

МЕДИЦИНА MEDICINE

УДК 577.218.083.32:577.216.4:577.216.9:57.085.23
<https://doi.org/10.29235/1561-8323-2025-69-5-404-415>

Поступило в редакцию 08.01.2025
Received 08.01.2025

О. Ю. Пилютина¹, А. С. Войтехович¹, Е. Г. Фомина²,
Е. Е. Григорьева², И. К. Фомин¹

¹Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий,
Минск, Республика Беларусь

²Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья,
Минск, Республика Беларусь

МОДИФИЦИРОВАННАЯ ЛЕНТИВИРУСНАЯ ВЕКТОРНАЯ СИСТЕМА ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОГО ВВЕДЕНИЯ И ДОЛГОВРЕМЕННОЙ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

(Представлено членом-корреспондентом И. А. Карповым)

Аннотация. Дендритные клетки (ДК) содержат высокую концентрацию антивирусного фактора SAMHD1, который ингибирует размножение лентивирусов. Некоторые представители лентивирусов обезьян, такие как SIVmac, кодируют вспомогательный белок Vpx, который является антагонистом SAMHD1 и блокирует его действие в инфицируемых клетках для повышения эффективности размножения. Однако лентивирус человека HIV-1, на основе которого получены подавляющее большинство векторных систем для введения и экспрессии генов, не кодирует Vpx и инфицирует ДК с низкой эффективностью. Исходя из этого, было сделано предположение, что упаковка Vpx белка SIVmac в вирионы лентивирусных векторов на основе HIV-1 может увеличивать их инфекционность на ДК. Для придания лентивирусной векторной системе на основе HIV-1 способности упаковывать в вирионы белок Vpx SIVmac239 в векторную систему были введены ряд изменений. На основе анализа структурной и функциональной гомологии белков р6 HIV-1 и SIVmac239 были определены аминокислотные последовательности, замена которых в составе р6 HIV-1 позволяла бы специфически упаковывать экзогенный белок Vpx SIVmac239 и оказывала минимальное влияние на структуру белка. Для экспрессии белка Vpx SIVmac239 в клетках человека была получена кодон-оптимизированная последовательность гена Vpx. Результаты показали, что упаковка Vpx белка в вирионы модифицированных лентивирусов является критичной для их инфекционности на ДК, так как вирус «дикого типа», полученный даже в присутствии Vpx белка, был не способен продуктивно инфицировать ДК, поскольку не содержит белковых детерминант для упаковки Vpx. Эффективность введения маркерного гена в ДК при помощи модифицированной векторной системы для различных доноров составила 90–97 %. Отличительной особенностью векторной системы является ее способность упаковывать Vpx белок SIVmac непосредственно в вирионы HIV-1, что дает возможность напрямую вводить вирусные векторы на основе HIV-1 в ДК, без предварительной их обработки обезьяньим вирусом SIVmac. Таким образом, модифицированная векторная система может быть использована для эффективного введения и долговременной экспрессии генов в ДК человека.

Ключевые слова: лентивирусы, лентивирусные векторы, Vpx, дендритные клетки, экспрессия генов

Для цитирования. Модифицированная лентивирусная векторная система для эффективного введения и долговременной экспрессии генов в дендритных клетках человека / О. Ю. Пилютина, А. С. Войтехович, Е. Г. Фомина [и др.] // Доклады Национальной академии наук Беларуси. – 2025. – Т. 69, № 5. – С. 404–415. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2025-69-5-404-415>

Olga Yu. Piliutina¹, Alexander S. Voytehovich¹, Elena G. Fomina², Elena E. Grigorieva², Igor K. Fomin¹

¹Republican Scientific and Practical Center of Transfusiology and Medical Biotechnology, Minsk, Republic of Belarus

²Republican Center for Hygiene, Epidemiology and Public Health, Minsk, Republic of Belarus

MODIFIED LENTIVIRAL VECTOR SYSTEM FOR EFFICIENT DELIVERY AND LONG-TERM GENE EXPRESSION IN HUMAN DENDRITIC CELLS

(Communicated by Corresponding Member Igor A. Karpov)

Abstract. Dendritic cells (DC) contain a high concentration of the antiviral factor SAMHD1, which inhibits the replication of lentiviruses. Some representatives of monkey lentiviruses, such as SIVmac, encode the accessory protein Vpx, which is an antagonist of SAMHD1 and blocks its action in infected cells to increase the efficiency of replication. However, the human lentivirus HIV-1, which is the basis for the vast majority of vector systems for the introduction and expression of genes, does not encode Vpx and infects DC with low efficiency. Based on this, it has been suggested that packaging of the SIVmac Vpx protein into HIV-1 lentiviral vector virions may increase their infectivity on DC. To enable the HIV-1-based lentiviral vector system to package the Vpx protein of SIVmac239 into virions, a number of modifications were introduced into the vector system. Based on the analysis of the structural and functional homology of the proteins p6 HIV-1 and SIVmac239, amino acid sequences were identified, the replacement of which in the composition of p6 HIV-1 would allow specific packaging of the exogenous Vpx protein SIVmac239, and have a minimal effect on the structure of the protein. To express the SIVmac239 Vpx protein in human cells, a codon-optimized sequence of the Vpx gene was obtained. The results showed that packaging of the Vpx protein into the virions of modified lentiviruses is critical for their infectivity on DC, since the “wild-type” virus, even obtained in the presence of the Vpx protein, was unable to productively infect DC because it does not contain the protein determinants for packaging Vpx. The efficiency of introducing a marker gene into DC using the modified vector system for different donors was 90–97 %. A distinctive feature of the vector system is its ability to package the SIVmac Vpx protein directly into HIV-1 virions, which makes it possible to directly introduce HIV-1-based viral vectors into DC without pre-treatment with the simian SIVmac virus. Thus, the modified vector system can be used for efficient transfer and long-term gene expression in human DC.

Keywords: lentiviruses, lentiviral vectors, Vpx, dendritic cells, gene expression

For citation. Piliutina O. Yu., Voytehovich A. S., Fomina E. G., Grigorieva E. E., Fomin I. K. Modified lentiviral vector system for efficient delivery and long-term gene expression in human dendritic cells. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi* = *Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2025, vol. 69, no. 5, pp. 404–415. <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2025-69-5-404-415>

Введение. Дендритные клетки (ДК) играют критическую роль в опосредовании врожденного и индукции адаптивного иммунного ответа. ДК, часто упоминаемые как «природный адъювант», считаются наиболее потентными антиген-презентирующими клетками, способными активировать как «наивный», так и иммунный ответ памяти [1]. ДК являются существенным компонентом вакцинации благодаря их способности захватывать, процессировать и презентовать антиген Т-клеткам. В настоящее время принято, что вакцинные адъюванты действуют через индукцию созревания ДК [2]. Доставка антигена в ДК является существенным фактором для образования сильного и длительного Т-клеточного ответа. ДК могут быть использованы для вакцинации против опухолей посредством различных способов. К наиболее часто используемым относятся вакцины, состоящие из *ex vivo* получаемых ДК, которые нагружают антигенами. Так как ДК не только способны к неспецифическому фагоцитозу и макропиноцитозу патоген-ассоциированных антигенов, но также могут более специфично поглощать антигены через лектиновые рецепторы, Fcγ-рецепторы и ряд других рецепторов эндоцитоза, различные антигены могут быть доставлены в ДК с помощью антител, специфичных к этим рецепторам эндоцитоза и в настоящее время этот способ получения вакцин рассматривается как один из эффективных [3].

Одним из ограничений описанных выше подходов для получения вакцин на основе ДК является короткое время презентации антигена. В настоящее время разрабатываются подходы, в которых ДК трансдуцируются *ex vivo* с антиген-экспрессирующими вирусными векторами, представляя эндогенную продукцию антигена, что обеспечивает более эффективную презентацию и длительную экспрессию антигена. Использование лентивирусных векторов для этих целей имеет очевидные преимущества, так как они обладают способностью стабильно интегрировать в геном клетки-хозяина и не кодируют вирусных белков [4]. Однако использование лентивирусных векторов ограничено низкой эффективностью, с которой они способны трансдуцировать ДК.

ДК экспрессируют SAMHD1, который является фосфогидролазой и снижает концентрацию клеточных дезоксинуклеотидтрифосфатов ниже уровня, необходимого для поддержания обратной транскрипции ретровирусного генома, что и является результатом низкого титра лентивирусных векторов на основе HIV-1 [5]. HIV-2 и некоторые изоляты SIV (Simian Immunodeficiency Virus) кодируют вспомогательный белок Vpx, который нейтрализует SAMHD1-опосредованную рестрикцию. Vpx упаковывается в вирионы и после инфицирования клетки связывается с SAMHD1. Это связывание затем вовлекает E3 убиквитин-лигазный комплекс CRL4, который индуцирует протеосомную деградацию SAMHD1 и снимает блок для инфекции [6; 7]. Как показывает опыт использования вирионов обезьяньего лентивируса SIVmac239, содержащих Vpx белок, эффективность трансдукции ДК может быть увеличена более чем на два порядка [8; 9]. Тем не менее, лентивирусные векторы на основе HIV-1 не кодируют Vpx и Vpx не может быть упакован в HIV-1 вирионы.

Получена модифицированная лентивирусная векторная система на основе HIV-1, которая позволяет упаковывать экзогенный белок Vpx в вирионы и эффективно доставлять экспрессирующие конструкции в ДК. Способность эффективно трансдуцировать ДК с Vpx-содержащими лентивирусными векторами предоставляет средства для долговременной, эндогенной продукции антигена и коэкспрессии иммуномодуляторных белков, которые повышают адаптивный иммунный ответ.

Материалы и методы исследования. *Конструирование плазмид.* В работе были использованы следующие плазмиды, которые входят в состав лентивирусной векторной системы третьего поколения на основе HIV-1: pLP1 является плазмидой-упаковщиком и кодирует все структурные и не структурные белки вириона, включая белок р6; pLP/VSVG кодирует поверхностный гликопротеин вируса везикулярного стоматита; pLP2 кодирует вспомогательный белок rev; pH-ZsGreen является лентивирусным вектором, который кодирует маркерный ген ZsGreen (Invitrogen). Модификации в составе гена, кодирующего белок р6 HIV-1, были получены на основе плазмиды pLP1 в результате трех этапов молекулярного клонирования (плазмиды pLP1-M1, pLP1-M2). Кодон-оптимизированная последовательность гена Vpx SIVmac239 была получена с использованием технологии перекрывающихся PCR фрагментов и клонирована в составе экспрессирующего вектора pcDNATM3.1/Zeo(+) (Invitrogen) под контролем CMV промотора (плазида pVpx1). Для конструирования плазмид были использованы стандартные методы молекулярного клонирования [10]. Корректность структуры модифицированных участков плазмид и кодон-оптимизированной последовательности гена Vpx была подтверждена секвенированием, которое проводили по методу Сэнгера с использованием набора BigDyeTM Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit производства Teromfisher согласно инструкции производителя.

Для введения модификаций в кодирующую последовательность белка р6 HIV-1 и синтеза кодон-оптимизированной нуклеотидной последовательности гена Vpx SIVmac239 были использованы следующие олигонуклеотиды:

P6d1 5' – gaccagctgtgatctgctaaagaactactctcagaagcaggag – 3'
P6r1 5' – atccacagctgggtcgtctctcttctggtg – 3'
P6d2 5' – gaccagcagtgatctgctaaagaactacgaagagacaacaactc – 3'
P6r2 5' – atccactgctgggtcgtctctcttctggtg – 3'
Psd 5' – cgcgctgcagaatgggatagagtgc – 3'
Psr 5' – gcgctgcaggtgtggtattccta – 3'
Vxd1 5' – ccagagagagaatcccccggaacagcgaggagaccatcgcgaggccttcgagtgg – 3'
Vxr1 5' – ggcaggtgtgtcacggcctctgtgtgactctctccacggttctgttcagccactcgaaggc – 3'
Vxd2 5' – gaaccacctgcccagagagctgacttccaggtgtggcagagaagctgggagtactggcacg – 3'
Vxr2 5' – caggcacaggtatctgtacttcacgtagctggggtcatgccctgctcgtgcccagtactc – 3'
Vxd3 5' – gatacctgtgctgatccagaaggccctgttcactgcactgcaagaagggtgcagatgctggg – 3'
Vxr3 5' – gaggaggaggaggaggccgggtctccagccgcccggcgccgtggccctcggccaggtcatcg – 3'
VxD 5' – cgcggctagcggccacatgagcgacccagagagagaatcc – 3'
VxR 5' – gcgctcaggtcaggccaggccaggaggaggaggaggaggaggc – 3'

Клетки и их культивирование. Для получения рекомбинантного вируса, а также определения вирусных титров была использована человеческая клеточная линия 293Т. Клетки этой линии обладают способностью к быстрому делению, а также могут быть с высокой эффективностью трансфицированы плазмидной ДНК. Клетки культивировали в среде DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 2мМ L-глутамин, 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина в атмосфере 5 % CO₂ при температуре 37 °С. PBMC были получены на градиенте плотности фиколла из периферической крови здоровых доноров после получения информированного согласия в РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий. Дендритные клетки были дифференцированы из моноцитов крови, очищенных методом сорбции на пластике из PBMC, в среде RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute medium), содержащей 5 % АВ (IV) сыворотки человека в присутствии различных концентраций дифференцировочных факторов (GM-CSF и IL-4) в течение шести дней, заменяя среду культивирования каждые два дня. Для иммунофенотипического анализа ДК (CD14, DC-SIGN, CD1c, CD11c, HLA-DR, CD40, CD83, CD86) использовали метод проточной цитофлуориметрии. Измерения проводили на приборе FACSCanto II (Becton Dickinson, США).

Трансфекция векторов. Для приготовления лентивирусных векторных стоков, клетки 293Т котрансфицировали методом кальций-фосфатной преципитации [10] со следующими плазмидами: лентивирусным вектором pH-ZsGreen, плазмидой-упаковщиком pLP1 или ее модификациями pLP1-M1 и pLP1-M2, pLP/VSVG (кодирует поверхностный гликопротеин оболочки вируса везикулярного стоматита), pLP2 (кодирует вспомогательный белок rev, необходимый для транспорта и экспрессии вирус-специфичных м-РНК) (Invitrogen). Для приготовления векторных стоков, которые использовались для инфицирования ДК, в состав смеси для котрансфекции также включалось различное количество плазмиды pVrx1, кодирующей Vrx белок. На следующий день культуральную среду заменяли на свежую и инкубацию продолжали в течение 48 ч, после чего культуральный супернатант, содержащий вирус, собирали, пропускали через 0,45 мкм фильтры и замораживали в аликвотах при –80 °С.

Определение биологического титра вируса. Инфицирование проводили немедленно после сбора вируса или размораживания вирусного стока [10]. Реципиентные клетки 293Т высевали с плотностью $0,7 \times 10^5$ на лунку 24-луночного планшета за день до инфицирования. На второй день среду заменяли на 0,5 мл свежей среды, содержащей 8 мкг/мл полибрена и аликвоты тестируемого вируса. Инкубирование проводили в течение 6 ч, после чего среду заменяли на свежую. Через 48 ч инкубации клетки снимали трипсином, ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере и измеряли уровни флуоресценции ZsGreen на проточном цитофлуориметре. Инфицирование ДК проводили в аналогичных условиях за исключением полибрена, концентрация которого была снижена до 2 мкг/мл, чтобы исключить его токсичность для ДК.

Результаты и их обсуждение. Введение генетических модификаций в лентивирусную векторную систему на основе HIV-1, позволяющих упаковывать в вирионы Vrx белок экзогенного происхождения. Для получения лентивирусной векторной системы на основе HIV-1, способной упаковывать в вирионы Vrx белок вируса SIVmac239, нами были введены специфические детерминанты SIVmac239 в состав белка р6 HIV-1, которые отвечают за его упаковку в вирионы.

Упаковка Vrx белка происходит во время сборки вируса на цитоплазматической мембране через взаимодействие с карбоксильным доменом полипротеина предшественника gag, которым является белок р6. Взаимодействие является вирус-специфичным, так как Vrx белок упаковывается только вирионами SIVmac239, но не HIV-1 [11]. р6 Домен полипротеина gag структурирован как 2 α-спирали, в которых РТАРР мотив, что связывает TSG101, расположен рядом с α-спиралью 1, тогда как ALIX связывающий мотив перекрывается с α-спиралью 2 [12; 13]. Аминокислотная последовательность (DPAVDLL) белка р6, ответственная за упаковку Vrx, была картирована на карбоксильном конце РТАРР мотива (рис. 1, а) [11].

В связи с тем, что белок р6 также содержит детерминанты для упаковки вспомогательного фактора Vrg, существует вероятность того, что изменение этого региона в геноме вируса может повлиять на его упаковку. Более ранние исследования показали, что мотив, ответственный за

упаковку Vpr, имеет две различные локализации. Е. Kondo и Н. Gottlinger картировали детерминанту упаковки Vpr для HIV-1 и SIVmac239 в составе мотива 41LXXLF45 около карбоксильного конца р6, который перекрывается с ALIX связывающим мотивом (рис. 1, *a*, motif 2) [14]. Впоследствии Н. Zhu и соавт. было обнаружено, что р6 с делецией мотива 2 сохраняет способность упаковывать Vpr, тогда как для упаковки Vpr был необходим мотив 15FRFG18, расположенный на N-конце белка р6 (рис. 1, *a*, motif 1) [15]. В настоящее время принято, что оба мотива необходимы для упаковки Vpr, тогда как мотив 1 является сайтом связывания для Vpr, мотив 2 влияет на конформацию белка р6 [12].

Для введения модификаций в кодирующую последовательность белка р6 нами была выбрана лентивирусная векторная система на основе генома HIV-1 третьего поколения, которая кроме вектора для сборки вириона включает три различные плазмиды: pLP1 кодирует белки gag и pol



Рис. 1. Аминокислотные последовательности белков р6 NL4-3 (HIV-1) и SIVmac239.

Две предложенные α -спирали ($\alpha 1$ и $\alpha 2$) заштрихованы, PTAPP мотив и TSG101 связывающийся сайт выделены жирным шрифтом и подчеркнуты. Связывающиеся сайты для ALIX, Vpx и Vpr (Motif 1 и Motif 2) также выделены жирным шрифтом и подчеркнуты (*a*); модификация аминокислотных последовательностей в составе белка р6 HIV-1. Аминокислотные последовательности, которые были использованы для замены, выделены жирным шрифтом и подчеркнуты. Заштрихованные последовательности указывают, что эти аминокислоты не были удалены. M1, модификация 1; M2, модификация 2 (*b*)

Fig. 1. Amino acid sequences of the p6 NL4-3 (HIV-1) and SIVmac239 proteins.

The two proposed α -helices ($\alpha 1$ and $\alpha 2$) are hatched, the PTAPP motif and the TSG101 binding site are shown in bold and underlined. The binding sites for ALIX, Vpx, and Vpr (Motif 1 and Motif 2) are also shown in bold and underlined (*a*); Modification of amino acid sequences within the HIV-1 p6 protein. The amino acid sequences that were used for substitution are shown in bold and underlined. The hatched sequences indicate that these amino acids were not deleted. M1, modification 1; M2, modification 2 (*b*)

и является плазмидой-упаковщиком, так как кодирует все структурные белки вириона, включая белок р6, а также ферменты, необходимые для репликации вирусного генома; рLP/VSVG кодирует поверхностный гликопротеин оболочки вируса везикулярного стоматита; рLP2 кодирует вспомогательный белок rev, необходимый для транспорта и экспрессии вирус-специфичных м-РНК (Invitrogen).

Модификации аминокислотных последовательностей в составе белка р6 HIV-1 для придания ему способности упаковывать Vpx SIVmac239 представлены на рис. 1, *b*. Одна из модификаций состояла в замене мотива FRFG, ответственного за связывание с Vpr, а также прилегающих 6 аминокислот VETTTTP р6 HIV-1 на 10 аминокислот DPAVDLLKNY р6 SIVmac239, включающих сайт связывания с Vpx (M1). Вторая модификация включала только замену мотива FRFG р6 HIV-1 на 10 аминокислот DPAVDLLKNY р6 SIVmac239 (M2, рис. 1, *b*). Поскольку белки р6 HIV-1 и SIVmac239 имеют очевидную структурную и функциональную гомологию, модификации были подобраны в расчете на минимальные изменения в структуре белка. Обе модификации в составе белка р6 HIV-1 были получены на основе плазмиды рLP1 (Invitrogen) в результате трех этапов молекулярного клонирования. Олигонуклеотиды, которые были использованы для конструирования плазмид, приведены в разделе «Материалы и методы исследования».

Синтез кодон-оптимизированной последовательности гена Vpx и ее клонирование в составе индивидуального экспрессирующего вектора. Упаковка большого количества белка Vpx SIVmac239 в вирусные частицы HIV-1 может ингибировать репликацию вируса, тогда как его должно быть достаточно для инактивации рестрикционного фактора SAMHD1. Эти условия могут быть определены экспериментально, если в векторной системе Vpx белок будет экспрессирован в составе индивидуального вектора за счет изменения количества трансфицируемой ДНК (дозы гена). Кроме того, для экспрессии гена Vpx SIVmac239 в клетках человека он нуждается в кодон-оптимизации, так как природным хозяином SIVmac239 является макак резус.

Для оптимизации кодонного состава гена Vpx SIVmac239 (GenBank: AY588946.1) был использован алгоритм OptimumGeneTM Codon Optimization Technology (GenScript), который учитывает различные факторы, влияющие на уровни экспрессии генов, такие как смещение кодонов, GC-состав, содержание CpG-динуклеотидов, вторичную структуру м-РНК, tandemные повторы, преждевременные сайты полиаденилирования, дополнительные минорные сайты связывания с рибосомами.

Кодон-оптимизированная последовательность гена Vpx SIVmac239 была получена с использованием технологии перекрывающихся PCR фрагментов. Последовательности олигонуклеотидов, которые были использованы для синтеза, приведены в разделе «Материалы и методы исследования». Кодон-оптимизированный ген Vpx далее был клонирован в составе экспрессирующего вектора pcDNATM3.1/Zeo⁽⁺⁾ (Invitrogen) для его экспрессии под контролем CMV промотора (CMV, Cytomegalovirus Early Gene Promoter).

Способность модифицированных плазмид-упаковщиков поддерживать высокий уровень репликации лентивирусного генома. Способность модифицированных плазмид поддерживать определенный уровень репликации лентивирусных векторов по сравнению с векторной системой «дикого типа» изучена на индикаторной клеточной линии HEK293T. Для этих целей была использована лентивирусная векторная система третьего поколения, которая, как отмечалось выше, включает четыре компонента: плазмиду-упаковщик (рLP1, Invitrogen), плазмиду рLP2, плазмиду рLP/VSVG, а также лентивирусный вектор (рH-ZsGreen) для клонирования и экспрессии генов. Модифицированные плазмиды рLP1-M1 и рLP1-M2, в которые были введены изменения для упаковки в вирионы экзогенного белка Vpx, а также исходная плаزمид рLP1 («дикого типа») были введены в составе четырехкомпонентной векторной системы в клеточную линию HEK293T посредством трансфекции для последующего сравнительного анализа эффективности репликации лентивирусного вектора.

Эффективность репликации оценивалась на основе анализа вирусных титров, продуцируемых трансфицированными клетками на индикаторной клеточной линии. В качестве маркера определения вирусных титров был использован ZsGreen, ген которого кодируется вирусным вектором (рH-ZsGreen). Сравнительный анализ вирусных титров, полученных с использованием

модифицированных плазмид pLP1-M1 и pLP1-M2, а также исходной плазмиды pLP1 («дикого типа») показал, что введенные модификации в состав белка рб не оказывают заметного влияния на продукцию вирусных частиц векторной системой и эффективность репликации вирусного вектора. Результаты представлены в табл. 1.

Т а б л и ц а 1. Способность модифицированных плазмид поддерживать репликацию лентивирусного вектора

Table 1. The ability of modified plasmids to support replication of lentiviral vector

Плазмида-упаковщик Plasmid packer	Популяция клеток-продуцентов Population of producer cells	Вирусный титр (ТЕ/мл)* Viral titer (TE/ml)*
pLP1	1	$1,5 \cdot 10^6$
	2	$3,1 \cdot 10^6$
pLP1-M1	1M1	$3,9 \cdot 10^6$
	2M1	$2,2 \cdot 10^6$
pLP1-M2	1M2	$4,3 \cdot 10^6$
	2M2	$2,7 \cdot 10^6$

Примечание: * – ТЕ/мл, трансдуцирующих единиц на миллилитр.

Note: * – TE/ml, transducing units per milliliter.

Кроме того, было также изучено возможное влияние количества Vpx белка на формирование функциональных вирусных частиц и репликацию лентивирусного вектора. Для этой цели в векторных системах (исходной и модифицированных) для получения вирусных частиц были использованы различные количества плазмиды (pVpx1), кодирующей Vpx белок вируса SIVmac239. Как показали результаты сравнения вирусных титров, упаковка большого количества Vpx белка в вирионы оказывает ингибирующий эффект на репликацию вируса и для оптимального использования его в векторной системе необходимо подбирать определенные соотношения плазмидных ДНК, кодирующих различные белки вириона (табл. 2).

Т а б л и ц а 2. Эффект количества упакованного Vpx белка на инфекционность вирионов

Table 2. The effect of the amount of packaged Vpx protein on the infectivity of virions

Плазмида-упаковщик Plasmid packer	Популяция клеток-продуцентов Population of producer cells	Количество pVpx1 (мкг/трансфекция) Amount of pVpx1 (μg/transfection)	Вирусный титр (ТЕ/мл)* Viral titer (TE/ml)*
pLP1	1V1	1	$1,4 \cdot 10^4$
	2V1	1	$8,0 \cdot 10^3$
	1V0.25	0,25	$6,6 \cdot 10^5$
	2V0.25	0,25	$1,3 \cdot 10^6$
pLP1-M1	1M1V1	1	$8,6 \cdot 10^4$
	2M1V1	1	$1,1 \cdot 10^5$
	1M1V0.25	0,25	$1,5 \cdot 10^6$
	2M1V0.25	0,25	$0,9 \cdot 10^6$
pLP1-M2	1M2V1	1	$8,5 \cdot 10^4$
	2M2V1	1	$1,2 \cdot 10^5$
	1M2V0.25	0,25	$1,9 \cdot 10^6$
	2M2V0.25	0,25	$7,2 \cdot 10^5$

Примечание: * – ТЕ/мл, трансдуцирующих единиц на миллилитр.

Note: * – TE/ml, transducing units per milliliter.

Эффективность трансдукции дендритных клеток человека с помощью модифицированных Vpx-содержащих лентивирусных векторов. Как отмечалось выше, ДК содержат высокую концентрацию рестрикционного фактора SAMHD1, который ингибирует репликацию лентивирусов [6; 7]. Вспомогательный белок вируса SIVmac Vpx является антогонистом SAMHD1 и бло-

кирует его действие в инфицируемых клетках [5]. Исходя из этого, можно предположить, что упаковка Vpx белка SIVmas в вирионы лентивирусной векторной системы на основе HIV-1 будет увеличивать их инфекционность на ДК. С этой целью мы тестировали способность модифицированных векторных систем, которые содержат в составе плазмид-упаковщиков минимальные последовательности для упаковки экзогенного белка Vpx, инфицировать дифференцированные из моноцитов ДК человека. В тестировании использовались три векторные системы, которые отличались модификациями в составе рб белка плазмид-упаковщиков (исходная – pLP1, модифицированные – pLP1-M1, pLP2-M2) и включали определенное количество ДНК плазмиды pVpx1, кодирующей белок Vpx SIVmas. Количество ДНК pVpx1 подбиралось экспериментально на

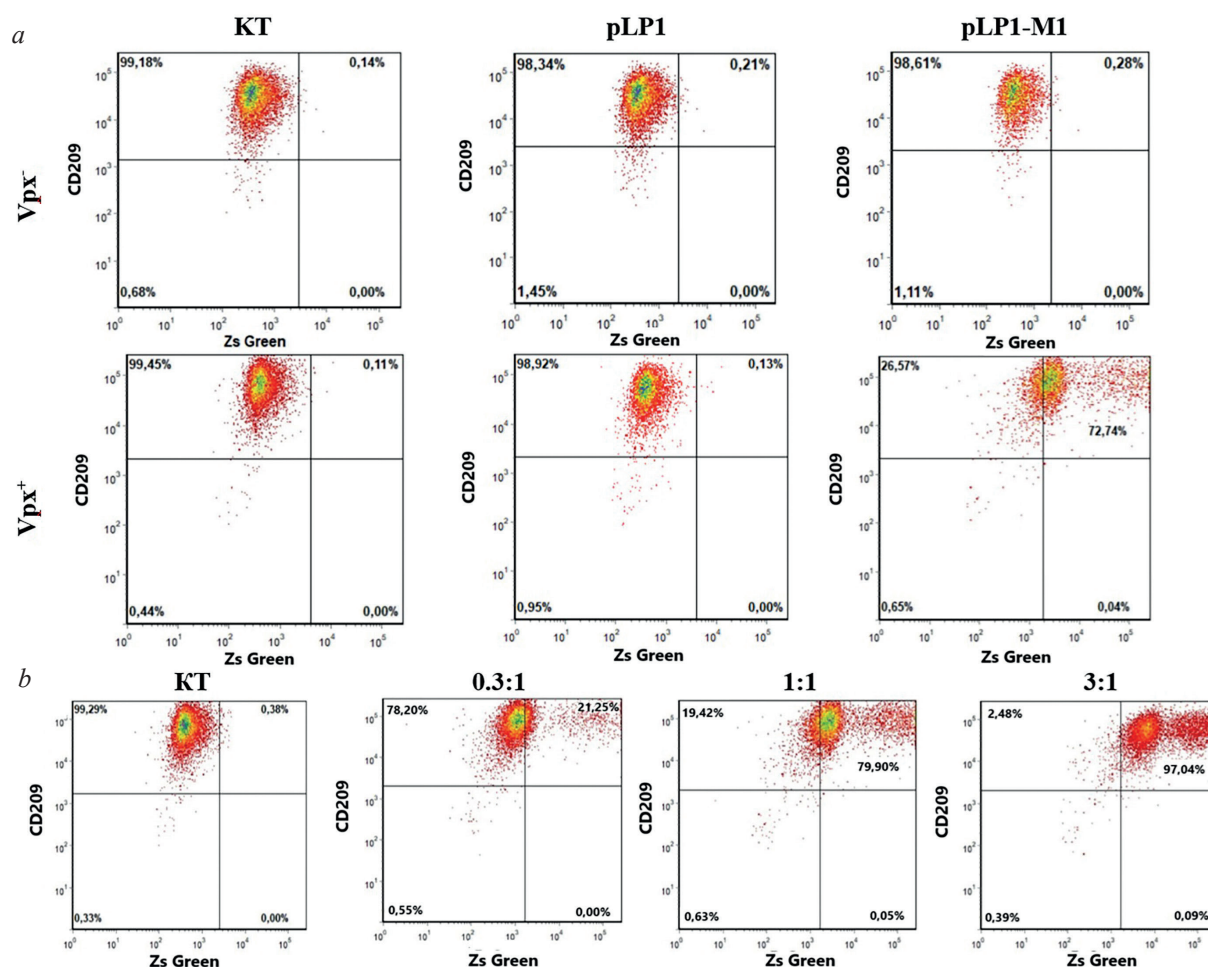


Рис. 2. Влияние упаковки Vpx белка на инфицирование ДК лентивирусными вирионами. ДК были инфицированы при множественности заражения 1 : 1 с использованием лентивирусного вектора (pH-ZsGreen), экспрессирующего маркерный ген ZsGreen. На второй день после инфицирования клетки были собраны, и экспрессия гена ZsGreen анализировалась при помощи FACS. CD209, дифференцировочный маркер ДК. КТ, контрольные клетки, не инфицированные вирусом; Vpx⁺ и Vpx⁻, клетки, инфицированные с включением и без включения Vpx белка в вирионы соответственно; pLP1 и pLP1-M1, клетки, инфицированные либо вирионами «дикого типа», либо модифицированными вирионами соответственно (a); ДК были инфицированы при множественности заражения 0,3 : 1, 1 : 1 и 3 : 1 с использованием модифицированных вирионов (pLP1-M1), включающих Vpx белок (вектор pH-ZsGreen). Все приведенные обозначения как в a (b)

Fig. 2. The effect of Vpx protein packaging on the infection of DC by lentiviral virions. DC were infected at a multiplicity of infection of 1 : 1 using a lentiviral vector (pH-ZsGreen) expressing the ZsGreen marker gene. On day 2 post-infection, cells were harvested and ZsGreen gene expression was analyzed by FACS. CD209, a DC differentiation marker. CT, uninfected control cells; Vpx⁺ and Vpx⁻, cells infected with and without inclusion of Vpx protein in virions, respectively; pLP1 and pLP1-M1, cells infected with either wild-type or modified virions, respectively (a); DC were infected at multiplicities of infection of 0.3 : 1, 1 : 1, and 3 : 1 using modified virions (pLP1-M1) containing the Vpx protein (pH-ZsGreen vector). All designations are as in a (b)

клетках 293Т, чтобы исключить значительный ингибирующий эффект Vpx белка на инфекционность вирионов. Вирусные супернатанты были нормализованы по инфекционности на индикаторной клеточной линии 293Т и затем использованы для инфицирования ДК.

Инфекционность вирусных супернатантов для ДК была изучена при множественности заражения 1 : 1 (согласно вирусным титрам на клетках 293Т). На ДК исходный вирус (дикого типа, плазмиды рLP1) не показал инфекционности как в отсутствии, так и в присутствии Vpx белка. Для модифицированных вирусов (плазмиды рLP1-M1 и рLP1-M2) были получены практически одинаковые результаты. Инфекционность модифицированного вируса на основе плазмиды рLP1-M1 для ДК показана на рис. 2, *a*. Согласно результатам, контрольные клетки, а также клетки, инфицированные вирусом в отсутствии Vpx белка, являются ZsGreen⁺, тогда как 72 % ДК, инфицированных модифицированным вирусом с включением белка Vpx, несут маркерный ген ZsGreen. Таким образом, включение Vpx белка в вирионы лентивируса является критичным для их инфекционности на ДК. Обе модификации в составе белка р6 (плазмиды рLP1-M1 и рLP1-M2) показали сходный эффект на упаковку белка р6 SIVmac239 и инфекционность вирионов на ДК. Отсутствие специального сайта связывания для Vpx в составе белка р6 плазмиды «дикого типа» рLP1, судя по всему, не позволяет упаковывать в вирионы достаточное количество экзогенного белка Vpx для инактивации рестрикционного фактора SAMHD1, так как вирус «дикого типа», полученный даже в присутствии Vpx белка, был не способен продуктивно инфицировать ДК. На рис. 2, *b* показаны результаты титрования модифицированного вируса (плазмиды рLP1-M1), который был использован для инфицирования ДК с множественностью заражения 0,3 : 1, 1 : 1 и 3 : 1. Как видно из рис. 2, при множественности заражения 3 : 1 лентивирусный вектор был введен с помощью модифицированной векторной системы в 97 % ДК. Изучение эффективности трансдукции на ДК, полученных от различных доноров, показало сходные результаты.

Заключение. Согласно литературным данным были определены ключевые детерминанты белка р6 SIVmac239, ответственные за упаковку вспомогательного белка Vpx в вирусные частицы, а также аминокислотные мотивы р6 HIV-1, которые отвечают за связывание и упаковку вспомогательного белка Vpr [11–15]. На основе структурной и функциональной гомологии белков р6 HIV-1 и SIVmac239 были определены две основные модификации белка р6 HIV-1 для придания ему способности упаковывать в вирионы белок экзогенного происхождения Vpx SIVmac239. Модификации в составе нуклеотидных последовательностей, кодирующих белок р6 HIV-1, были получены на основе плазмиды рLP1 (Invitrogen), которая входит в состав лентивирусной векторной системы третьего поколения и кодирует все структурные белки вириона, включая белок р6.

Для экспрессии вспомогательного белка Vpx SIVmac239 в клетках человека была получена кодон-оптимизированная последовательность гена Vpx. Для оптимизации кодонного состава гена Vpx SIVmac239 был использован алгоритм OptimumGeneTM (GenScript), который учитывает различные факторы, влияющие на уровни экспрессии генов. Кодон-оптимизированные последовательности гена Vpx были клонированы в составе индивидуального экспрессирующего вектора pcDNATM3.1/Zeo(+) (Invitrogen) для его экспрессии под контролем сильного конститутивного промотора CMV. Экспрессия Vpx в составе индивидуального вектора позволяет экспериментально подбирать условия для упаковки в вирионы оптимального количества белка за счет изменения «дозы гена» (количества трансфицируемой ДНК).

Способность модифицированных плазмид-упаковщиков поддерживать репликацию лентивирусных векторов была изучена на индикаторной клеточной линии 293Т. Сравнительный анализ вирусных титров, полученных с использованием модифицированных плазмид, а также исходной плазмиды («дикого типа») показал, что введенные модификации в состав белка р6 не оказывают заметного влияния на продукцию вирусных частиц векторной системой и эффективность репликации вирусного вектора. Кроме того, было показано, что упаковка большого количества Vpx белка в вирионы оказывает ингибирующий эффект на репликацию вируса и для оптимального использования его в векторной системе необходимо подбирать определенные соотношения плазмидных ДНК, экспрессирующих различные белки вириона.

Лентивирусная векторная система, содержащая в составе плазмиды-упаковщика последовательности для упаковки экзогенного белка V_{px}, была использована для изучения ее способности инфицировать дифференцированные из моноцитов крови ДК человека. Как показали результаты, включение V_{px} белка в вирионы лентивируса является критичным для их инфекционности на ДК. Вирус «дикого типа», полученный даже в присутствии V_{px} белка, был не способен продуктивно инфицировать ДК, так как не содержит специфичного сайта связывания для упаковки V_{px} белка в вирионы. Эффективность трансдукции ДК при помощи модифицированной векторной системы для различных доноров составила 90–97 %.

Для эффективного введения лентивирусных векторов в ДК ранее была предложена система, где ДК предварительно обрабатывались вирионами обезьяньего лентивируса SIV_{mac}239, содержащими V_{px} белок, для инактивации рестрикционного фактора SAMHD1, а затем для введения генов использовались лентивирусные векторы на основе HIV-1 [8; 9]. Отличительной особенностью предложенной нами векторной системы является ее способность упаковывать V_{px} белок SIV_{mac} непосредственно в вирионы HIV-1, что дает возможность напрямую вводить вирусные векторы на основе HIV-1 в ДК, без предварительной их обработки обезьяньим вирусом SIV_{mac}. Таким образом, полученная лентивирусная векторная система на основе HIV-1 может быть использована для эффективного введения и экспрессии генов, кодирующих различные антигены и иммуномодулирующие факторы в ДК человека.

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства здравоохранения Республики Беларусь (ГПНИ «Фундаментальные и прикладные науки – медицине», 2016–2020, подпрограмма 2 «Диагностика и терапия заболеваний», задание 2.146 (Рег. № 20200252, 2020 год) и ГПНИ «Биотехнология-2», 2021–2025, подпрограмма «Молекулярные и клеточные биотехнологии-2», задание 1.14 (Рег. № 20220282, 2022–2024 гг.)).

Acknowledgments. The work was carried out with the financial support of the Ministry of Health of the Republic of Belarus (SPSR “Fundamental and Applied Sciences – Medicine”, 2016–2020, subprogram 2 “Diagnostics and Therapy of Diseases”, task 2.146 (Reg. No. 20200252, 2020), and SPSR “Biotechnology-2”, 2021–2025, subprogram “Molecular and Cellular Biotechnology-2”, task 1.14 (Reg. No. 20220282, 2022–2024)).

Список использованных источников

1. Steinman, R. M. Decisions about dendritic cells: past, present, and future / R. M. Steinman // *Annual Review of Immunology*. – 2012. – Vol. 30. – P. 1–22. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-100311-102839>
2. Steinman, R. M. Taking dendritic cells into medicine / R. M. Steinman, J. Banchereau // *Nature*. – 2007. – Vol. 449. – P. 419–426. <https://doi.org/10.1038/nature06175>
3. Targeted delivery of TLR ligands to human and mouse dendritic cells strongly enhances adjuvanticity / P. J. Tacken, I. S. Zeelenberg, L. J. Cruz [et al.] // *Blood*. – 2011. – Vol. 118, N 26. – P. 6836–6844. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-07-367615>
4. Naldini, L. Lentiviruses as gene transfer agents for delivery to non-dividing cells / L. Naldini // *Current Opinion in Biotechnology*. – 1998. – Vol. 9, N 5. – P. 457–463. [https://doi.org/10.1016/s0958-1669\(98\)80029-3](https://doi.org/10.1016/s0958-1669(98)80029-3)
5. SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates / H. Lahouassa, W. Daddacha, H. Hofmann [et al.] // *Nature Immunology*. – 2012. – Vol. 13. – P. 223–228. <https://doi.org/10.1038/ni.2236>
6. SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx / N. Laguette, B. Sobhian, N. Casartelli [et al.] // *Nature*. – 2011. – Vol. 474. – P. 654–657. <https://doi.org/10.1038/nature10117>
7. Vpx relieves inhibition of HIV-1 infection of macrophages mediated by the SAMHD1 protein / K. Hrecka, C. Hao, M. Gierszewska [et al.] // *Nature*. – 2011. – Vol. 474. – P. 658–661. <https://doi.org/10.1038/nature10195>
8. With a little help from a friend: increasing HIV transduction of monocyte-derived dendritic cells with virion-like particles of SIV_{MAC} / C. Goujon, L. Jarrosson-Wuilleme, J. Bernaud [et al.] // *Gene Therapy*. – 2006. – Vol. 13. – P. 991–994. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302753>
9. A cryptic sensor for HIV-1 activates antiviral innate immunity in dendritic cells / N. Manel, B. Hogstad, Ya. Wang [et al.] // *Nature*. – 2010. – Vol. 467. – P. 214–217. <https://doi.org/10.1038/nature09337>
10. Sambrook, J. F. Molecular cloning: a laboratory manual / J. Sambrook. – Cold Spring Harbor, 2001. – 3d ed.
11. A conserved dileucine-containing motif in p6^{gag} governs the particle association of Vpx and Vpr of simian immunodeficiency viruses SIV_{mac} and SIV_{agm} / M. A. Accola, A. A. Bukovsky, M. S. Jones, H. G. Gottlinger // *Journal of Virology*. – 1999. – Vol. 73, N 12. – P. 9992–9999. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.12.9992-9999.1999>
12. Solution structure of the human immunodeficiency virus type 1 p6 protein / T. Fossen, V. Wray, K. Bruns [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2005. – Vol. 280, N 52. – P. 42515–42527. <https://doi.org/10.1074/jbc.M507375200>
13. Identification and structural characterization of the ALIX-binding late domains of simian immunodeficiency virus SIV_{mac}239 and SIV_{agm}Tan-1 / Q. Zhai, M. B. Landesman, H. Robinson [et al.] // *Journal of Virology*. – 2011. – Vol. 85, N 1. – P. 632–637. <https://doi.org/10.1128/JVI.01683-10>

14. Kondo, E. A conserved LXXLF sequence is the major determinant in p6gag required for the incorporation of human immunodeficiency virus type 1 Vpr / E. Kondo, H. G. Gottinger // *Journal of Virology*. – 1996. – Vol. 70, N 1. – P. 159–164. <https://doi.org/10.1128/JVI.70.1.159-164.1996>

15. Zhu, H. Identification of the ¹⁵FRFG domain in HIV-1 Gag p6 essential for Vpr packaging into the virion / H. Zhu, H. Jian, L. J. Zhao // *Retrovirology*. – 2004. – Vol. 1. – Art. 26. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-1-26>

References

1. Steinman R. M. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annual Review of Immunology*, 2012, vol. 30, pp. 1–22. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-100311-102839>
2. Steinman R. M., Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature*, 2007, vol. 449, pp. 419–426. <https://doi.org/10.1038/nature06175>
3. Tacke P. J., Zeelenberg I. S., Cruz L. J., van Hout-Kuijter M. A., van de Glind G., Fokkink R. G., Lambeck A. J. A., Figdor C. G. Targeted delivery of TLR ligands to human and mouse dendritic cells strongly enhances adjuvanticity. *Blood*, 2011, vol. 118, no. 26, pp. 6836–6844. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-07-367615>
4. Naldini L. Lentiviruses as gene transfer agents for delivery to non-dividing cells. *Current Opinion in Biotechnology*, 1998, vol. 9, no. 5, pp. 457–463. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(98\)80029-3](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(98)80029-3)
5. Lahouassa H., Daddacha W., Hofmann H., Ayinde D., Logue E. C., Dragin L., Bloch N., Maudet C., Bertrand M., Gramberg T., Pancino G., Priet S., Canard B., Laguette N., Benkirane M., Transy C., Landau N. R., Kim B., Margottin-Goguet F. SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates. *Nature Immunology*, 2012, vol. 13, pp. 223–228. <https://doi.org/10.1038/ni.2236>
6. Laguette N., Sobhian B., Casartelli N., Ringard M., Chable-Bessia C., Ségéral E., Yatim A., Emiliani S., Schwartz O., Benkirane M. SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature*, 2011, vol. 474, pp. 654–657. <https://doi.org/10.1038/nature10117>
7. Hrecka K., Hao C., Gierszewska M., Swanson S. K., Kesik-Brodacka M., Srivastava S., Florens L., Washburn M. P., Skowronski J. Vpx relieves inhibition of HIV-1 infection of macrophages mediated by the SAMHD1 protein. *Nature*, 2011, vol. 474, pp. 658–661. <https://doi.org/10.1038/nature10195>
8. Goujon C., Jarrosson-Wuillème L., Bernaud J., Rigal D., Darlix J. L., Cimorelli A. With a little help from a friend: increasing HIV transduction of monocyte-derived dendritic cells with virion-like particles of SIV_{MAC}. *Gene Therapy*, 2006, vol. 13, pp. 991–994. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302753>
9. Manel N., Hogstad B., Wang Ya., Levy D. E., Unutmaz D., Littman D. R. A cryptic sensor for HIV-1 activates antiviral innate immunity in dendritic cells. *Nature*, 2010, vol. 467, pp. 214–217. <https://doi.org/10.1038/nature09337>
10. Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3d ed. Cold Spring Harbor, 2001.
11. Accola M. A., Bukovsky A. A., Jones M. S., Göttinger H. G. A conserved dileucine-containing motif in p6(gag) governs the particle association of Vpx and Vpr of simian immunodeficiency viruses SIV(mac) and SIV(agm). *Journal of Virology*, 1999, vol. 73, no. 12, pp. 9992–9999. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.12.9992-9999.1999>
12. Fossen T., Wray V., Bruns K., Rachmat J., Henklein P., Tessmer U., Maczurek A., Klinger P., Schubert U. Solution structure of the human immunodeficiency virus type 1 p6 protein. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, vol. 280, no. 52, pp. 42515–42527. <https://doi.org/10.1074/jbc.M507375200>
13. Zhai Q., Landesman M. B., Robinson H., Sundquist W. I., Hill C. P. Identification and structural characterization of the ALIX-binding late domains of simian immunodeficiency virus SIV_{mac239} and SIV_{agmTan-1}. *Journal of Virology*, 2011, vol. 85, no. 1, pp. 632–637. <https://doi.org/10.1128/JVI.01683-10>
14. Kondo E., Göttinger H. G. A conserved LXXLF sequence is the major determinant in p6gag required for the incorporation of human immunodeficiency virus type 1 Vpr. *Journal of Virology*, 1996, vol. 70, no. 1, pp. 159–164. <https://doi.org/10.1128/JVI.70.1.159-164.1996>
15. Zhu H., Jian H., Zhao L. J. Identification of the ¹⁵FRFG domain in HIV-1 Gag p6 essential for Vpr packaging into the virion. *Retrovirology*, 2004, vol. 1, art. 26. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-1-26>

Информация об авторах

Пилиутина Ольга Юрьевна – науч. сотрудник. РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий (Долгиновский тракт, 160, 220053, Минск, Республика Беларусь). E-mail: piliutinao@gmail.com. ORCID: 0009-0000-3464-5200.

Войтехович Александр Сергеевич – науч. сотрудник. РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий (Долгиновский тракт, 160, 220053, Минск, Республика Беларусь). E-mail: voytehovichas@gmail.com. ORCID: 0009-0008-3794-6429.

Information about the authors

Piliutina Olga Yu. – Researcher. Republican Scientific and Practical Center for Transfusiology and Medical Biotechnology (160, Dolginovsky tract, 220053, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: piliutinao@gmail.com. ORCID: 0009-0000-3464-5200.

Voytehovich Alexander S. – Researcher. Republican Scientific and Practical Center for Transfusiology and Medical Biotechnology (160, Dolginovsky tract, 220053, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: voytehovichas@gmail.com. ORCID: 0009-0008-3794-6429.

Фомина Елена Георгиевна – д-р биол. наук, заведующий лабораторией. РЦ гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья (ул. Филимонова, 23, 220114, Минск, Республика Беларусь). E-mail: fegl@tut.by. ORCID: 0000-0003-3028-1176.

Григорьева Елена Евгеньевна – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник, доцент. РЦ гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья (ул. Филимонова, 23, 220114, Минск, Республика Беларусь). E-mail: grigus@mail.ru. ORCID: 0000-0003-3919-0625.

Фомин Игорь Климентьевич – канд. биол. наук, вед. науч. сотрудник. РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий (Долгиновский тракт, 160, 220053, Минск, Республика Беларусь). E-mail: rrlmb27@gmail.com. ORCID: 0009-0006-1921-5978.

Fomina Elena G. – D. Sc. (Biology), Head of the Laboratory. Republican Center for Hygiene, Epidemiology and Public Health (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: fegl@tut.by. ORCID: 0000-0003-3028-1176.

Grigorieva Elena E. – Ph. D. (Biology), Leading Researcher, Associate Professor. Republican Center for Hygiene, Epidemiology and Public Health (23, Filimonov Str., 220114, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: grigus@mail.ru. ORCID: 0000-0003-3919-0625.

Fomin Igor K. – Ph. D. (Biology), Leading Researcher. Republican Scientific and Practical Center for Transfusiology and Medical Biotechnology (160, Dolginovsky tract, 220053, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: rrlmb27@gmail.com. ORCID: 0009-0006-1921-5978.