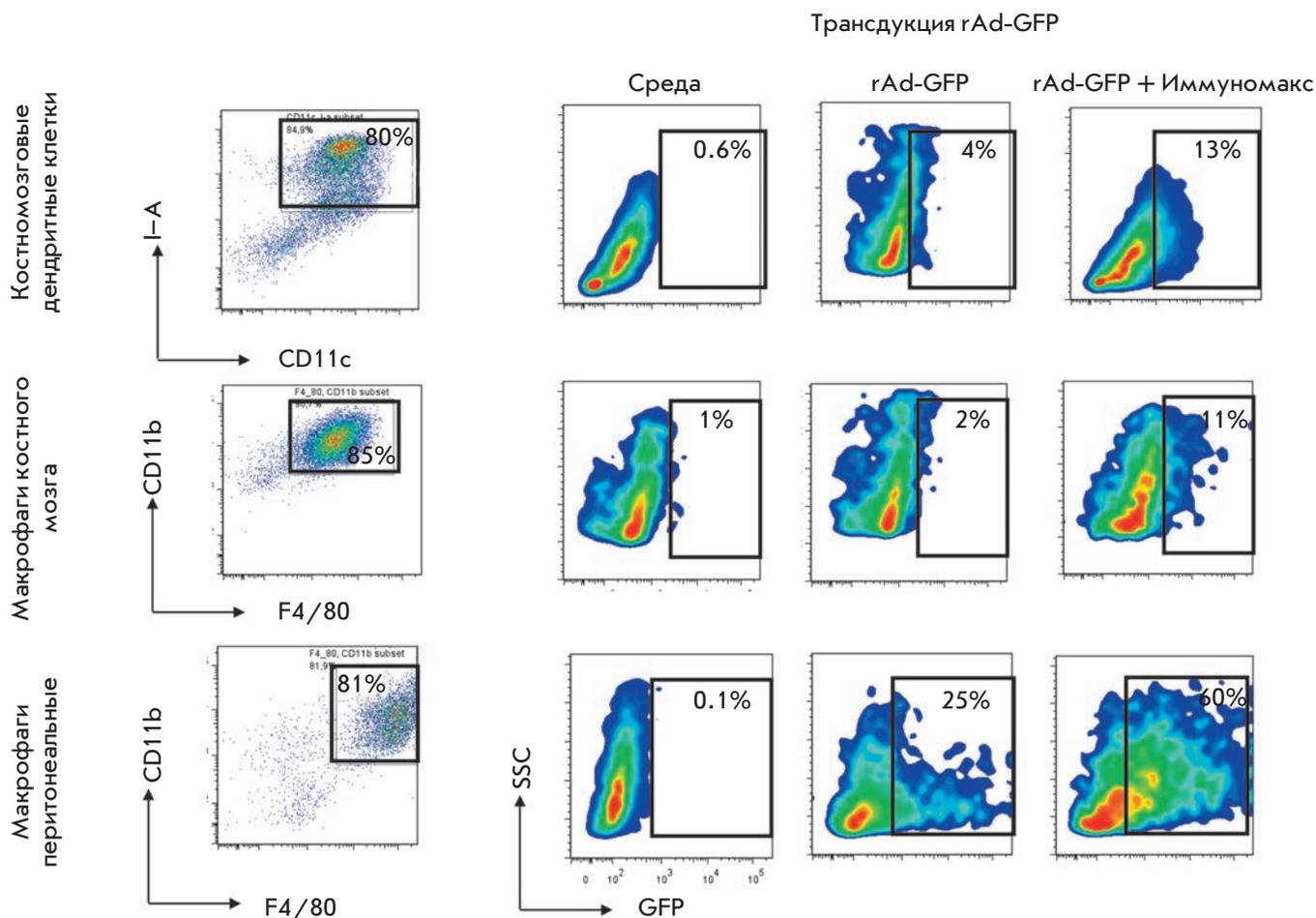


**Рис. 1.** Влияние агониста TLR4 (Иммуномакс) на трансдукцию и экспрессию rAd-GFP в различных типах клеток селезенки мыши. Спленоциты мыши трансдуцировали rAd-GFP ( $5 \times 10^5$  БОЕ/мл) и инкубировали в течение 3 сут в присутствии Иммуномакса (10 мкг/мл) или без него. Затем клетки окрашивали смесью меченных флуорохромом антител и анализировали на проточном цитометре FACS Aria II. Левая вертикаль – выделение (gating) CD11c<sup>+</sup> дендритных клеток, F4/80<sup>+</sup> макрофагов, CD11b<sup>+</sup>Ly-6G<sup>+</sup> гранулоцитов и CD19<sup>+</sup> В-клеток с указанием процентного содержания клеток этого типа в общей популяции клеток селезенки. В соответствующих рядах по горизонтали представлено содержание дендритных клеток, макрофагов, гранулоцитов и В-клеток с флуоресценцией GFP после трансдукции rAd-GFP и культивирования с Иммуномаксом или без него. Негативный контроль (среда) – культура клеток селезенки без трансдукции

не зависело от тканевой принадлежности дендритных клеток и макрофагов. Оно отчетливо регистрировалось в дендритных клетках селезенки и костного мозга, а также в макрофагах из селезенки, костного мозга или перитонеальной полости (см. рис. 1–4).

**Иммуномакс не изменяет тропности rAd к типам клеток, в которых экспрессируется**

При изучении экспрессии rAd в культурах клеток селезенки или костного мозга мыши мы обратили внимание на то, что Иммуномакс усиливает экспрес-



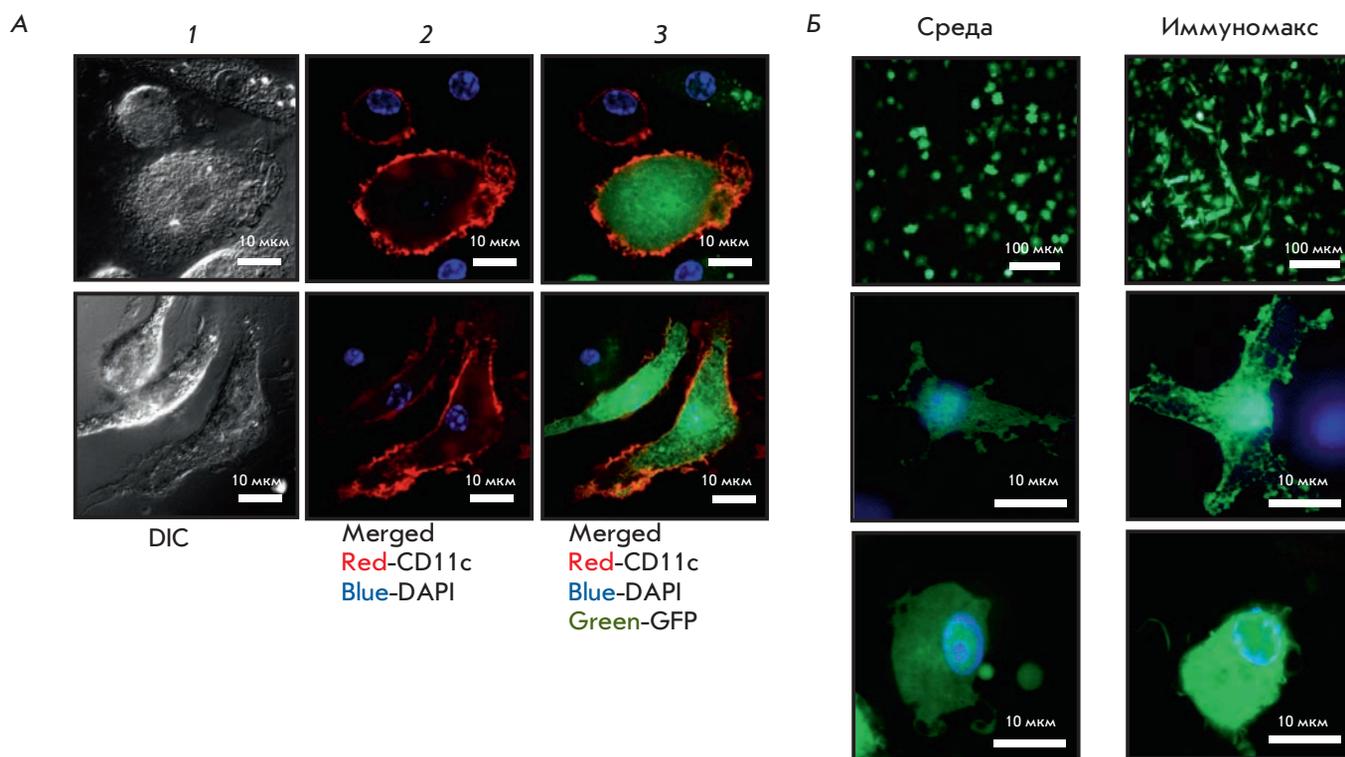
**Рис. 2.** Влияние агониста TLR4 (Иммуномакс) на трансдукцию и экспрессию rAd-GFP в дендритных клетках и макрофагах, дифференцированных *in vitro* из клеток костного мозга, а также в макрофагах из перитонеальной полости мыши. Клетки трансдуцировали rAd-GFP ( $5 \times 10^5$  БОЕ/мл) и инкубировали в течение 4 сут в присутствии Иммуномакса (10 мкг/мл) или без него. Затем клетки окрашивали смесью меченных флуорохромом антител и анализировали на проточном цитометре FACS Aria II. Левая вертикаль – выделение (gating) CD11c<sup>+</sup>I-A<sup>+</sup> дендритных клеток и CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> макрофагов костного мозга, а также CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> макрофагов перитонеальной полости с указанием процентного содержания клеток этого типа в общей популяции клеток. В соответствующих рядах по горизонтали представлено содержание дендритных клеток и макрофагов с флуоресценцией GFP после трансдукции rAd-GFP и культивирования с Иммуномаксом или без него. Негативный контроль (среда) – культура клеток без трансдукции

сию трансгена только в клетках тех типов, в которых вектор экспрессировался в отсутствие Иммуномакса. Под влиянием Иммуномакса не изменялась тропность вектора к различным типам клеток. В частности, rAd-GFP экспрессировался в дендритных клетках и макрофагах, но не экспрессировался в CD4 и CD8 Т-клетках, В-клетках и НК-клетках. Под влиянием Иммуномакса экспрессия rAd-GFP усиливалась только в дендритных клетках, макрофагах и гранулоцитах, в других типах клеток вектор по-прежнему не экспрессировался. В качестве примера представлены результаты исследования В-клеток

(см. рис. 1), в которых rAd-GFP не экспрессировался ни до, ни после их активации Иммуномаксом.

**Иммуномакс не влияет на репликацию rAd в специальных клетках НЕК-293**

Усиление экспрессии трансгена в составе rAd под действием Иммуномакса выдвигает естественный вопрос, не будет ли Иммуномакс активировать репликацию самих аденовирусных частиц. Поскольку репликация rAd в обычных клетках невозможна, для размножения rAd используют специальную клеточную линию НЕК-293, в геном которой



**Рис. 3.** Конфокальная микроскопия дендритных клеток, трансдуцированных rAd-GFP в присутствии Иммуномакса или без него. А — культуру костномозговых дендритных клеток инкубировали в полной среде в присутствии rAd-GFP (30 БОЕ на клетку). Через 24 ч клетки фиксировали и окрашивали антителами anti-CD11c-PE. Микроскопию проводили в буфере PBS с DAPI (1 мкг/мл) на конфокальном микроскопе Axio Observer.Z1 (Carl Zeiss, Германия) с камерой QuantEM 512SC (Photometrics, Великобритания) с использованием системы лазеров 405. Слева направо представлены изображения клеток в режимах: DIC – дифференциально-интерференционный контраст (1); наложение каналов anti-CD11c-PE (красный) и DAPI (синий) (2); наложение каналов anti-CD11c-PE (красный), GFP (зеленый), DAPI (синий) (3). Б — культура костномозговых дендритных клеток после 24 ч инкубации с rAd-GFP с добавлением Иммуномакса (10 мкг/мл) или без него. На фотографиях представлены наложения каналов GFP (зеленый) и DAPI (синий) с увеличением  $\times 20$  и  $\times 200$

встроены гены области E1 аденовируса, удаленные из аденовирусного вектора.

Мы проверили, как Иммуномакс влияет на репликацию rAd в культуре клеток линии HEK-293-TLR4/MD2. В предварительных экспериментах было показано, что Иммуномакс действует через TLR4, активируя продукцию репортерного белка в клетках HEK-293-TLR4/MD2. Этот эффект Иммуномакса подавляется CLI-095, специфическим ингибитором TLR4-сигнального пути. Как и в клетках HEK-293, в клетках HEK-293-TLR4/MD2 происходит активная репликация rAd с развитием через 2–4 дня цитопатического эффекта. Мы титровали образец rAd-GFP в клетках линии HEK-293-TLR4/MD2 в присутствии Иммуномакса или без него. Исходный образец rAd-GFP вносили в три лунки 96-луночной пластиковой панели с 40–50% конфлуентным монослоем клеток HEK-293-TLR4/MD2. Титрование вируса проводили в 24 последовательных разведениях с шагом разведе-

ния в 5 раз. В культурах клеток, где происходила репликация rAd, можно было наблюдать продукцию белка GFP и гибель клеток в течение нескольких дней. Репликация rAd наблюдалась, начиная с максимальной концентрации rAd, и при его последовательных разведениях, вплоть до 13-го. В присутствии Иммуномакса и в его отсутствие (контрольные культуры) последнее разведение rAd-GFP, при котором отмечена экспрессия GFP и цитопатический эффект, составили  $5^{13}$ , т.е. Иммуномакс не влиял на репликацию rAd в клетках HEK-293-TLR4/MD2, имеющих рецепторы TLR4 и отвечающих на Иммуномакс активацией NF- $\kappa$ B.

**Иммуномакс усиливает экспрессию трансенов, кодирующих цитоплазматический, секреторный или мембранный белки**

Выше было описано усиление Иммуномаксом экспрессии трансгена, входящего в состав rAd и ко-

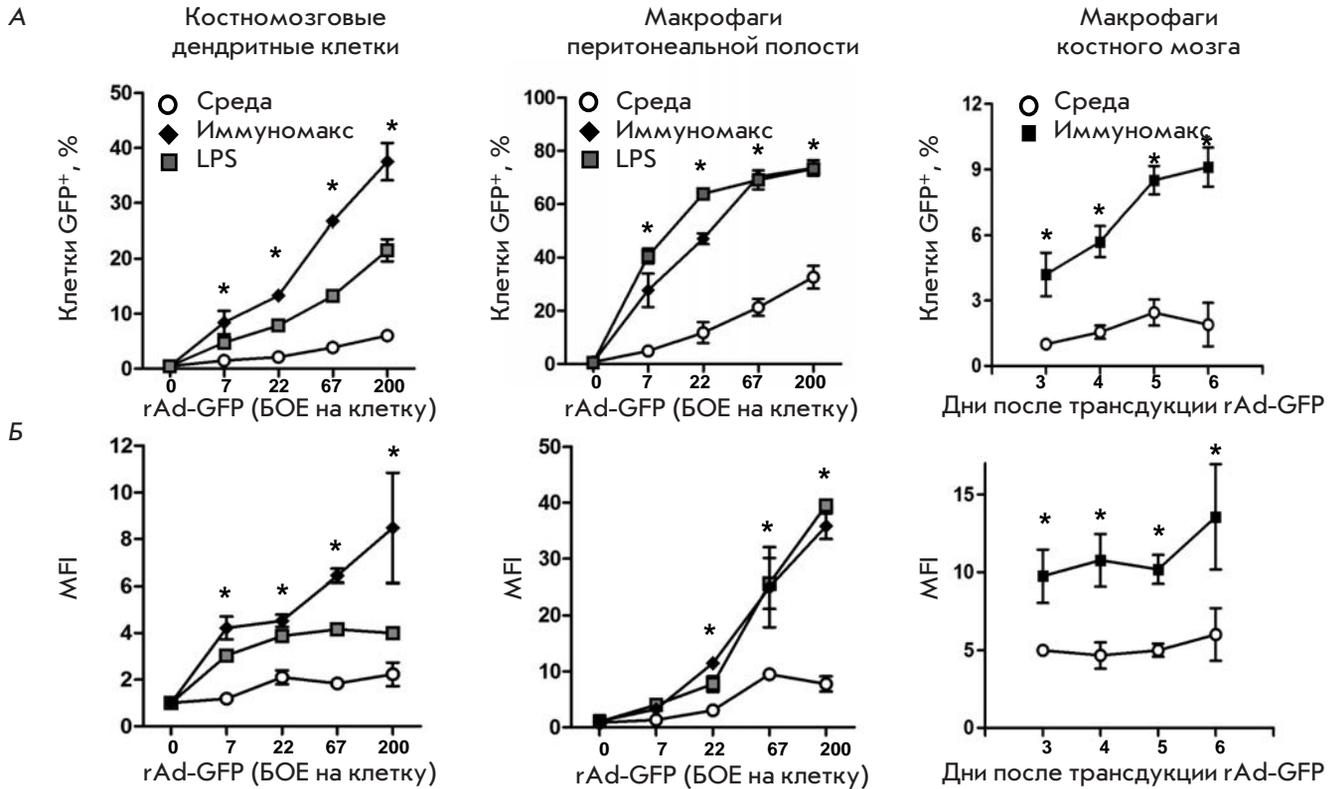


Рис. 4. Влияние агониста TLR4 (Иммуномакс) на экспрессию GFP в дендритных клетках и макрофагах в зависимости от дозы rAd-GFP или времени после трансдукции клеток. Костномозговые дендритные клетки и перитонеальные макрофаги трансдуцировали rAd-GFP и инкубировали в течение 24 ч в присутствии Иммуномакса (10 мкг/мл), LPS (3 мкг/мл) или без активаторов (среда). Макрофаги костного мозга трансдуцировали rAd-GFP в присутствии Иммуномакса (10 мкг/мл) или без него, а затем инкубировали в течение 6 дней. Образцы клеток отбирали через 3, 4, 5 и 6 дней. Клетки анализировали на проточном цитометре FACS Aria II после окрашивания смесью меченных флуорохромом антител. По осям абсцисс – доза rAd-GFP, использованная для трансдукции клеток, или дни после трансдукции (правая вертикаль). По осям ординат – процент GFP-позитивных клеток (А); средняя интенсивность флуоресценции (MFI), нормированная на значение в контроле без активатора (Б). Представлены средние значения и стандартные отклонения по трем экспериментам. Здесь и на рис. 5 и 6 статистическая значимость отличий  $P < 0.05$  обозначена \*

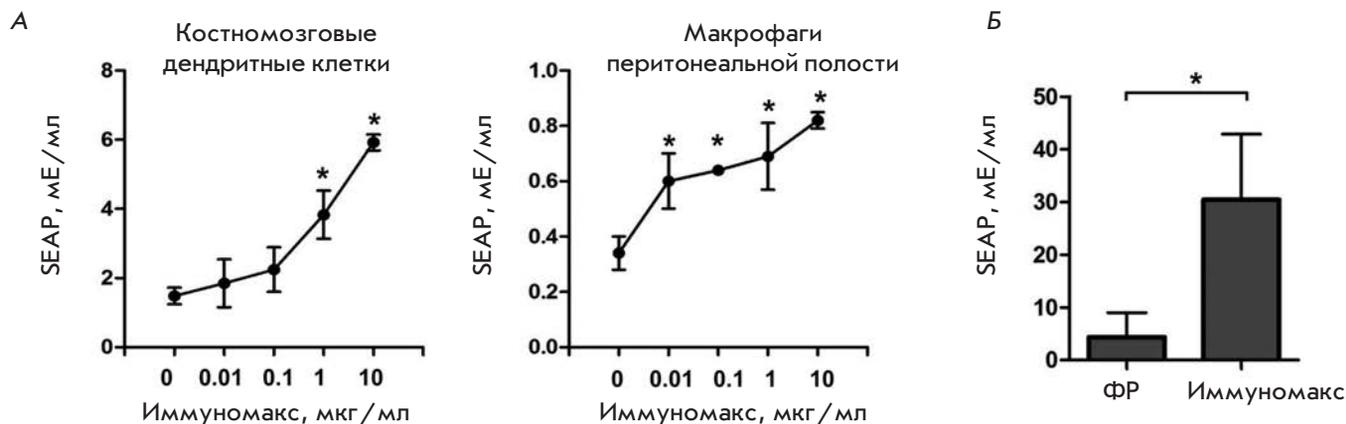
дирующего цитоплазматический белок GFP. Мы установили, что Иммуномакс также усиливает экспрессию трансгенов, кодирующих секреторный и мембранный белки. В этих экспериментах использовали rAd-SEAP и rAd-НА, кодирующие секреторную эмбриональную фосфатазу и мембранный гемагглютинин вируса гриппа соответственно. Экспрессию SEAP оценивали по его концентрации в культуральной жидкости, а экспрессию НА в клеточной мембране измеряли методом проточной цитометрии клеток, меченных моноклональными антителами к НА.

На рис. 5А,Б представлены результаты изучения экспрессии rAd-SEAP в дендритных клетках и перитонеальных макрофагах мыши. Из представленных данных видно, что Иммуномакс усиливает

экспрессию секреторного белка SEAP, кодируемого rAd-SEAP. В опытах на моноцитах человека, трансдуцированных rAd-НА, Иммуномакс тоже вызывал усиление экспрессии мембранного белка НА, кодируемого вектором. Здесь важно отметить, что усиление экспрессии трансгена наблюдалось не только в клетках мыши, но и человека.

**Усиление экспрессии rAd Иммуномаксом не только *in vitro*, но и *in vivo***

Принципиально важно было понять, можно ли индуцировать в организме животного описанное выше усиление экспрессии трансгена. Повышение продукции нужного белка было бы весьма полезным как при иммунизации rAd, так и при проведении генной терапии.



**Рис. 5.** Влияние агониста TLR4 (Иммуномакс) на экспрессию в культурах клеток *in vitro* и в организме мышей секреторного белка (SEAP), кодируемого в ДНК аденовирусного вектора. **А** – костномозговые дендритные клетки и перитонеальные макрофаги мыши трансдуцировали rAd-SEAP ( $5 \times 10^5$  БОЕ/мл) и инкубировали в течение 4 сут в присутствии Иммуномакса в указанных концентрациях. Интенсивность продукции белка SEAP определяли по его содержанию (мЕ/мл) в культуральной жидкости. **Б** – концентрация белка SEAP в крови мышей через 3 дня после введения rAd-SEAP совместно с Иммуномаксом или без него. Опытным мышам ( $n = 4$ ) в перитонеальную полость вводили rAd-SEAP в количестве  $10^8$  БОЕ на мышь с 10 мкг Иммуномакса в 200 мкл физиологического раствора NaCl. Контрольным мышам ( $n = 4$ ) вместо Иммуномакса вводили 200 мкл физиологического раствора (ФР). Через 3 сут определяли содержание SEAP в сыворотке крови мышей

Мы исследовали влияние Иммуномакса на экспрессию трансгена у мышей BALB/c. В качестве вектора использовали rAd-SEAP, который вводили внутрибрюшинно в дозе  $10^8$  БОЕ в 200 мкл физиологического раствора. Интенсивность синтеза белка SEAP определяли по его концентрации в крови животных через 3 дня после инъекции rAd-SEAP. Опытным мышам вместе с rAd-SEAP вводили Иммуномакс (10 мкг/мышь). Контрольным мышам вместе с вектором вводили физиологический раствор. Результаты, представленные на рис. 5Б, свидетельствуют, что введение Иммуномакса приводило к статистически значимому повышению продукции в организме мыши белка SEAP, кодируемого вектором rAd-SEAP.

**Усиление экспрессии rAd в антигенпредставляющих клетках происходит под влиянием агонистов TLR2, 4, 5, 7/8 и 9. Агонист TLR3 угнетает экспрессию rAd**

Иммуномакс является агонистом TLR4, который усиливает экспрессию трансгена в составе rAd в дендритных клетках и макрофагах. Было интересно узнать, оказывает ли подобное действие другой агонист TLR4, а именно LPS. Кроме того, следовало изучить возможное влияние агонистов других TLR на экспрессию трансгенов, введенных в клетки в составе rAd. На рис. 4 и 6 представлены данные, доказывающие, что LPS усиливает экспрессию трансгенов, как и Иммуномакс. Интересно, что монофосфориль-

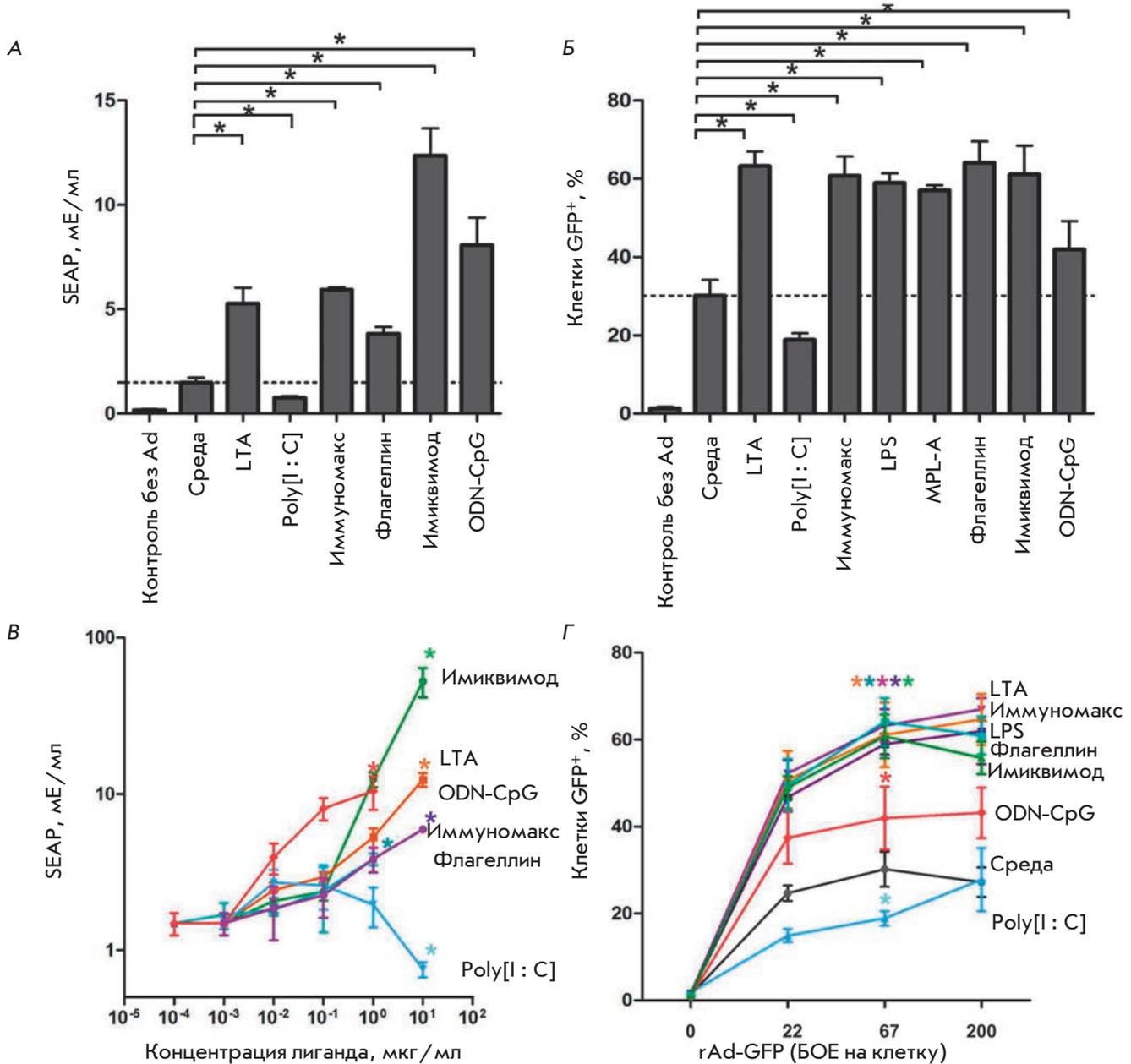
ное производное липида А (MPL-A), минимальное действующее начало LPS, тоже активировало экспрессию rAd-GFP. Более того, агонисты TLR2, 5, 7/8 и 9, подобно агонистам TLR4, стимулировали экспрессию генов SEAP и GFP в составе rAd-SEAP и rAd-GFP соответственно (рис. 6А,Б). Повышение экспрессии агонистами TLR2, 4, 5, 7/8 и 9 варьировало в разных экспериментах в 2–11 раз ( $P < 0.05$ ).

Следует отметить, что усиление экспрессии rAd под действием агониста TLR не было обусловлено образованием комплекса rAd с агонистом или облегчением поступления rAd в клетки. Это было показано в опытах с отмыванием rAd перед внесением в культуру клеток агонистов TLR4 (Иммуномакс, LPS) или, наоборот, путем отмывания агониста TLR4 перед трансдукцией клеток rAd. В обоих вариантах эффект усиления экспрессии rAd не отличался от эффекта, наблюдаемого при одновременном добавлении к клеткам rAd и агониста TLR (рис. 7А,Б).

Совершенно неожиданным оказалось действие агониста TLR3, который, в отличие от агонистов TLR2, 4, 5, 7/8 и 9, вызывал не усиление, а угнетение продукции белка, кодируемого rAd-вектором. Ингибирующее действие TLR3 проявлялось при экспрессии rAd-SEAP и rAd-GFP (рис. 6А,Б).

**Активация NF-κB, минуя TLR, тоже приводит к усилению экспрессии трансгена**

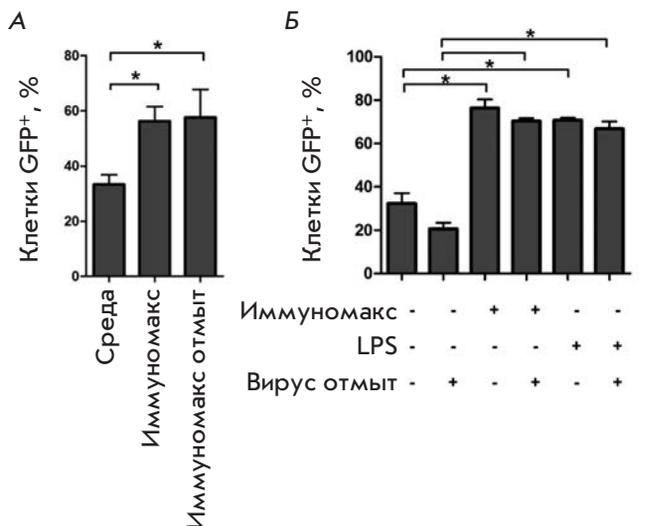
Все TLR, кроме TLR3, передают внутриклеточный сигнал через адапторную молекулу MyD88,



**Рис. 6.** Влияние агонистов Toll-подобных рецепторов на трансдукцию и экспрессию rAd-SEAP и rAd-GFP в макрофагах мыши. Макрофаги перитонеальной полости мыши трансдуцировали (А, В) Ad-SEAP  $5 \times 10^7$  БОЕ/мл или (Б) Ad-GFP  $5 \times 10^7$  БОЕ/мл, или (Г) Ad-GFP в различной концентрации, а затем инкубировали в течение 4 сут в присутствии агонистов различных TLR. По окончании инкубации определяли содержание SEAP в культуральной жидкости (А, В) или процент GFP-позитивных клеток (Б, Г). В экспериментах (А, Б, В, Г) использованы следующие лиганды: LTA (1 мкг/мл), Poly[I : C] (10 мкг/мл), LPS (10 мкг/мл), MPL-A (5 мкг/мл), флагеллин (1 мкг/мл), имиквимод (1 мкг/мл), ODN-CpG 1826 (10 нг/мл), Иммуномакс (10 мкг/мл). Изменение концентрации лигандов (В) отражено по оси абсцисс. Представлены средние значения и стандартные отклонения

что, в конечном счете, приводит к активации фактора NF-κB. Мы предположили, что усиление экспрессии трансгена агонистами TLR определяется активацией сигнальной оси MyD88 → NF-κB. Это

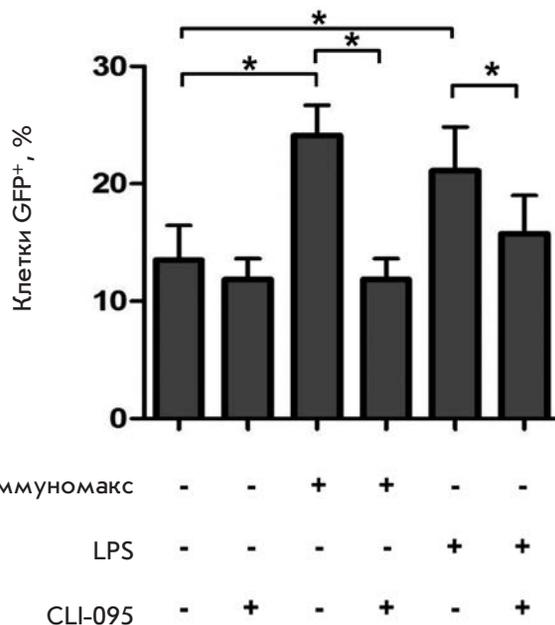
предположение было проверено двумя способами – блокированием передачи сигнала с TLR на MyD88 и активацией NF-κB в обход TLR. Передачу сигнала с TLR4 на MyD88 мы блокировали с помощью



**Рис. 7.** Усиление экспрессии rAd-GFP при последовательном (раздельном) использовании rAd-GFP и агонистов TLR4. **А** – перитонеальные макрофаги ( $2 \times 10^4$  на лунку) инкубировали в полной культуральной среде в присутствии Иммуномакса (10 мкг/мл) в течение 4 ч, затем клетки трижды отмывали PBS, после чего в культуры вносили rAd-GFP (70 БОЕ на клетку). Через 24 ч культивирования при 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе культуральную жидкость заменяли на раствор Версена («ПанЭко») и культуры оставляли на 1 ч при 4°C, затем клетки смывали PBS с 0.5% БСА и анализировали содержание GFP-позитивных клеток на цитофлуориметре FACS Aria II. **Б** – перитонеальные макрофаги ( $2 \times 10^4$  на лунку) инкубировали в течение 2 ч в полной культуральной среде с добавлением rAd-GFP (70 БОЕ на клетку), после чего часть лунок трижды отмывали PBS, а затем вносили полную культуральную среду с Иммуномаксом (10 мкг/мл) или LPS (3 мкг/мл). Контролем служили аналогичные культуры без активатора. Через 24 ч клетки снимали раствором Версена и определяли содержание GFP-позитивных клеток на цитофлуориметре FACS Aria II

специфического ингибитора CLI-095. Активацию NF-κB, минуя TLR, осуществляли с помощью цитокина TNF-α, который действует на NF-κB через рецепторы TNF.

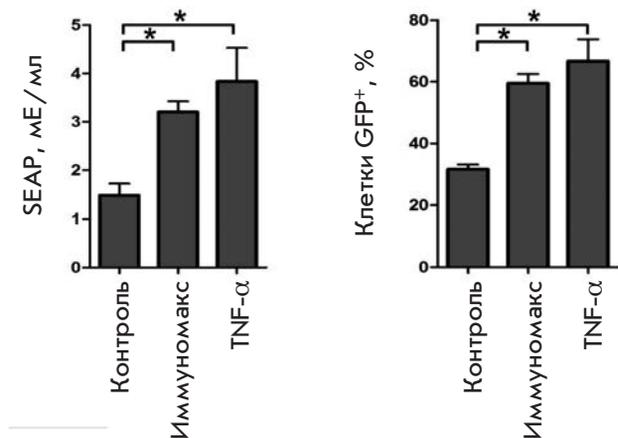
Полученные данные представлены на рис. 8 и 9. Как и предполагалось, ингибитор CLI-095 отменяет вызванные Иммуномаксом или LPS эффекты усиления экспрессии rAd-GFP (рис. 8). Активация перитонеальных макрофагов рекомбинантным TNF-α (10 нг/мл) вызывала такое же усиление экспрессии SEAP и GFP (рис. 9), как и воздействие Иммуномаксом. Последнее означает, что активация TLR-путей не обязательна, достаточно активировать в клетках NF-κB, чтобы индуцировать усиленную экспрессию трансгенов в составе rAd.



**Рис. 8.** Селективный ингибитор TLR4-сигнала (CLI-095) отменяет усиление экспрессии rAd-GFP, вызванное агонистами TLR4. Перитонеальные макрофаги инкубировали в течение 1 ч в полной культуральной среде с добавлением CLI-095 (1 мкг/мл) или без него, после чего в среду добавляли rAd-GFP (70 БОЕ на клетку) и Иммуномакс (10 мкг/мл) или LPS (3 мкг/мл). Контролем служили аналогичные культуры без активатора. Через 24 ч клетки снимали раствором Версена и анализировали содержание GFP-позитивных клеток на цитофлуориметре FACS Aria II

### ОБСУЖДЕНИЕ

Рекомбинантные нереплицирующиеся аденовирусные векторы трансдуцируют эпителиальные клетки, а также дендритные клетки и макрофаги. Клетки двух последних типов являются профессиональными антигенпредставляющими клетками, потому они представляют особый интерес при иммунизации rAd. Экспрессия кодируемых rAd целевых белков в антигенпредставляющих клетках определяет успех вакцинных препаратов на основе rAd. Для эффективной индукции клеточного и гуморального иммунного ответа на белковый антиген необходимо выполнение, как минимум, двух критических условий. Во-первых, на поверхности антигенпредставляющих клеток должна происходить экспрессия пептидных фрагментов белка-антигена в комплексе с молекулами MHC классов I и II. Во-вторых, на поверхности тех же клеток должны экспрессироваться коактиваторные молекулы CD80, CD86 и CD40, обеспечивающие активацию специфических к антигену Т-клеток



**Рис 9.** Цитокин TNF-α усиливает экспрессию белков GFP и SEAP в макрофагах, трансдуцированных rAd со вставкой генов GFP и SEAP. Перитонеальные макрофаги мыши трансдуцировали rAd-SEAP ( $5 \times 10^7$  БОЕ/мл) или rAd-GFP ( $5 \times 10^7$  БОЕ/мл), а затем инкубировали в течение 4 дней в присутствии Иммуномакса (10 мкг/мл) или TNF-α (10 нг/мл). Контролем служили аналогичные культуры без активатора. По окончании инкубации определяли содержание SEAP в культуральной жидкости или процент GFP-позитивных клеток

при контакте с антигенпредставляющей клеткой. Первое условие выполняется, если целевой антиген производится дендритными клетками и макрофагами, трансдуцированными rAd. Для выполнения второго условия необходима активация дендритных клеток и макрофагов через рецепторы TLR или иным образом.

В нашей работе мы показали, что белки, кодируемые трансгенами в составе rAd-векторов, экспрессируются в дендритных клетках и макрофагах (рис. 1–3). Дополнительная активация антигенпредставляющих клеток с помощью агониста TLR4 приводит к усиленной экспрессии коактиваторных молекул CD80, CD86 и CD40. Кроме того, как показано в нашей работе, под влиянием агониста TLR4 происходит усиление экспрессии целевого белка (рис. 1–4). Усиленная продукция белка-антигена, наряду с экспрессией коактиваторных молекул CD80, CD86 и CD40, может способствовать повышению эффективности иммунных реакций, когда для иммунизации используется сочетание rAd и агониста TLR4. Ранее мы показали, что сочетанная иммунизация rAd-HA, кодирующим гемагглютинин вируса гриппа, с фармацевтическим агонистом TLR4 (Иммуномакс) позволяет повысить эффективность вакцинации против вирусов гриппа А и В [7].

Векторы rAd могут использоваться не только для вакцинации, но и для генной терапии. В этом случае введение в организм больного rAd со вставкой трансгена обеспечивает продукцию терапевтического белка, как минимум, в течение 2–3 недель. Показанная нами возможность усиления продукции белка, кодируемого геном, встроенным в состав rAd, путем дополнительного введения агониста TLR4 может быть важна для повышения эффективности генной терапии с помощью rAd. Возможно, что сочетание rAd с агонистом TLR4 позволит получить терапевтический белок в более высоких концентрациях, чем при использовании только rAd, или получать белок в нужной концентрации при введении меньшего количества rAd.

Молекулярная сигнализация через Toll-подобные рецепторы была предметом детального изучения в течение последних 15 лет. Результаты этих исследований привели к пониманию внутриклеточных сигнальных событий, индуцируемых воздействием лигандов TLR1/2, TLR2/6, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7/8, TLR9 в клетках мыши и человека [13, 14]. Оказалось, что от TLR идут два типа сигнальных каскадов. Один начинается с адапторных молекул, в число которых обязательно входит MyD88, и заканчивается активным фактором NF-κB. Другой начинается с адапторных молекул, среди которых обязательно должен быть TRIF, и заканчивается факторами транскрипции семейства IRF, в частности IRF3.

Сигнальный путь MyD88 → NF-κB используется при воздействии агонистов на рецепторы TLR1/2, TLR2/6, TLR5, TLR7, TLR8 и TLR9. Сигнальный путь TRIF → IRF действует при активации TLR3. Отличительная особенность TLR4 – использование обоих сигнальных путей. Сразу после действия агониста TLR4 передает сигнал с внешней клеточной мембраны по пути MyD88 → NF-κB. Чуть позже, после эндоцитоза лиганд-рецепторных комплексов, TLR4 использует вторую сигнальную цепь TRIF → IRF.

В нашей работе обнаружено, что агонисты различных TLR стимулируют продукцию белков, ген которых встроен в rAd. Усиление экспрессии трансгена мы наблюдали при использовании агонистов TLR2, TLR4, TLR5, TLR7/8 и TLR9 (рис. 6А,Б). Противоположным оказалось влияние агониста TLR3. При воздействии Poly[I : C] одновременно с трансдукцией дендритных клеток и макрофагов rAd-GFP или rAd-SEAP подавлялась продукция GFP и SEAP (рис. 6А,Б). Сравнивая внутриклеточные сигнальные пути, идущие от разных TLR, мы предположили, что активация NF-κB может отвечать за усиленную продукцию, а активация IRF лежит

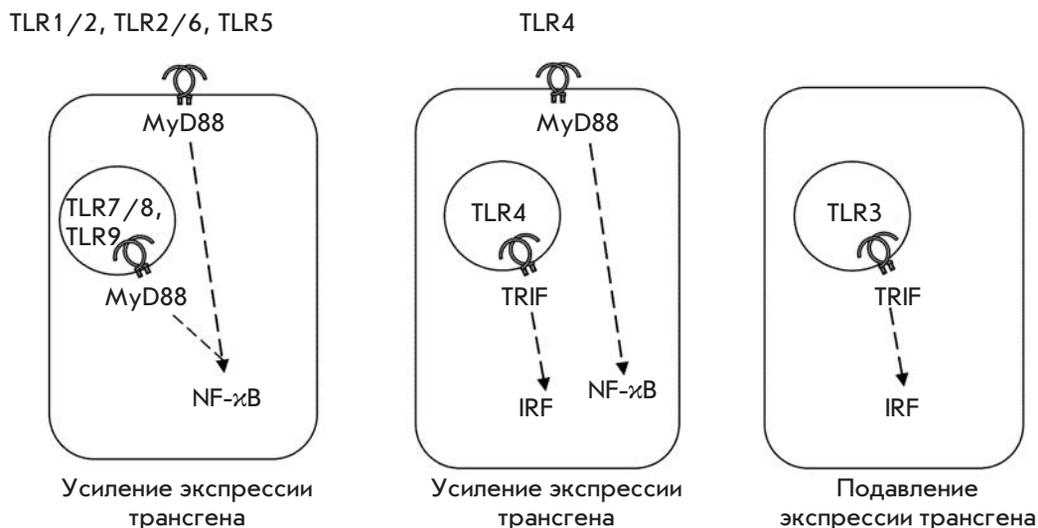


Рис. 10. Возможный механизм усиления или подавления агонистами различных TLR экспрессии белка, кодируемого трансгеном в составе аденовирусного вектора

в основе подавления продукции белка, кодируемого трансгеном в составе rAd.

Особый случай – агонисты TLR4. Поскольку при использовании агонистов TLR4 происходит усиление продукции белков, кодируемых rAd, мы предполагаем, что сигнальная ветвь MyD88 → NF-κB доминирует над сигнальной ветвью TRIF → IRF (рис. 10).

Предположение о стимулирующей роли сигнальной оси MyD88 → NF-κB отчасти подтверждается нашими результатами. CLI-095, селективный блокатор передачи сигнала с TLR4 на адапторную молекулу MyD88, отменяет повышение продукции белка, кодируемого rAd, под действием агонистов TLR4 (рис. 8). В свою очередь, активация NF-κB «в обход» TLR приводит к усиленной экспрессии трансгенов в составе rAd. Так, при активации клеток цитокином TNF-α одновременно с трансдукцией rAd-SEAP или rAd-GFP мы наблюдали повышение продукции SEAP и GFP соответственно (рис. 9). Известно, что сигналы TNF-α передаются через рецепторы TNFR1 и TNFR2. Внутриклеточный сигнальный путь заканчивается активацией NF-κB. Следовательно, активация NF-κB, минуя рецепторы TLR, также приводит к усилению экспрессии трансгена, что не доказывает, но говорит в пользу предположения о стимуляции продукции белка, кодируемого этим геном под действием NF-κB.

Использованные нами конструкции rAd-GFP, rAd-SEAP и rAd-HA содержали ген соответствующего белка под контролем реагирующего на NF-κB CMV-промотора с четырьмя сайтами, узнаваемыми NF-κB [15]. Вполне логично предположить, что дополнительная активация NF-κB агонистами TLR2,

TLR4, TLR5, TLR7, TLR8 и TLR9 может усиливать транскрипцию генов, контролируемых CMV-промотором.

В принципе, TLR-сигнализация может влиять на продукцию белка, воздействуя на транскрипцию, трансляцию или другие важнейшие процессы в клетке. Точные механизмы, приводящие к усилению экспрессии трансгенов при активации TLR2, TLR4, TLR5, TLR7, TLR8, TLR9 и подавлению продукции белка, кодируемого трансгеном в составе rAd, при активации TLR3, еще предстоит установить.

Нереплицирующиеся рекомбинантные аденовирусные векторы используются не только для иммунизации, но и в генной терапии. Описанные в нашей работе эффекты агонистов TLR на экспрессию трансгенов в составе аденовирусных векторов намечают перспективное направление – разработку способов направленной регуляции экспрессии трансгенов в организме. В идеале могут быть разработаны методы, которые позволят после введения трансгена в организм больного усиливать или подавлять экспрессию его белка-продукта в зависимости от поставленной задачи.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В нашей работе изучено влияние агонистов Toll-подобных рецепторов на эффективность трансдукции и экспрессии rAd в антигенпредставляющих клетках животных и человека. Установлено, что агонисты TLR2, 4, 5, 7, 8 и 9 значительно усиливают продукцию трансгенного белка в клетках, трансдуцированных rAd со вставкой соответствующего трансгена. Эффект усиления наблюдается в дендритных клетках и макрофагах, экспрессирующих цитоплазма-

тический (GFP), мембранный (HA) или секреторный (SEAP) белки. В экспериментах на лабораторных мышцах показано, что усиление экспрессии целевого белка с помощью фармацевтического агониста TLR4 происходит и в организме животного. В отличие от агонистов других TLR, агонист TLR3 подавляет продукцию белка (GFP или SEAP) в клетках, трансдуцированных rAd со вставкой соответствующего трансгена.

Молекулярные механизмы усиления и подавления экспрессии rAd в антигенпредставляющих клетках, активированных различными агонистами TLR, еще предстоит изучить. В представленной работе приведены данные в пользу предположения, согласно которому усиление экспрессии rAd происходит в результате активации фактора транскрипции NF- $\kappa$ B, а подавление обусловлено активацией факторов транскрипции серии IRF. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Arama C., Assefaw-Redda Y., Rodriguez A., Fernández C., Corradin G., Kaufmann S.H., Reece S.T., Troye-Blomberg M. // *Vaccine*. 2012. V. 30. № 27. P. 4040–4045.
2. Hoft D.F., Blazevic A., Stanley J., Landry B., Sizemore D., Kramegan E., Gearhart J., Scott A., Kik S., Pau M.G., et al. // *Vaccine*. 2012. V. 30. № 12. P. 2098–2108.
3. Scallan C.D., Tingley D.W., Lindbloom J.D., Toomey J.S., Tucker S.N. // *Clin. Vaccine Immunol.* 2013. V. 20. № 1. P. 85–94.
4. Sharma A., Tandon M., Bangari D.S., Mittal S.K. // *Curr. Drug Ther.* 2009. V. 4. № 2. P. 117–138.
5. INGN 201: Ad-p53, Ad5CMV-p53, adenoviral p53, p53 gene therapy-introgen, RPR/INGN 201. // *Drugs R D*. 2007. V. 8. № 3. P. 176–187.
6. Pearson S., Jia H., Kandachi K. // *Nat. Biotechnol.* 2004. V. 22. № 1. P. 3–4.
7. Атауллаханов Р.Р., Шмаров М.М., Седова Е.С., Логунов Д.Ю., Пичугин А.В., Атауллаханов Р.И., Хаитов Р.М. // Патент № WO2013129961 A1 РФ, C07K16/10, A61P31/16, C12N15/44, C07K14/11, A61K39/145. 2012.
8. Shmarov M.M., Sedova E.S., Verkhovskaya L.V., Rudneva I.A., Bogacheva E.A., Barykova Y.A., Shcherbinin D.N., Lysenko A.A., Tutykhina I.L., Logunov D.Y., et al. // *Acta Naturae*. 2010. V. 2. № 1. P. 111–118.
9. Атауллаханов Р.И., Пичугин А.В., Шишкова Н.М., Мастер-нак Т.Б., Малкина Е.Ю., Ульянова Л.И., Стеценко О.Н. // *Иммунология*. 2005. № 2. С. 111–120.
10. Мельникова Т.М., Пичугин А.В., Атауллаханов Р.И., Хаитов Р.М. // Заявка на патент RU 2013151824, приоритет 21.11.2013.
11. Graham F.L., Prevec L. // *Methods in Mol. Biol.* 1991. V. 7. P. 109–127.
12. Berger J., Hauber J., Hauber R., Geiger R., Cullen B.R. // *Gene*. 1988. V. 66. № 1. P. 1–10.
13. Newton K., Dixit V.M. // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2012. V. 4. № 3. a006049. P. 1–19. doi: 10.1101/cshperspect.a006049
14. Lim K.H., Staudt L.M. // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2013. V. 5. № 1. a011247. doi: 10.1101/cshperspect.a011247.
15. Lee Y., Sohn W.J., Kim D.S., Kwon H.J. // *Eur. J. Biochem.* 2004. V. 271. № 6. P. 1094–1105.