Введение в современную молекулярную медицину

Учебно-методическое пособие к практикуму

Сириус
Научно-технологический университет

ВВЕДЕНИЕ В СОВРЕМЕННУЮ МОЛЕКУЛЯРНУЮ МЕДИЦИНУ

Учебно-методическое пособие к практикуму

Электронное издание
локального распространения

Санкт-Петербург
Наукоемкие технологии
2026

© Авторский коллектив, 2026
ISBN 978-5-00271-195-6

УДК 61:577.2
ББК 58:28.070.2
В24

Авторы:
А. Д. Егоров, М. В. Баранов, А. Г. Быконя,
Д. С. Волкова, Л. В. Крылова, И. И. Патеев

Рецензенты:
Илья Олегович Мазунин, доктор биологических наук, старший научный сотрудник Центра био- и медицинских технологий Сколковского института науки и технологий, заведующий кафедрой биологии и генетики, Медицинский университет Петровского ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б. В. Петровского»;
Егор Александрович Туровский, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, руководитель группы молекулярных и клеточных механизмов канцерогенеза, Институт биофизики клетки ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН»

В24 Введение в современную молекулярную медицину [Электронный ресурс]: учебно-методическое пособие к практикуму / А. Д. Егоров, М. В. Баранов, А. Г. Быконя и др. – Электрон, текстовые дан. (3,5 Мб). – СПб.: Наукоемкие технологии, 2026. – 78 с. – 1 электрон., опт. диск (CD-ROM).

ISBN 978-5-00271-195-6

Учебно-методическое пособие «Введение в современную молекулярную медицину» сопровождает лабораторный практикум по соответствующей дисциплине и включает общую часть с правилами работы в лаборатории и биобезопасностью, а также четыре тематических модуля: трансдукцию клеток HEK293 аденоассоциированными вирусами (AAV9, AAV8, AAV6), создание плазмидной конструкции для экспрессии направляющих РНК CRISPR/Cas9, получение альбуминовых наночастиц как платформы доставки лекарств и изучение принципов CAR-T терапии. Каждый модуль содержит входные вопросы, словарь терминов, теоретическое введение, подробный пошаговый протокол с расчётами и правилами обработки результатов, а также вопросы и задачи для самоконтроля.

Пособие предназначено для студентов старших курсов специалитета и магистрантов биологических, биотехнологических, медицинских и химических специальностей и может использоваться как в рамках единого курса, так и отдельными модулями.

Текстовое электронное издание
Минимальные системные требования:

- процессор: Intel x86, x64, AMD x86, x64 не менее 1 ГГц;
- оперативная память RAM ОЗУ: не менее 512 МБайт;
- свободное место на жестком диске (HDD): не менее 120 МБайт;
- операционная система: Windows XP и выше;
- Adobe Acrobat Reader;
- дисковод CD-ROM;
- мышь.

УДК 61:577.2
ББК 58:28.070.2

ISBN 978-5-00271-195-6 © Авторский коллектив, 2026

Учебное издание

Егоров Александр Дмитриевич
Баранов Максим Валерьевич
Быконя Алеся Геннадьевна
Волкова Дарья Сергеевна
Крылова Любовь Владимировна
Патеев Ильдус Илдарович

Введение в современную молекулярную медицину

Учебно-методическое пособие к практикуму

Электронное издание
локального распространения

Издается в авторской редакции
Публикуется из оригинал-макета, подготовленного авторами
Главный редактор *В. М. Коровин*

Издательство «Наукоемкие технологии»
ООО «Корпорация «Интел Групп»
https://publishing.intelgr.com
E-mail: publishing@intelgr.com
Тел.: +7 (812) 945-50-63

Подписано к использованию 30.10.2026 г.
Объем издания – 3,5 Мб.
Комплектация издания – 1 CD.
Тираж 500 CD.

ISBN 978-5-00271-195-6

Оглавление

ПРЕДИСЛОВИЕ 7
Назначение пособия 7
Структура практикума 7
Единая структура модулей 8
Связи между модулями 8
ОБЩАЯ ЧАСТЬ. ПРАВИЛА РАБОТЫ В ЛАБОРАТОРИИ И БИОБЕЗОПАСНОСТЬ 9
Нормативная основа 9
Оценка рисков по модулям 9
Основные правила работы 10
Дезинфекция и утилизация отходов 11
Аварийные ситуации 11
Планирование эксперимента и обработка данных 11
Лабораторный журнал и отчёт 12
Нормативные документы 12
МОДУЛЬ 1. ТРАНСДУКЦИЯ КЛЕТОК HEK293 АДЕНОАССОЦИИРОВАННЫМИ ВИРУСАМИ 13
Введение, цель и задачи модуля 13
Цель и задачи 13
Планируемые результаты обучения 14
Организация занятий 14
Принятые допущения 14
Перед началом 15
Словарь терминов и сокращений 15
Теоретическая часть 16
Глава 1. Биология аденоассоциированного вируса 16
Глава 2. Механизмы трансдукции AAV 19
Глава 3. Применение AAV в исследованиях и клинике 22
Глава 4. Основы культивирования клеток 25
Практическая часть 29
Глава 5. Особенности биобезопасности при работе с pAAV и клетками HEK293 29
Глава 6. Практическое задание: трансдукция клеток HEK293 векторами AAV9, AAV8 и AAV6 29
Глава 7. Оценка результатов и оформление отчёта 35
Вопросы для самоконтроля 39
МОДУЛЬ 2. ПРОТОКОЛ ПОДГОТОВКИ ПЛАЗМИДНОЙ КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ НАПРАВЛЯЮЩИХ РНК ДЛЯ CRISPR/CAS9 41
Перед началом 41

Словарь терминов и сокращений.....41
Теоретическая часть.....42
1. Основы дизайна направляющей РНК.....45
2. Проектирование и подготовка вставки.....46
3. Реакция направленного лигирования.....47
4. Трансформация компетентных клеток E. coli.....47
5. Ночное культивирование и создание архива (сток).....48
6. Экстракция и количественный анализ плазмидной ДНК.....48
7. Аналитическая верификация конструкции.....49
Вопросы для самоконтроля:.....49
МОДУЛЬ 3. НАНОЧАСТИЦЫ В МОЛЕКУЛЯРНОЙ МЕДИЦИНЕ: АЛЬБУМИНОВЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ КАК ПЛАТФОРМА ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ.....50
Перед началом.....51
Словарь терминов и сокращений.....52
ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА №1.....53
Теоретическая часть.....53
Цель работы.....57
Оборудование и материалы.....57
Ход работы.....58
1. Приготовление раствора белка.....58
2. Стадия десольватации.....58
3. Сшивка наночастиц.....59
4. Окончание эксперимента.....59
ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА №2.....59
Теоретическая часть.....59
Цель работы.....62
Оборудование и материалы.....62
Ход работы.....62
МЕТОД 1. Инкапсулирование Родамина Б.....62
1.1. Приготовление раствора белка с красителем.....62
1.2. Стадия десольватации.....63
1.3. Сшивка наночастиц.....63
1.4. Очистка.....63
МЕТОД 2. Адсорбция родамина Б (инкубация готовых частиц с красителем).....63
2.1. Инкубация с красителем.....63
2.2. Отделение несвязавшегося красителя.....64
Вопросы для самоконтроля:.....65

МОДУЛЬ 4. ИЗУЧЕНИЕ ПРИНЦИПОВ CAR-T ТЕРАПИИ 66
Перед началом 66
Словарь терминов и сокращений 67
Теоретическое введение 67
Описание практикума 71
1. Анализ карт CAR-T-конструкций в SnapGene (28z и 41BBz) 72
2. Обработка и интерпретация данных проточной цитометрии CytoFLEX по генерации CAR-T 73
3. Окрашивание клеток-мишеней антителами к CD19 73
4. Постановка цитотоксического теста — окрашивание клеток-мишеней красителем CellTrace Red 73
5. Анализ результатов окрашивания и ко-культуры на CytoFLEX 74
6. Просмотр результатов предыдущих цитотоксических экспериментов 74
7. Анализ результатов 74
Вопросы для самоконтроля: 75
Список литературы 76

ПРЕДИСЛОВИЕ

Назначение пособия

Настоящее учебно-методическое пособие предназначено для студентов старших курсов и магистрантов биологических, биотехнологических, медицинских и химических специальностей и сопровождает практикум по курсу «Введение в современную молекулярную медицину». Молекулярная медицина — область, в которой знания о строении и работе генов, белков и клеток используются для диагностики и лечения заболеваний. Её практический арсенал включает доставку нуклеиновых кислот в клетки с помощью вирусных и невирусных носителей, редактирование генома, клеточную терапию и наномедицину. Практикум знакомит студентов с четырьмя такими направлениями на примере лабораторных работ, выполнимых в условиях учебной лаборатории.

Пособие построено по классической схеме учебно-методической литературы: сначала излагается необходимый теоретический материал, затем подробно описываются практические задания, после чего приводятся вопросы для самоконтроля. Общая часть пособия содержит правила работы в лаборатории и требования к ведению журнала и оформлению отчётов; она обязательна для изучения до начала любого из модулей.

Структура практикума

Пособие состоит из общей части и четырёх тематических модулей. Модули выполняются независимо друг от друга, однако связаны общими понятиями и методами (см. ниже).

Модуль	Тема	Ключевые методы	Результат работы
1	Трансдукция клеток HEK293 аденоассоциированными вирусами (AAV9, AAV8, AAV6)	Культивирование адгезионных клеток, расчёт MOI, трансдукция, флуоресцентная микроскопия, проточная цитометрия	Зависимость эффективности трансдукции от серотипа капсида и дозы вектора
2	Плазмидная конструкция для экспрессии направляющих РНК CRISPR/Cas9	Дизайн sgRNA, клонирование Golden Gate, трансформация E. coli, выделение плазмид, ПЦР, секвенирование	Верифицированная плазмида с вставкой sgRNA
3	Альбуминовые наночастицы как платформа доставки лекарств	Синтез методом десольватации и сшивки, варьирование параметров синтеза, загрузка родамина Б (инкапсулирование и адсорбция)	Наночастицы BSA и сравнение способов загрузки модельного красителя
4	Принципы CAR-T терапии	Анализ карт плазмид в SnapGene, проточная цитометрия на CytoFLEX, окрашивание антителами к CD19, цитотоксический тест	Оценка экспрессии CAR и цитотоксической активности CAR-T-клеток

Единая структура модулей

Каждый модуль построен по одной схеме, что позволяет студенту быстро ориентироваться в любом из них:

1. **«Перед началом»** — вопросы входного контроля, на которые студент пытается ответить до чтения теоретической части.
2. **«Словарь терминов и сокращений»** — определения основных понятий модуля.
3. **«Теоретическая часть»** — обзор биологических, химических и методических основ работы.
4. **Практическая часть** — материалы и оборудование, расчёты, пошаговый протокол и правила обработки результатов.
5. **«Вопросы для самоконтроля»** — вопросы и задачи для проверки усвоения материала.

Модуль 1, содержащий развёрнутые главы по биологии AAV и основам культуры клеток, дополнен списком литературы.

Связи между модулями

Хотя каждый модуль можно выполнять отдельно, вместе они образуют логическую цепочку «конструкция — доставка — клетка — применение»: плазмидные конструкции (модуль 2) становятся материалом, который доставляют в клетки вирусными векторами (модули 1 и 4) или наночастицами (модуль 3), а клетки с доставленным геном оцениваются методами проточной цитометрии (модули 1 и 4). Основные общие понятия и методы собраны в таблице.

Общая тема	Модули	Как используется
Доставка генетического материала в клетки	1, 2, 3, 4	Вирусные векторы — AAV (модуль 1) и лентивирусный вектор в основе CAR-T (модуль 4); невирусный носитель — наночастицы (модуль 3); плазмида как переносимый материал (модуль 2)
Трансдукция и множественность заражения (MOI)	1, 4	Доза вектора в расчёте на клетку; численные значения MOI для разных векторов напрямую не сопоставимы, так как зависят от способа определения титра
Проточная цитометрия	1, 4	Доля клеток с репортёрной меткой (EGFP/GFP), гейтирование, исключение мёртвых клеток, установка порога по контролю
Культивирование клеток	1, 4	Асептика, подсчёт клеток, оценка жизнеспособности; основы изложены в главе 4 модуля 1
Редактирование генома	1, 2	Направляющие РНК CRISPR/Cas9 (модуль 2) и способы доставки редактирующих систем с помощью AAV (глава 3 модуля 1)
Контроли и повторности	1–4	Интактные и «mock»-контроли (модуль 1), необработанные Т-клетки UTD (модуль 4), параллельные образцы

Если практикум проводится как единый курс, логично двигаться от конструкции к доставке и применению: модуль 2 (создание плазмидной конструкции), модуль 1 (вирусная доставка и основы работы с клетками), модуль 4 (клеточная терапия) и модуль 3 (невирусные носители). Порядок изучения остаётся на усмотрение преподавателя.

ОБЩАЯ ЧАСТЬ. ПРАВИЛА РАБОТЫ В ЛАБОРАТОРИИ И БИОБЕЗОПАСНОСТЬ

Нормативная основа

Работа с генно-инженерными организмами и биологическими агентами регулируется законодательством. В Российской Федерации основой служат Федеральный закон от 05.07.1996 № 86-ФЗ «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности» и санитарные правила по профилактике инфекционных болезней, в том числе по безопасности работы с микроорганизмами (СанПиН 3.3686-21); зарубежным ориентиром служат рекомендации «Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories» (BMBL). Преподавателю следует до начала практикума уточнить действующую редакцию документов и требования своей организации к допуску студентов к работе с генно-модифицированными организмами, вирусными векторами и материалом человеческого происхождения.

Оценка рисков по модулям

Уровень необходимых мер определяется используемыми материалами. Ниже перечислены основные факторы риска каждого модуля; подробные указания приведены в соответствующих протоколах.

Модуль	Основные факторы риска	Основные меры
1. AAV и клетки HEK293	Рекомбинантные вирусные векторы; клеточная линия человеческого происхождения (уровень BSL-2)	Работа в боксе II класса защиты, двойные перчатки, обеззараживание гипохлоритом натрия, автоклавирование отходов (глава 5 модуля 1)
2. Плазмидные конструкции	Рекомбинантные штаммы E. coli (генно-модифицированные организмы); красители и реактивы для работы с ДНК, термические и электрические приборы	Стерильная работа, обеззараживание культур и посуды автоклавированием, использование перчаток при работе с красителями ДНК
3. Наночастицы	Токсичные реактивы: ацетонитрил (используется в качестве десольватирующего агента), глутаровый альдегид (сшивающий агент); краситель родамин Б	Работа в вытяжном шкафу, защита кожи и глаз, сбор растворителей и растворов альдегида в отдельные ёмкости для химических отходов
4. CAR-T терапия	Клетки человека (мононуклеары периферической крови, линия NALM6), генетически модифицированные Т-клетки; красители и антитела	Меры уровня BSL-2, работа в боксе II класса защиты, обеззараживание всех материалов, контактировавших с клетками

Основные правила работы

1. Допуск к работе — только после прохождения инструктажа по технике безопасности и биобезопасности с записью в журнале.
2. Обязательные средства индивидуальной защиты: лабораторный халат с длинными рукавами и закрытой передней частью, перчатки, защитные очки либо экран, закрытая обувь; длинные волосы убирают. Запрещены хранение и употребление пищи, курение, ношение контактных линз и нанесение косметики в лаборатории.
3. Все манипуляции с живыми клетками, вирусными векторами и другим потенциально опасным биологическими материалами выполняют в ламинарном боксе II класса защиты; работы с летучими токсичными веществами — в вытяжном шкафу. Пипетирование ртом не допускается; применяют автоматические дозаторы и наконечники с аэрозольными фильтрами.
4. Для предотвращения образования аэрозолей жидкость пипетируют медленно, не выдувают последние капли, не встряхивают пробирки с вектором, центрифугируют в закрывающихся стаканах или в роторе с герметичной крышкой; перед центрифугированием пробирки балансируют.
5. Использование острых предметов (иглы, скальпели) сводят к минимуму; применяют контейнеры для острых отходов; иглы не надевают повторно в колпачки.
6. Ёмкости с биологическим материалом и реактивами маркируют (содержимое, дата, ответственный). Образцы хранят в закрытых контейнерах, транспортируют во вторичной ёмкости.
7. Рабочее место перед началом и после окончания работы обрабатывают дезинфицирующим раствором. По окончании работы снимают перчатки и халат, моют руки; из лаборатории ничего не выносят.
8. Сосуды Дьюара с жидким азотом, баллоны с CO_2, центрифуги, автоклавы и УФ-лампы используют только после инструктажа; УФ-лампы не включают при присутствии людей в помещении.
9. Беременным сотрудницам, лицам с иммунодефицитом и другим группам повышенного риска перед допуском к работе с вирусными векторами и клетками человека следует проконсультироваться с врачом и ответственным за биобезопасность.
10. Для студентов и стажеров работа в одиночку с любыми биологическими материалами запрещена без письменного разрешения руководителя программы или присутствия старшего коллеги.

Дезинфекция и утилизация отходов

Биологические отходы обеззараживают до удаления из лаборатории в соответствии с регламентом организации. Поверхности и инструменты, контактировавшие с бактериями и оболочечными вирусами, обрабатывают 70% этанолом; безоболочечные вирусы (в том числе AAV) устойчивы ко многим дезинфектантам, и для их обеззараживания используют растворы гипохлорита натрия (не менее 0,5–1% активного хлора, экспозиция не менее 30 мин) либо автоклавирование. Жидкие отходы собирают в ёмкость с дезинфектантом и выдерживают не менее 30 мин перед сливом; твёрдые отходы (наконечники, планшеты, перчатки) помещают в пакеты для биологических отходов и автоклавируют. Культуры E. coli и посуду, контактировавшую с ними, автоклавируют при 121 °C не менее 30 мин.

Химические отходы (органические растворители, растворы глутарового альдегида, красители) в канализацию не сливают: их собирают в отдельные маркированные ёмкости и передают на утилизацию.

Аварийные ситуации

При проливе биологического материала: оповестить находящихся рядом, при необходимости покинуть помещение на 30 мин для оседания аэрозоля, надеть дополнительные средства защиты, накрыть пролив впитывающей салфеткой, залить дезинфектантом, выдержать не менее 30 мин, собрать и утилизировать как биологические отходы. При проливе токсичных реактивов — проветрить помещение, засыпать пролив сорбентом, собрать и передать в химические отходы. При попадании материала или реактивов на кожу — промыть водой с мылом в течение 15 мин; на слизистые оболочки и в глаза — промывать водой не менее 15 мин; при уколе или порезе — выдавить кровь, обработать рану и обратиться к врачу. Обо всех инцидентах немедленно сообщают преподавателю и ответственному за биобезопасность и фиксируют их в журнале.

Планирование эксперимента и обработка данных

Достоверный результат требует соблюдения нескольких ключевых принципов:

- Каждый эксперимент включает контроли, позволяющие отделить изучаемый эффект от фона: необработанные (интактные) образцы, образцы с носителем без действующего вещества, а там, где это возможно, положительные контроли.
- Каждое условие ставят не менее чем в двух параллелях; при анализе результатов объединяют данные нескольких групп.
- Параметры съёмки, настройки приборов и порядок измерения задают по контролю и далее не меняют для всех образцов.
- Файлы измерений (изображения, файлы цитометра, электрофореграммы, хроматограммы) сохраняют под однозначными именами и указывают в журнале.
- Результаты, не совпавшие с ожидаемыми, также являются научным результатом; в отчёте обсуждают возможные причины и ограничения эксперимента.

Лабораторный журнал и отчёт

Лабораторный журнал ведут в день выполнения работы. В нём фиксируют: дату и цель работы; использованные материалы (производитель, номер партии, концентрация, срок годности); расчёты; ход работы с указанием времени ключевых операций; отклонения от протокола; наблюдения; названия файлов с данными. Исправления вносят зачёркиванием, не стирая исходной записи.

Отчёт оформляется каждой группой по следующей схеме:

1. Титульный лист (название работы, исполнители, дата, преподаватель).
2. Цель и задачи работы.
3. Краткое теоретическое введение с обоснованием выбора объектов и условий эксперимента.
4. Материалы и методы: использованные реактивы, препараты и клетки, схема эксперимента, расчёты; все отклонения от протокола.
5. Результаты: таблицы, рисунки и графики с подписями, единицами измерения и указанием числа повторностей.
6. Обсуждение: интерпретация результатов, сопоставление с литературными данными, анализ ограничений и возможных источников ошибок.
7. Выводы (3–5 пунктов).
8. Список литературы, оформленный по ГОСТ.

Нормативные документы

1. Федеральный закон от 05.07.1996 № 86-ФЗ «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности» (в действующей редакции).
2. СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» (утв. постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 28.01.2021 № 4).
3. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 6th ed. Washington, DC: U.S. Department of Health and Human Services, CDC, NIH, 2020.

МОДУЛЬ 1. ТРАНСДУКЦИЯ КЛЕТОК HEK293 АДЕНОАССОЦИИРОВАННЫМИ ВИРУСАМИ

Введение, цель и задачи модуля

Настоящий модуль пособия предназначен для студентов старших курсов и магистрантов биологических, биотехнологических и медицинских специальностей, изучающих основы генной терапии и методы работы с культурами клеток животных. Он объединяет теоретический курс (главы 1–4) и подробное практическое задание (главы 5–7): трансдукцию адгезионных клеток линии HEK293 рекомбинантными аденоассоциированными вирусными векторами (pAAV) серотипов AAV9, AAV8 и AAV6 при множественности заражения (MOI) 10 000, 50 000 и 100 000 вирусных геномов на клетку. Модуль открывает пособие: введённые в нём понятия — вектор, трансдукция, MOI, контроли эксперимента, проточная цитометрия — используются и в других модулях.

Аденоассоциированные вирусы (AAV) занимают центральное место в современной генной терапии: на их основе созданы лекарственные препараты, одобренные регуляторными органами США и Европейского союза, а число клинических исследований pAAV-векторов исчисляется сотнями [18, 38]. Одновременно pAAV остаются одним из основных инструментов экспериментальной биологии для доставки генов, редактирующих систем и регуляторных элементов в клетки и ткани животных [32]. Для эффективного применения этих векторов исследователю необходимо понимать, чем различаются серотипы, как вирусная частица проникает в клетку и почему в культуре клеток для достижения измеримой экспрессии требуются очень высокие дозы вектора. Именно этим вопросам посвящён настоящий модуль.

Цель и задачи

Цель практикума — освоить методику трансдукции адгезионных клеток HEK293 рекомбинантными AAV и экспериментально сравнить эффективность трансдукции серотипами AAV9, AAV8 и AAV6 в зависимости от дозы вектора (MOI).

Для достижения цели необходимо решить следующие **задачи**:

1. Изучить строение, жизненный цикл и механизмы клеточного проникновения AAV, а также особенности тропизма исследуемых серотипов.
2. Освоить базовые приёмы работы с культурой адгезионных клеток: асептику, пассирование, подсчёт клеток, оценку жизнеспособности.
3. Научиться рассчитывать объёмы вектора для заданного MOI по титру препарата, выраженному в вирусных геномах на миллилитр (vg/мл).
4. Провести трансдукцию клеток HEK293 по схеме «3 серотипа × 3 значения MOI» с необходимыми контролями.
5. Оценить долю трансдуцированных клеток и интенсивность экспрессии трансгена методами флуоресцентной микроскопии и проточной цитометрии.
6. Проанализировать зависимость «доза — эффект» для каждого серотипа, сопоставить результаты с литературными данными и оформить отчёт.

Планируемые результаты обучения

После выполнения практикума студент должен:

- **знать:** структуру капсида и генома AAV; функции белков Rep и Cap; основные стадии трансдукции; рецепторы и тропизм серотипов AAV9, AAV8, AAV6; области применения AAV в науке и клинике; требования к организации культуральной лаборатории и правила биобезопасности;
- **уметь:** готовить полную питательную среду; пассировать и подсчитывать клетки в камере Горяева; рассчитывать дозу вектора по MOI; работать в ламинарном шкафу II класса защиты; интерпретировать данные микроскопии и цитометрии;
- **владеть:** навыками планирования эксперимента с контролями и повторностями, статистической обработки данных и оформления научного отчёта.

Организация занятий

Практикум рассчитан на пять занятий в течение одной рабочей недели. Студенты работают в группах по 4–6 человек; каждая группа использует один 24-луночный планшет.

Занятие	День эксперимента	Содержание	Время, ч
1	—	Теоретический семинар, инструктаж по биобезопасности, расчёты	2
2	День 0	Пассирование и подсчёт клеток, посев в планшеты	2
3	День 1	Приготовление рабочих разведений вектора, трансдукция	2
4	День 3 (48 ч)	Микроскопия, оценка морфологии и флуоресценции	1,5
5	День 4 (72 ч)	Снятие клеток, проточная цитометрия, анализ данных	3

Принятые допущения

В описанной ниже схеме приняты следующие допущения, которые преподаватель может изменить в зависимости от имеющихся реагентов.

- Все три препарата pAAV несут одну и ту же кассету экспрессии с репортёрным геном EGFP под контролем промотора цитомегаловируса (CMV); это позволяет сравнивать серотипы по единому показателю.
- Титры препаратов определены в вирусных геномах на миллилитр (vg/мл) методом количественной или цифровой капельной ПЦР по последовательностям ITR или трансгена [5]; препараты очищены и не содержат помощника (аденовируса).
- Работы выполняются в условиях уровня биологической безопасности BSL-2 с соблюдением общих правил работы и безопасности (общая часть пособия).
- Принятые сокращения: vg (vector genomes) — вирусные геномы; MOI (multiplicity of infection) — множественность заражения, выраженная в vg на клетку; ITR (inverted terminal repeat) — инвертированный концевой повтор.

Перед началом

Не заглядывая дальше в методичку, попытайтесь ответить на следующие вопросы:

1. К какому семейству и роду относится AAV? Почему для его размножения необходим вирус-помощник?
2. Из каких белков состоит капсид AAV и как устроен его геном?
3. Что такое серотип? Чем различаются AAV9, AAV8 и AAV6 по происхождению и тропизму?
4. Какие стадии проходит вирусная частица от поверхности клетки до экспрессии трансгена?
5. Что такое трансдукция и чем она отличается от трансфекции?
6. Что такое множественность заражения (MOI) и в каких единицах её выражают для AAV?
7. Почему для трансдукции культивируемых клеток используют MOI порядка 10^4–10^5 вирусных геномов на клетку?
8. Какие препараты на основе AAV применяются в клинике и при каких заболеваниях?
9. Какие условия необходимы для культивирования адгезионных клеток и чем их пассирование отличается от пассирования суспензионных?
10. Чем линия HEK293 удобна для работы с AAV и получения рекомбинантных векторов?

Словарь терминов и сокращений

Основные термины

Аденоассоциированный вирус — безоболочечный репликативно-дефектный вирус семейства *Parvoviridae*.

Вектор — носитель, предназначенный для переноса генетического материала в клетки.

Конфлюэнтность — доля поверхности субстрата, покрытая клеточным монослоем.

Капсид — белковая оболочка вирусной частицы.

Множественность заражения (MOI) — отношение числа вирусных частиц к числу клеток-мишеней.

Пассаж — перенос клеток из одного сосуда в другой со свежей средой.

Псевдотипирование — встраивание белков одного серотипа в капсид другого серотипа.

Серотип — вариант вируса, различающийся антигенными свойствами капсида.

Тропизм — способность вируса заражать определённые типы клеток и тканей.

Трансдукция — перенос генетического материала в клетку вирусным вектором с последующей экспрессией.

Трансген — ген, вводимый в клетку с помощью вектора.

Эписомальная ДНК — внехромосомная молекула, способная сохраняться в ядре клетки.

Сокращения

AAV — аденоассоциированный вирус (adeno-associated virus)

pAAV — рекомбинантный аденоассоциированный вирус

AAVR — рецептор AAV (KIAA0319L)

CMV — цитомегаловирус (промотор)

DMEM — среда Игла в модификации Дюльбекко

DPBS — фосфатно-солевой буфер Дюльбекко

EGFP — усиленный зелёный флуоресцентный белок

FBS — эмбриональная бычья сыворотка

HEK293 — клетки эмбриональной почки человека, линия 293

ITR — инвертированный концевой повтор

MFI — средняя интенсивность флуоресценции

MOI — множественность заражения (vg на клетку)

PKD — домен, гомологичный белку поликистоза почек

TU — трансдуцирующая единица

vg — вирусный геном (vector genome)

кПЦР / цПЦР — количественная / цифровая капельная полимеразная цепная реакция

Теоретическая часть

Глава 1. Биология аденоассоциированного вируса

1.1. Открытие и систематическое положение

Аденоассоциированные вирусы (AAV) были обнаружены в середине 1960-х годов как контаминант препаратов аденовируса, полученных из клеток обезьян: мелкие вирусные частицы не способны размножаться самостоятельно и нуждаются в присутствии вируса-помощника, что и отразилось в названии [7]. По современной классификации AAV относятся к семейству *Parvoviridae*, подсемейству *Parvovirinae*, роду *Dependoparvovirus*. Представители рода — безоболочечные вирусы с одноцепочечным ДНК-геномом, для эффективной репликации которых необходима коинфекция аденовирусом, вирусом простого герпеса либо иным вирусом-помощником [21]. У человека AAV не вызывают известных заболеваний, что, наряду с низкой иммуногенностью и способностью заражать как делящиеся, так и неделящиеся клетки, объясняет интерес к ним как к векторам для доставки генов [25, 38].

Серопозитивность населения к AAV высока: антитела к вирусам разных серотипов обнаруживаются у значительной части людей, причём распространённость нейтрализующих антител зависит от серотипа, возраста и региона проживания [39]. Этот факт имеет принципиальное значение для клинического применения векторов (см. главу 3).

1.2. Строение вириона

Вирион AAV представляет собой безоболочечную частицу диаметром около 22–26 нм с икосаэдрической симметрией (число триангуляции T = 1). Капсид построен из 60 белковых субъединиц трёх типов — VP1, VP2 и VP3 с молекулярными массами примерно 87, 73 и 62 кДа соответственно; в частице они присутствуют в соотношении около 1 : 1 : 10 [7, 38]. Белки VP1, VP2 и VP3 перекрываются по последовательности: VP3 составляет общую C-концевую часть, VP2 содержит дополнительный N-концевой фрагмент, а VP1 — ещё более протяжённый N-конец. Уникальная N-концевая область VP1 несёт домен фосфолипазы A2 (PLA2) и сигналы ядерной локализации; она скрыта внутри интактного капсида и экспонируется лишь в ходе эндоцитоза, при закислении эндосом, что необходимо для выхода вируса в цитоплазму [27, 42].

Поверхность капсида образована вариабельными петлями белка VP3, формирующими характерные структурные элементы: пики вокруг трёхкратных осей симметрии, углубление вокруг пятикратной оси (канал, через который, как предполагается, происходит упаковка и выход геномной ДНК) и «впадины» между ними. Именно аминокислотные остатки вариабельных петель определяют связывание с клеточными гликанами и белками-рецепторами, нейтрализацию антителами и, следовательно, различия между серотипами [38, 40].

В полный капсид упаковывается одна молекула однонитевой ДНК — как плюс-, так и минус-цепи с равной вероятностью. Помимо полных частиц, в препаратах всегда присутствуют пустые капсиды и частицы с фрагментированными геномами; их доля — один из важнейших показателей качества препарата, определяющий дозу «действующего вещества» и иммунный ответ [16, 38].

1.3. Организация генома

Геном AAV2, наиболее полно охарактеризованного представителя, состоит из 4 679 нуклеотидов [35]. Он содержит две открытые рамки считывания — *rep* и *cap* — фланкированных на концах ITR длиной по 145 нуклеотидов. Каждый ITR формирует T-образную шпильку; 3'-конец шпильки служит праймером для синтеза комплементарной цепи, а сама структура — сайтом связывания белков Rep и точкой начала репликации. ITR — единственный *cis*-элемент вируса, необходимый и достаточный для репликации и упаковки генома, поэтому именно они сохраняются в составе рекомбинантных векторов [7, 32].

Открытая рамка *rep* транскрибируется с двух промоторов, p5 и p19, и кодирует четыре неструктурных белка: Rep78 и Rep68 (с p5) и Rep52 и Rep40 (с p19). Большие белки Rep78/68 обладают ДНК-связывающей, хеликазной и сайт-специфической эндонуклеазной активностью и необходимы для репликации генома; малые белки Rep52/40 — хеликазы, участвующие в упаковке геномной ДНК в предобразованные капсиды [7, 21]. Рамка *cap* находится под контролем промотора p40 и кодирует белки VP1, VP2 и VP3: VP1 синтезируется с мРНК, подвергшейся альтернативному сплайсингу, а VP2 и VP3 — с одной и той же мРНК, причём трансляция VP2 начинается с неканонического кодона ACG. Внутри рамки *cap* находится дополнительная рамка, кодирующая ассемблин (AAP), который необходим для сборки капсида ряда серотипов в ядрышке [34]; позднее был описан также белок MAAP, роль которого связывают с выходом вирионов из клетки.

Ёмкость AAV ограничена: в капсид помещается около 4,7 кб ДНК, что с учётом ITR и регуляторных элементов оставляет под трансген не более 4,4–4,5 кб. Это ограничивает набор доставляемых генов и систем редактирования генома; для крупных кодирующих последовательностей применяют их разделение на два вектора [32, 38].

1.4. Жизненный цикл

Жизненный цикл AAV включает два альтернативных пути в зависимости от присутствия вируса-помощника.

Латентная фаза. В отсутствие вируса-помощника геном AAV после проникновения в ядро остаётся в клетке в латентном состоянии: транскрипция *rep* подавлена, а вирусная ДНК либо сохраняется в виде эписомы, либо с помощью Rep-белков встраивается в определённый локус хромосомы 19 человека (AAVS1, 19q13.42). Встраивание в геном — отличительная черта дикого типа; рекомбинантные векторы, лишённые гена *rep*, в основном существуют внехромосомно в виде кольцевых и линейных конкатемеров, а доля интегрировавшихся геномов остаётся низкой [32, 38].

Продуктивная фаза. При коинфекции аденовирусом (или вирусом простого герпеса) вирус-помощник обеспечивает ключевые функции: белки аденовируса E1A, E1B55K, E2A, E4orf6 и РНК VA активируют транскрипцию генов AAV, создают в клетке условия для репликации ДНК и облегчают сборку вирионов. Репликация происходит по механизму «катящегося кольца» со смещением цепи с участием Rep78/68 и клеточных ДНК-полимераз; сборка капсидов идёт в ядре (в ядрышке), а упаковка геномов — за счёт хеликазной активности Rep52/40 [21, 34]. Выход вирионов сопровождается лизисом клетки, вызванным аденовирусом.

Эти представления лежат в основе получения рекомбинантных векторов: гены *rep* и *cap* вводят в клетки-продуценты (обычно HEK293) отдельной плазмидой, функции вируса-помощника — третьей плазмидой, а трансген, фланкированный ITR, — четвёртой, после чего в клетках собираются векторные частицы без способности к самостоятельной репликации [16].

1.5. Серотипы и варианты

Серотип AAV определяется антигенными свойствами капсида: два вируса считаются разными серотипами, если антисыворотка к одному из них не нейтрализует другой. К настоящему времени описано более десятка природных серотипов (AAV1–AAV13) и сотни вариантов капсида, выделенных из тканей человека и приматов [13, 14]. Серотипы AAV1 и AAV6 близки по структуре: капсиды различаются по небольшому числу аминокислотных остатков, а AAV6 рассматривают как природный гибрид AAV1 и AAV2 [40]. Серотип AAV8 был выделен из тканей макаки-резус [13], а AAV9 — из тканей человека [14].

Практическое значение серотипов определяется тем, что капсид задаёт **тропизм** вектора — спектр клеток и тканей, которые он эффективно трансдуцирует. При этом геном вектора можно упаковать в капсид другого серотипа: метод «перекрёстной упаковки» (псевдотипирования) позволил использовать один и тот же геном с ITR серотипа 2 в капсидах разных серотипов и получить векторы с различным тропизмом [30, 40]. Сегодня к природным капсидам добавились варианты, созданные направленной эволюцией, рациональным дизайном и скринингом на основе баркодирования [32, 38]. В практикуме

сравниваются три природных серотипа, широко применяемых в доклинической и клинической практике, механизмы действия которых подробно рассмотрены в главе 2.

Глава 2. Механизмы трансдукции AAV

2.1. Основные понятия

Трансдукцией называют перенос генетического материала в клетку с помощью вирусного вектора и последующую экспрессию переносимого гена. В отличие от инфекции дикого вируса, трансдукция pAAV не сопровождается репликацией вектора: геном вектора не содержит генов *rep* и *cap*, поэтому дочерние вирионы в клетке не образуются [32, 38].

Дозу вектора выражают несколькими способами. **Титр по геномам** (vg/мл) — число вирусных геномов в единице объёма препарата, определяемое методами количественной или цифровой капельной ПЦР [5]. **Инфекционный титр** (трансдуцирующие единицы, TU/мл) — число частиц, способных вызвать экспрессию трансгена в клетках-мишенях; он всегда существенно ниже титра по геномам, так как значительная часть частиц не завершает путь от поверхности клетки до экспрессии. **Множественностью заражения (MOI)** называют отношение числа вирусных частиц (в случае pAAV — вирусных геномов) к числу клеток-мишеней в момент добавления вектора:

$$MOI = (V_{vec} \times T) / N$$

где V_{vec} — объём вектора, мл; T — титр препарата, vg/мл; N — число клеток в лунке. В практикуме MOI всегда выражается в vg на клетку.

2.2. Этапы трансдукции

Путь частицы pAAV от среды до экспрессии трансгена включает последовательные стадии, каждая из которых может лимитировать эффективность [19, 27, 42]:

1. Адсорбция на поверхности клетки (связывание с гликанами).
2. Связывание с белковым рецептором и коррецепторами.
3. Эндоцитоз.
4. Внутриклеточный транспорт в эндосомах и выход в цитозоль.
5. Транспорт к ядру и проникновение в ядро.
6. Освобождение (раздевание) генома из капсида.
7. Превращение однонитевой ДНК в двунитевую и транскрипция трансгена.

2.2.1. Связывание с клеточной поверхностью. Первичное прикрепление AAV осуществляется к углеводным компонентам гликопротеинов и протеогликанов на поверхности клетки. Капсид AAV2 связывается с гепарансульфатными протеогликанами [36]; для AAV1 и AAV6 существенную роль играют сиаловые кислоты — N-связанные α2,3- и α2,6-сиаловые кислоты [41]; AAV9 связывается с терминальной галактозой N-связанных гликанов [33]. Для AAV8 однозначно идентифицированного гликанового рецептора не описано; показана связь с рецептором ламинина (LamR) [4]. Отсутствие или избыток нужных гликанов на поверхности конкретной линии клеток — одна из причин различий в эффективности трансдукции разными серотипами.

2.2.2. Белковые рецепторы. Ключевым событием стало открытие в 2016 г. универсального рецептора AAV — трансмембранного белка AAVR (KIAA0319L), необходимого для трансдукции большинством изученных серотипов, включая AAV1, AAV2, AAV5, AAV6, AAV8 и AAV9 [28]. Эктодомен AAVR содержит несколько PKD-доменов (polycystic kidney disease), с которыми взаимодействуют разные серотипы: AAV2 преимущественно связывается с PKD2, а AAV5 — с PKD1 [29]. AAVR локализуется в основном в аппарате Гольджи и циркулирует между плазматической мембраной, эндосомами и сетью транс-Гольджи, что согласуется с важностью транспорта вируса по этому пути. Другой фактор — трансмембранный белок GPR108, необходимый большинству серотипов (за исключением AAV5) на стадии внутриклеточного транспорта [42]. Обнаружение этих факторов объяснило, почему клетки, лишённые одного гена, становятся устойчивыми к AAV, и позволило подбирать линии-хозяева и конструировать капсиды с изменённым тропизмом.

2.2.3. Эндоцитоз. После связывания частицы поглощаются клеткой путём эндоцитоза. Для AAV2 показана зависимость от клатрин-опосредованного эндоцитоза [6], но результаты ряда работ указывают на участие и клатрин-независимых путей (CLIC/GEEC), зависящих от рецептора и серотипа [27]. Серотипы могут использовать несколько путей одновременно, а выбор пути зависит от типа клетки, поэтому в разных клеточных линиях эффективность трансдукции одним и тем же серотипом может различаться на порядки.

2.2.4. Внутриклеточный транспорт и выход из эндосом. Частицы транспортируются по эндосомально-лизосомальному пути вдоль микротрубочек к околоядерной области, где часть из них попадает в сеть транс-Гольджи. По мере снижения pH эндосомального содержимого капсид претерпевает конформационные изменения, в результате которых N-концевая область VP1 (содержащая домен PLA2 и сигналы ядерной локализации) выходит на поверхность частицы и обеспечивает выход вириона из эндосомы в цитоплазму [27, 42]. Значительная часть частиц не покидает эндосомы и деградирует в лизосомах или протеасомах; ингибиторы протеасомы повышают трансдукцию, что указывает на роль убиквитинирования капсида в ограничении эффективности [27].

2.2.5. Проникновение в ядро и раздевание. Достигнув околоядерной зоны, частицы AAV проникают в ядро, вероятно, через ядерные поры; значительная часть вирионов накапливается в ядрышке [27, 34]. Вопрос о том, где именно происходит освобождение ДНК из капсида — в цитоплазме или уже в ядре, — остаётся предметом исследований; существенным считается участие факторов ядра и деградации капсида в протеасоме.

2.2.6. Синтез второй цепи. Геном вектора представляет собой одноцепочечную ДНК, для транскрипции которой необходима конверсия в двухцепочечную форму. Синтез второй цепи с участием клеточных ДНК-полимераз — скорость-лимитирующая стадия трансдукции, чем объясняется задержка экспрессии трансгена (от нескольких суток in vitro до нескольких недель in vivo) [11]. Эту стадию обходят самокомплементарные векторы (scAAV), в геноме которых находятся две комплементарные копии трансгена, способные сразу образовывать двунитевую молекулу после раздевания; такие векторы обеспечивают более быструю и сильную экспрессию, но ограничены ёмкостью около 2,2 кб [20].

2.2.7. Судьба генома вектора. Двухцепочечные геномы вектора в ядре замыкаются в кольцевые эписомы и образуют высокомолекулярные конкатемеры, транскрипционно активные и стабильные в неделящихся клетках (нейроны, миоциты, гепатоциты) [32, 38]. В

делящихся клетках вектор не реплицируется синхронно с хромосомами, и его содержание на клетку уменьшается при каждом делении. Поэтому в культуре быстро делящихся клеток, таких как HEK293, экспрессия трансгена носит преимущественно транзиторный характер.

2.3. Тропизм серотипов AAV9, AAV8 и AAV6

Ниже суммированы основные свойства трёх серотипов, используемых в практикуме. Данные о тропизме относятся преимущественно к экспериментам in vivo; для культур клеток эффективность трансдукции зависит от линии и может иметь иную иерархию серотипов [10, 43].

Параметр	AAV9	AAV8	AAV6
Происхождение	Ткани человека [14]	Ткани макаки-резус [13]	Природный гибрид AAV1/AAV2, близок к AAV1 [40]
Первичные гликаны / рецепторы	Терминальная галактоза N-гликанов [33]; AAVR [28]	LamR [4]; AAVR [28]	N-связанные α2,3- и α2,6-сиаловые кислоты, гепарансульфат [41]; AAVR [28]
Тропизм in vivo при системном введении	Сердце, скелетные мышцы, печень, ЦНС (пересекает гематоэнцефалический барьер) [12, 43]	Печень (высокая трансдукция гепатоцитов), мышцы, сердце [43]	Лёгкие, скелетные мышцы, сердце; широко используется для гемопоэтических и других ex vivo-клеток
Основные области применения	ЦНС и нервно-мышечные заболевания (спинальная мышечная атрофия) [22]	Печёночные и метаболические заболевания, экспериментальные модели	Редактирование генома в первичных клетках, доставка в дыхательные пути и мышцы

2.4. Особенности трансдукции in vitro и выбор MOI

Практический опыт показывает, что в культуре клеток для трансдукции pAAV требуются значительно более высокие дозы, чем можно было бы ожидать, исходя из числа частиц на клетку. Типичные значения MOI составляют от 10^3 до 10^6 vg/клетку и зависят от серотипа, линии клеток и показателя, по которому оценивается эффект [10]. Причины высоких значений MOI таковы:

- **Низкая доля инфекционных частиц.** Из множества частиц, определяемых по геномам, лишь малая доля проходит все стадии до экспрессии трансгена; отношение числа частиц к числу трансдуцирующих единиц может достигать 10^2–10^4 и более [16, 32].
- **Различия в рецепторах и гликанах.** Линия клеток может не экспрессировать необходимых гликанов или нужных факторов транспорта; как следствие, различия между серотипами в культуре клеток часто не совпадают с результатами in vivo [10, 43].
- **Ограниченная доступность вектора.** Вероятность контакта вирусной частицы с клеткой зависит от объёма инокулята: чем меньше объём среды над клетками при одном и том же числе vg, тем выше эффективная концентрация вектора на единицу поверхности.

- **Состояние клеток.** Эффективность зависит от фазы роста и плотности монослоя, от наличия сыворотки (возможна нейтрализация и неспецифическая адсорбция) и от посевной плотности.
- **Особенности линии HEK293.** Эти клетки содержат интегрированные гены E1A и E1B аденовируса 5 серотипа [15, 37]. Белки E1 могут влиять на транскрипцию трансгена (например, активировать промотор CMV) и на метаболизм ДНК, поэтому уровень экспрессии в HEK293 нередко оказывается выше, чем в клетках без E1.

Множественность заражения 10 000, 50 000 и 100 000 vg/клетку, выбранная для практикума, охватывает диапазон, в котором для большинства серотипов можно наблюдать зависимость «доза — эффект», и позволяет различить серотипы по эффективности. Дозу в 50 000 vg/клетку удобно рассматривать как среднюю точку шкалы: она в пять раз выше нижнего и вдвое ниже верхнего значения.

2.5. Рабочие гипотезы практикума

Перед началом эксперимента группам предлагается сформулировать собственные гипотезы. Ориентиры:

1. С ростом MOI доля EGFP-положительных клеток и интенсивность флуоресценции возрастают для всех серотипов, но не обязательно линейно: возможно выход на плато при высоких дозах.
2. Из-за особенностей рецепторов и гликанов серотипы будут различаться по эффективности трансдукции HEK293; иерархию серотипов предстоит установить экспериментально, а ожидаемые литературные данные следует сопоставить с полученными [10, 43]. По литературным данным, в культивируемых клетках серотип AAV6 нередко трансдуцирует клетки эффективнее других серотипов, поэтому рабочей гипотезой может служить предположение, что AAV6 трансдуцирует HEK293 не хуже, а вероятно эффективнее, чем AAV8 и AAV9; любой результат эксперимента — в том числе отрицательный — является научным результатом и подлежит обсуждению в отчёте [10].
3. Высокие дозы вектора могут снижать жизнеспособность клеток; это необходимо проверить подсчётом клеток и окрашиванием трипановым синим.

Глава 3. Применение AAV в исследованиях и клинике

3.1. Получение и контроль качества рекомбинантных векторов

Рекомбинантные векторы создают на основе минимального вирусного каркаса: из генома удаляют гены *rep* и *cap*, а между двумя ITR помещают кассету экспрессии — промотор, трансген, сигнал полиаденилирования и, при необходимости, регуляторные элементы. Функции *rep* и *cap* и вспомогательные функции аденовируса предоставляют *в trans* отдельными плазмидами [16, 32].

Наиболее распространённая схема получения основана на **трёхплазмидной ко-трансфекции клеток HEK293**: плазмида с трансгеном между ITR; плазмида, кодирующая Rep и Cap выбранного серотипа; плазмида-помощник с генами аденовируса (E2A, E4orf6, VA РНК). Клетки HEK293 удобны тем, что уже экспрессируют E1A и E1B, необходимые

для сборки вектора [16, 37]. Через 48–72 часа клетки и среду собирают, вектор очищают центрифугированием в градиенте плотности иодиксанола или хроматографией (аффинной, ионообменной), концентрируют и переводят в буфер для хранения (фосфатно-солевой буфер с добавкой поверхностно-активного вещества, например плюроника F-68) [16].

Контроль качества включает:

- определение титра по геномам методом кПЦР или цПЦР с праймерами к ITR либо к трансгену [5];
- оценку доли полных и пустых капсидов (электронная микроскопия, аналитическое ультрацентрифугирование, иммуносорбция);
- анализ белкового состава капсида (электрофорез VP1/VP2/VP3);
- проверку на стерильность, эндотоксин, микоплазму и отсутствие репликативно-компетентных вирусов, а также остаточной ДНК клеток-продуцентов и плазмид.

Хранят очищенные препараты при −80 °C, избегая многократных циклов замораживания и оттаивания, и используют пробирки с низкой адсорбцией, поскольку частицы AAV склонны к прилипанию к пластику.

3.2. Применение в научных исследованиях

В экспериментальной биологии pAAV используют в нескольких основных направлениях [32, 38]:

- **Экспрессия генов in vivo.** Локальное или системное введение вектора позволяет получить устойчивую экспрессию трансгена в нейронах, астроцитах, кардиомиоцитах, миоцитах, гепатоцитах, фоторецепторах и других клетках животных. Выбор серотипа и промотора определяет, в каких клетках будет экспрессироваться трансген.
- **Моделирование заболеваний и функциональный анализ.** С помощью AAV вводят мутантные формы генов, shRNA и миРНК, репортёры и биосенсоры, что позволяет изучать функции генов во взрослом организме, минуя создание трансгенных линий.
- **Оптогенетика и хемогенетика.** Векторы доставляют каналродопсины, DREADD и другие молекулярные инструменты в определённые популяции клеток мозга, обеспечивая контроль активности нейронов.
- **Редактирование генома.** AAV применяют для доставки компактных нуклеаз Cas, направляющих РНК и донорных матриц; серотип AAV6 широко используется для доставки донорных матриц в первичные гемопоэтические клетки при гомологичной репарации.
- **Исследования in vitro.** Векторы используют для трансдукции первичных клеток, органоидов и культур, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, в тех случаях, когда трансфекция плазмидами неэффективна или токсична.
- **Разработка капсидов.** Направленная эволюция и скрининг баркодированных библиотек вариантов капсида позволяют находить векторы с повышенной тканевой специфичностью [38].

3.3. Клиническое применение

Первая генно-терапевтическая разработка на основе AAV, получившая разрешение в Европейском союзе, — препарат Глайбера (алипоген типарвовек, капсид AAV1) для лечения дефицита липопротеинлипазы (2012 г.); он был отозван с рынка в 2017 г. по коммерческим причинам. В последующие годы одобрены препараты, охватывающие различные наследственные заболевания [18, 23].

Препарат (международное название)	Капсид	Заболевание	Первое одобрение
Luxturna (воретиген непарвовек)	AAV2	Наследственная дистрофия сетчатки, связанная с мутациями RPE65 [31]	США, 2017
Zolgensma (онасемноген абепарвовек)	AAV9	Спинальная мышечная атрофия [22]	США, 2019
Upstaza (эладокаген эксупарвовек)	AAV2	Дефицит декарбоксилазы ароматических L-аминокислот	ЕС, 2022
Roctavian (валоктоген роксапарвовек)	AAV5	Гемофилия А	ЕС, 2022
Hemgenix (этранаког дезапарвовек)	AAV5	Гемофилия В	США, 2022
Elevidys (деландистроген моксепарвовек)	AAVrh74	Мышечная дистрофия Дюшенна	США, 2023
Beqvez (фиданаког элапарвовек)	Инженерный капсид	Гемофилия В	США, 2024

Перечень быстро расширяется: к моменту использования пособия следует проверить сведения в актуальных реестрах регуляторных органов (FDA, EMA, Минздрав России) и в обзорах, посвящённых клиническим исследованиям [18, 23].

Показательно, что Zolgensma — препарат на основе капсида AAV9, одного из серотипов практикума — вводится однократно внутривенно в дозе порядка 10^{14} vg на килограмм массы тела [22]. Это иллюстрирует масштаб доз, требуемых для терапевтического эффекта in vivo, и объясняет, почему в культуре клеток даже при очень высоких MOI измеряемый эффект зависит от серотипа и линии.

3.4. Ограничения и проблемы

Несмотря на успехи, технология имеет значимые ограничения [9, 24, 38]:

1. **Иммунные реакции.** Нейтрализующие антитела к капсиду, имеющиеся у значительной части населения, не позволяют применять вектор соответствующего серотипа у таких пациентов; повторное введение того же серотипа затруднено вследствие образования антител после первой дозы. Возможны также клеточный иммунный ответ на капсид и на трансген, повреждение трансдуцированных клеток [24, 39].
2. **Дозозависимая токсичность.** При системном введении высоких доз наблюдались гепатотоксичность, тромботическая микроангиопатия, поражение нейронов спинальных ганглиев, а в ряде исследований — тяжёлые побочные эффекты вплоть до летальных исходов [9, 17].

3. **Ограниченная ёмкость** (около 4,7 кб), затрудняющая доставку крупных генов и систем редактирования.
4. **Утрата экспрессии в делящихся клетках.** Эписомные геномы разбавляются при делении клеток, поэтому применение в быстро обновляющихся тканях и в педиатрии ограничено.
5. **Сложность производства и стоимость.** Получение препарата в клинических количествах требует крупномасштабных систем культивирования и строгого контроля доли пустых капсидов.

Направления решения этих проблем включают создание инженерных капсидов с повышенной тканевой специфичностью и сниженной иммуногенностью, использование иммуносупрессии, удаление антител (плазмаферез, расщепление IgG ферментами), разработку тканеспецифичных промоторов и более компактных систем редактирования [9, 38].

3.5. Значение сравнения серотипов

Выбор серотипа — первый и один из важнейших шагов планирования эксперимента или терапии. AAV9, AAV8 и AAV6 демонстрируют разный набор свойств: AAV9 обладает способностью преодолевать гематоэнцефалический барьер [12], AAV8 эффективно трансдуцирует печень [43] (вектор на основе AAV8 с геном фактора IX обеспечил длительную коррекцию гемофилии B в клинических исследованиях [26]), а AAV6 востребован в работе с первичными клетками. Сравнение их активности в стандартной линии клеток позволяет студентам на практике увидеть, что тропизм определяется взаимодействием капсида с клеточными рецепторами и что результаты, полученные in vitro, необходимо интерпретировать с осторожностью.

Глава 4. Основы культивирования клеток

4.1. Культура клеток: понятие и классификация

Культивирование клеток животных вне организма (*in vitro*) — метод, возникший в начале XX века: в 1907 г. Р. Гаррисон показал возможность длительного поддержания фрагментов нервной ткани лягушки в лимфе, а в 1951 г. из опухоли шейки матки была получена первая постоянная линия человеческих клеток HeLa. Сегодня культуры клеток служат основой исследований в клеточной биологии, вирусологии, фармакологии и биотехнологии [1].

По происхождению различают **первичные культуры**, получаемые непосредственно из тканей и обладающие ограниченным числом делений, и **клеточные линии**. Линии подразделяют на конечные (с ограниченным числом пассажей) и непрерывные, или иммортализованные, способные к неограниченному росту; последние возникают спонтанно, в результате трансформации вирусами (как HEK293) или опухолевого происхождения [1]. По способу роста клетки делят на **адгезионные**, которым для деления необходимо прикрепление к поверхности субстрата, и **суспензионные**, растущие во взвешенном состоянии. HEK293, используемые в практикуме, — адгезионные клетки со слабой адгезией.

4.2. Оборудование и организация рабочего места

Для работы с культурами клеток необходим комплекс оборудования, обеспечивающий стерильность и поддержание оптимальных условий [1]:

- **ламинарный бокс II класса биологической безопасности** с HEPA-фильтрацией, защищающий одновременно и оператора, и культуру, и окружающую среду;
- **CO_2-инкубатор**, поддерживающий температуру 37 °C, содержание CO_2 5% и высокую влажность воздуха;
- **инвертированный микроскоп** с фазовым контрастом (и флуоресцентным каналом для практикума);
- **центрифуга** со скоростью вращения до 1 000 g и закрывающимися ротором или стаканами;
- водяная баня или термостат для подогрева сред, холодильники (+4 °C), низкотемпературные морозильники (−20 и −80 °C), ёмкости с жидким азотом для длительного хранения;
- автоклав и устройства для обеззараживания отходов; дозаторы переменного объёма и автоматические пипетаторы; одноразовый стерильный пластик (флаконы, планшеты, пробирки, наконечники с фильтром).

4.3. Питательные среды и добавки

Среда обеспечивает клетки источниками энергии, аминокислотами, витаминами, неорганическими солями и поддерживает физико-химические условия культивирования. Для HEK293 наиболее часто применяют **среду DMEM** (Dulbecco's Modified Eagle Medium) с высоким содержанием глюкозы (4,5 г/л) [1, 37]. К базовой среде добавляют:

- **эмбриональную бычью сыворотку (FBS)** в концентрации 5–10%, источник факторов роста, гормонов, белков-переносчиков и факторов прикрепления; перед использованием сыворотку прогревают при 56 °C 30 мин (инактивация комплемента), если это требуется протоколом производителя;
- **L-глутамин** (2–4 мМ) или стабильный дипептид (GlutaMAX), поскольку свободный глутамин нестабилен в растворе;
- **антибиотики** — смесь пенициллина (100 ЕД/мл) и стрептомицина (100 мкг/мл) для профилактики бактериальных загрязнений; при высокой степени асептики, а также в ряде экспериментов (например, при трансфекции) от их применения отказываются;
- **заменимые аминокислоты** и пируват натрия — по необходимости.

Кислотность среды поддерживают бикарбонатной буферной системой совместно с 5% CO_2 в инкубаторе (pH 7,2–7,4); при работе вне инкубатора применяют HEPES. Индикатор **феноловый красный** позволяет контролировать pH визуально: при закислении среда желтеет, при защелачивании — приобретает фиолетовый оттенок. Осмоляльность сред составляет примерно 280–320 мОсм/кг. Среду хранят при +4 °C в темноте и перед использованием прогревают до 37 °C.

4.4. Рост клеток и пассирование

При культивировании в закрытом сосуде популяция проходит несколько фаз: **лаг-фазу** (адаптация после посева), **логарифмическую фазу** экспоненциального роста, **стационарную фазу** (клетки заполняют поверхность, рост замедляется) и фазу гибели. Для экспериментов используют клетки в логарифмической фазе, поскольку их метаболическая активность и восприимчивость к вирусу максимальны. Время удвоения HEK293 в стандартных условиях составляет около 24–36 часов [37].

Конфлюэнтностью называют долю поверхности субстрата, покрытую клетками. Пассирование проводят при 70–80% конфлюэнтности, до достижения полного монослоя, так как перерастание культуры приводит к истощению среды, закислению, изменениям фенотипа и отрыву клеток. Для открепления клеток используют раствор **трипсина-ЭДТА**: трипсин расщепляет белки, обеспечивающие адгезию, а ЭДТА связывает ионы Ca^{2+} и Mg^{2+}, необходимые для работы кадгеринов и интегринов. Действие фермента останавливают добавлением среды с сывороткой, содержащей ингибиторы протеаз. HEK293 отделяются очень легко, поэтому применяют мягкие режимы (раствор 0,05% трипсина, 1–3 мин при комнатной температуре или 37 °C) либо вообще смывают клетки током среды [37].

Соотношение разведения при пассировании (1 : 5 — 1 : 10) подбирают так, чтобы клетки достигли 70–80% конфлюэнтности за 2–3 суток. Номер пассажа записывают в журнал; для экспериментов используют клетки с пассажами не выше 20–30 от момента размораживания, поскольку при длительном культивировании линии накапливают генетические и фенотипические изменения [1].

4.5. Подсчёт клеток и оценка жизнеспособности

Концентрацию клеток определяют в **гемоцитометре** — счётной камере с нанесённой сеткой известной площади и глубиной 0,1 мм; в России наиболее распространена камера Горяева. Сетка Горяева содержит 225 больших квадратов, каждый из которых разделён на 16 малых; сторона малого квадрата составляет 0,05 мм, а объём столбика жидкости над ним — $2{,}5\cdot10^{-7}$ мл. Если подсчитано a клеток в 80 малых квадратах (5 больших) и суспензия предварительно разведена в d раз, то концентрация клеток равна:

$$C = (a / 80) \times 4\cdot10^{6} \times d = a \times 5\cdot10^{4} \times d \quad \text{(клеток/мл)}$$

При подсчёте в камере Нейбауэра (глубина 0,1 мм) концентрация равна среднему числу клеток в одном большом квадрате (1 × 1 мм), умноженному на 10^4 и на степень разведения. Для надёжности подсчитывают не менее 100 клеток, а расхождение между повторными подсчётами не должно превышать 10–15%.

Жизнеспособность оценивают окрашиванием **трипановым синим**: краситель проникает через повреждённую мембрану мёртвых клеток и окрашивает их в синий цвет, тогда как живые клетки остаются бесцветными. Суспензию смешивают с 0,4% раствором красителя в соотношении 1 : 1 (d = 2) и подсчитывают живые и мёртвые клетки в течение 3–5 минут после смешивания. Жизнеспособность вычисляют как долю неокрашенных клеток от общего числа; для экспериментов используют культуры с жизнеспособностью не ниже 90–95% [1].

4.6. Асептика и контаминации

Соблюдение асептики — главное условие успешной работы. Основные правила: работать только в рабочей зоне ламинарного бокса; обрабатывать поверхности и руки в перчатках

70% этанолом; не касаться нестерильным предметом внутренней части наконечников и горлышек флаконов; использовать одноразовые стерильные пипетки и наконечники; работать с одной линией клеток одновременно и не использовать общие реагенты для разных линий [1].

Контаминация может быть бактериальной (мутная среда, быстрое закисление), грибковой (нити мицелия, пушистые колонии) и дрожжевой. Особую опасность представляет **микоплазма**: мелкие бактерии без клеточной стенки (0,1–0,6 мкм) не видны под обычным микроскопом и не вызывают помутнения среды, но искажают рост и метаболизм клеток и могут влиять на эффективность трансдукции. Поэтому культуры регулярно проверяют на микоплазму методом ПЦР или с помощью окрашивания ДНК-красителями. При выявлении контаминации культуру утилизируют, а рабочее место и инкубатор обеззараживают. Перекрёстная контаминация линиями других клеток также является распространённой проблемой, и для её исключения проводят проверку подлинности линий методом STR-профилирования [1].

4.7. Криоконсервация

Для длительного хранения клетки замораживают в среде с криопротектором — 5–10% диметилсульфоксида (ДМСО) в сыворотке или в полной среде — при постепенном охлаждении со скоростью около −1 °C/мин (в контейнерах с изопропанолом или программных замораживателях) до −80 °C, после чего переносят в парах жидкого азота (−150…−196 °C). Размораживание проводят быстро, при 37 °C, а ДМСО из суспензии удаляют центрифугированием или разведением ростовой средой в течение первых суток [1].

4.8. Клеточная линия HEK293

Линия **HEK293** (human embryonic kidney 293) была получена в начале 1970-х годов из клеток эмбриона человека, трансформированных фрагментами ДНК аденовируса 5 серотипа [15]. В геном клеток интегрирован левый конец генома аденовируса с генами E1A и E1B, поэтому HEK293 способны выполнять функции вируса-помощника в *trans* и широко используются для получения рекомбинантных аденовирусных, лентивирусных и AAV-векторов, а также для экспрессии рекомбинантных белков [16, 37]. Клетки имеют гипотриплоидный кариотип, эпителиоподобную морфологию и растут слабо прикреплёнными колониями; они легко отделяются от пластика и чувствительны к механическому воздействию, поэтому все манипуляции (смена среды, промывка) проводят осторожно, направляя струю на стенку, а не на монослой. Для улучшения адгезии можно использовать пластик, покрытый поли-L-лизином или коллагеном.

Производные линии включают HEK293T (с геном большого Т-антигена SV40), 293FT и адаптированные к суспензии и безсывороточным средам варианты (например, 293F, 293-FS). В практикуме применяется родительская линия HEK293 (в каталоге ATCC — CRL-1573) в адгезионном формате. Преимуществами её для трансдукции являются высокая скорость роста, простота обращения и хорошая экспрессия трансгенов, а ограничением — слабая адгезия и отличия от нормальных клеток почки по профилю рецепторов, что следует учитывать при экстраполяции результатов на другие клетки [37, 10].

Практическая часть

Глава 5. Особенности биобезопасности при работе с pAAV и клетками HEK293

Общие правила работы в лаборатории, средства индивидуальной защиты, порядок обращения с отходами и действия в аварийных ситуациях изложены в общей части пособия; перед выполнением практических заданий студент обязан ознакомиться с ней. Ниже приведены особенности, связанные с рекомбинантными AAV и клетками HEK293.

5.1. Оценка риска при работе с pAAV и клетками HEK293

Рекомбинантные AAV относятся к векторам с низким риском: вирус не вызывает заболеваний у человека, а векторы лишены генов *rep* и *cap*, а потому не способны к самостоятельной репликации. Тем не менее риск зависит от нескольких факторов: свойств трансгена (токсичность, онкогенность, иммуномодулирующее действие), титра и объёма препарата, наличия в препарате примеси репликативно-компетентных вирусов, а также от возможных путей воздействия (аэрозоль, контакт с кожей и слизистыми, прокол) [8, 32]. Если в клетках присутствует аденовирус, то вирус AAV (дикого типа или примесь репликативно-компетентных частиц в препарате вектора), содержащий гены *rep* и *cap*, может размножаться, поэтому культуры HEK293 перед работой проверяют на отсутствие аденовирусной контаминации.

Клетки HEK293 как линия человеческого происхождения, содержащая аденовирусные гены, также рассматриваются как потенциально опасный материал и обрабатываются с соблюдением мер, принятых при работе с клетками человека (BSL-2) [8]. В практикуме с векторами, несущими репортёр EGFP, принимаются меры уровня BSL-2.

5.2. Дезинфекция и утилизация

AAV — безоболочечный вирус, устойчивый ко многим дезинфектантам, в том числе к 70% этанолу, поэтому для обеззараживания используют **растворы гипохлорита натрия** (конечная концентрация не менее 0,5–1% активного хлора, экспозиция не менее 30 мин) или другие дезинфицирующие средства с подтверждённой вирулицидной активностью в отношении безоболочечных вирусов, а также **автоклавирование** при 121 °C не менее 30–60 мин [8]. Рабочие поверхности ламинарного бокса после работы обрабатывают дезинфектантом, затем 70% этанолом для удаления остатков хлора.

Жидкие отходы, содержащие вектор (среда после трансдукции, промывные растворы), собирают в ёмкость с дезинфектантом и выдерживают не менее 30 мин перед сливом; твёрдые отходы (наконечники, планшеты, перчатки) помещают в пакеты для биологических отходов и автоклавируют перед утилизацией в соответствии с классом опасности отходов.

Глава 6. Практическое задание: трансдукция клеток HEK293 векторами AAV9, AAV8 и AAV6

6.1. Общая схема и дизайн эксперимента

Эксперимент построен по факторной схеме **«3 серотипа × 3 значения MOI»**: AAV9, AAV8 и AAV6 при 10 000, 50 000 и 100 000 vg/клетку. Каждое из девяти условий ставится в двух повторностях (дубликатах). Кроме того, для интерпретации результатов необходимы два контроля: **интактные клетки** (без добавок; определяют уровень автофлуоресценции и

порог положительных клеток) и **клетки с буфером для разведения вектора** («mock»; позволяют исключить влияние самого буфера). Всего на группу приходится один 24-луночный планшет (24 лунки).

Ряд	1	2	3	4	5	6
A	AAV9, 10 000	AAV9, 10 000	AAV9, 50 000	AAV9, 50 000	AAV9, 100 000	AAV9, 100 000
B	AAV8, 10 000	AAV8, 10 000	AAV8, 50 000	AAV8, 50 000	AAV8, 100 000	AAV8, 100 000
C	AAV6, 10 000	AAV6, 10 000	AAV6, 50 000	AAV6, 50 000	AAV6, 100 000	AAV6, 100 000
D	Интактные	Интактные	Лунка для подсчёта клеток (интактные)	Mock	Mock	Mock

Схема планшета. Числа — MOI в vg/клетку. Лунка D3 в день трансдукции используется для подсчёта клеток и в дальнейшем анализе не участвует.

Хронология эксперимента:

День	Время от трансдукции	Операция
0	−24 ч	Пассирование клеток, подсчёт, посев в планшет
1	0 ч	Подсчёт клеток в лунке D3, приготовление разведений вектора, трансдукция
2	+24 ч	Смена среды, осмотр и съёмка в проходящем свете и в канале EGFP
3	+48 ч	Флуоресцентная микроскопия
4	+72 ч	Снятие клеток, проточная цитометрия, подсчёт клеток

6.2. Оборудование, материалы и реактивы

На одну группу необходимы:

- **Клетки:** флакон T25 с клетками HEK293 в логарифмической фазе роста (конфлюэнтность 70–80%, жизнеспособность не ниже 95%, без признаков контаминации).
- **Векторы:** pAAV9-CMV-EGFP, pAAV8-CMV-EGFP, pAAV6-CMV-EGFP (по 10 мкл аликвоты на группу; титры указывают на пробирках и в протоколе препарата).
- **Среды и растворы:** DMEM (4,5 г/л глюкозы) с GlutaMAX; эмбриональная бычья сыворотка; раствор пенициллина-стрептомицина (100×); фосфатно-солевой буфер Дюльбекко без Ca^{2+}/Mg^{2+} (DPBS); 0,05% раствор трипсина-ЭДТА; 10% раствор плюроника F-68; 0,4% раствор трипанового синего; иодид пропидия (1 мг/мл); 70% этанол; раствор гипохлорита натрия для обеззараживания.
- **Пластик и расходные материалы:** 24-луночный планшет для адгезионных культур; стерильные серологические пипетки (5, 10 мл); пробирки на 15 мл; пробирки типа «эппендорф» с низкой адсорбцией белка и ДНК (1,5 мл); наконечники с аэрозольным фильтром на 10, 20, 200 и 1000 мкл; пробирки для проточного цитометра (или 1,5 мл); маркер.
- **Оборудование:** ламинарный бокс II класса; CO_2-инкубатор (37 °C, 5% CO_2); инвертированный микроскоп с фазовым контрастом и каналом для EGFP (возбуждение 470–490 нм, эмиссия 510–530 нм); камера Горяева; центрифуга для

пробирок; дозаторы на 2, 10, 20, 200 и 1000 мкл; проточный цитометр с лазером 488 нм; холодильная камера, лёд.

6.3. Приготовление растворов

Полная питательная среда (100 мл): 89 мл DMEM, 10 мл FBS (10%), 1 мл раствора пенициллина-стрептомицина (100×). Хранят при +4 °C до двух недель; перед работой прогревают до 37 °C на водяной бане.

Буфер для разведения вектора (DPBS с 0,001% плюроника F-68): 100 мкл 10% плюроника добавляют к 9,9 мл DPBS — получают 0,1% раствор; из него 100 мкл переносят в 9,9 мл DPBS (0,001%). Буфер фильтруют (0,22 мкм) и охлаждают на льду. Добавка плюроника снижает адсорбцию частиц на пластике при высоких разведениях.

Среда для анализа методом проточной цитометрии: DPBS с 2% FBS; иодид пропидия добавляют перед измерением до 1 мкг/мл.

6.4. Расчёты

Число клеток на лунку в момент трансдукции (N). При посеве $5 \cdot 10^4$ клеток на лунку (1,9 см²) через 24 часа ожидается около $1 \cdot 10^5$ клеток на лунку (конфлюэнтность 30–40%). Точное значение N определяют подсчётом клеток в лунке D3 в день трансдукции; при расчётах используют полученное значение. Ниже в качестве примера принято $N = 1 \cdot 10^5$ клеток. Если фактическое значение N отличается от плановой величины более чем на 25%, объёмы вектора пересчитывают для фактического N.

Объём вектора для заданного MOI. Объём рабочего разведения вектора (мкл) вычисляется по формуле:

$$V_{vec} = (MOI \times N) / T_w \times 1000$$

где MOI выражена в vg/клетку, N — число клеток в лунке, T_w — титр рабочего разведения (vg/мл), множитель 1000 переводит миллилитры в микролитры.

Рабочее разведение. Для работы исходный препарат разводят в буфере с плюроником так, чтобы титр рабочего разведения (T_w) был удобен для пипетирования. Объём исходного препарата для приготовления рабочего разведения:

$$V_{stock} = (T_w \times V_{prep}) / T$$

где T — титр исходного препарата (vg/мл), V_{prep} — объём готового рабочего разведения.

Пример. Пусть титр исходного препарата $T = 1 \cdot 10^{13}$ vg/мл, $N = 1 \cdot 10^5$ клеток. Выбираем $T_w = 5 \cdot 10^{11}$ vg/мл (разведение 1 : 20) и готовим V_{prep} = 100 мкл: $V_{stock} = 5 \cdot 10^{11} \times 0{,}1$ мл / $1 \cdot 10^{13}$ = 5 мкл вектора + 95 мкл буфера. Тогда:

MOI, vg/клетку	Число vg на лунку	Вектор (раб. разведение), мкл на лунку	Буфер, мкл на лунку	Всего добавляется, мкл
10 000	$1 \cdot 10^9$	2	18	20
50 000	$5 \cdot 10^9$	10	10	20
100 000	$1 \cdot 10^{10}$	20	0	20

Во все лунки вносится одинаковый объём (20 мкл), что исключает влияние объёма добавки на результат. Для каждого условия готовят пробирку-премикс на две лунки с 25% запасом (по 50 мкл): для MOI 10 000 — 5 мкл рабочего разведения и 45 мкл буфера; для MOI 50 000 — 25 мкл и 25 мкл; для MOI 100 000 — 50 мкл рабочего разведения. На один серотип расходуется 80 мкл рабочего разведения (запас 20 мкл). Если титр препарата отличается от примера, группа пересчитывает значения и проверяет расчёты у преподавателя **до** начала работы с вектором.

Пример перерасчёта. Если в контрольной лунке D3 получено $N = 1{,}4 \cdot 10^5$ клеток, то для MOI 50 000 необходимо $50\,000 \times 1{,}4 \cdot 10^5 = 7 \cdot 10^9$ vg на лунку, то есть 14 мкл рабочего разведения ($T_w = 5 \cdot 10^{11}$ vg/мл) и 6 мкл буфера до общего объёма 20 мкл. В отчёте необходимо привести фактические расчёты с указанием использованных значений титров и N.

6.5. Протокол

Задание 1 (День 0). Посев клеток

1. Приготовьте полную питательную среду, прогрейте среду, DPBS и трипсин-ЭДТА до 37 °C. Обработайте рабочую зону ламинарного бокса 70% этанолом.
2. Осмотрите флакон под микроскопом: оцените конфлюэнтность, морфологию, отсутствие признаков контаминации; запишите номер пассажа.
3. Удалите среду, промойте монослой 2 мл DPBS, добавьте 0,5 мл раствора трипсина-ЭДТА, равномерно распределите по поверхности и инкубируйте 1–2 минуты при 37 °C. Отделение клеток контролируйте под микроскопом; слегка постучите по стенке флакона.
4. Добавьте 4,5 мл полной среды, аккуратно ресуспендируйте клетки пипеткой (5–8 раз), избегая образования пены, и перенесите суспензию в пробирку на 15 мл.
5. Отберите 20 мкл суспензии, смешайте с 20 мкл 0,4% трипанового синего (d = 2), внесите в камеру Горяева и подсчитайте клетки в пяти больших квадратах (80 малых). Рассчитайте концентрацию $C = a \times 5 \cdot 10^4 \times d$ (клеток/мл), долю живых клеток и общее число клеток. Жизнеспособность должна быть не ниже 95%.
6. Приготовьте суспензию для посева с концентрацией $1 \cdot 10^5$ клеток/мл: на 24 лунки и запас необходимо 13,5 мл, т. е. $1{,}35 \cdot 10^6$ клеток. Объём исходной суспензии $V_1 = 1{,}35 \cdot 10^6 / C$ (мл); недостающий объём до 13,5 мл составьте полной средой.
7. Тщательно перемешайте суспензию, внесите по 500 мкл ($5 \cdot 10^4$ клеток) в каждую лунку, периодически перемешивая суспензию в пробирке. Равномерно распределите клетки, покачивая планшет вперёд-назад и вправо-влево (без вращательных движений).
8. Подпишите планшет (группа, дата, пассаж, схема), поместите в инкубатор.

Задание 2 (День 1). Трансдукция

1. Через 20–24 ч осмотрите клетки под микроскопом: они должны быть равномерно распределены, конфлюэнтность 30–40%, клетки прикреплены и имеют типичную морфологию.

2. Определите N: из лунки D3 отберите среду, промойте DPBS, добавьте 100 мкл трипсина-ЭДТА, инкубируйте 1–2 мин, затем добавьте 400 мкл полной среды, ресуспендируйте и подсчитайте клетки в камере Горяева. N = C × 0,5 мл. Запишите значение и при необходимости пересчитайте объёмы по формуле раздела 6.4.
3. Подготовьте рабочее место в соответствии с правилами общей части пособия и главы 5: двойные перчатки, закрытый халат, очки; поставьте на лёд буфер для разведения; подготовьте ёмкость с дезинфектантом для наконечников.
4. Достаньте аликвоты векторов из морозильника −80 °C, разморозьте на льду, **кратковременно** центрифугируйте (несколько секунд) и не используйте встряхивание. Пометьте серотип, титр и номер партии.
5. Приготовьте рабочие разведения (для каждого серотипа в отдельной пробирке): 5 мкл вектора + 95 мкл охлаждённого буфера; перемешайте 8–10 раз аккуратным пипетированием, заменяйте наконечник для каждого серотипа.
6. Для каждого серотипа приготовьте три пробирки-премикса (MOI 10 000, 50 000, 100 000) по схеме 6.4: пипетируйте буфер, затем рабочее разведение вектора, смешайте.
7. В лунки соответствующих условий внесите по 20 мкл премикса, капельно, на поверхность среды, не касаясь монослоя. В лунки Mock внесите по 20 мкл буфера. Интактные лунки оставьте без изменений. Меняйте наконечник после каждой пробирки.
8. Аккуратно покачайте планшет крест-накрест, не допуская разбрызгивания, и верните его в инкубатор. Запишите время трансдукции (t = 0).
9. Все наконечники, пробирки и перчатки, контактировавшие с вектором, обеззаразьте согласно разделу 5.2. Рабочую поверхность обработайте дезинфектантом, затем этанолом.

Вариант протокола с увеличенным объёмом инокулята. Если преподаватель использует протокол с более высоким контактом вектора с клетками, из лунок удаляют среду и вносят по 250 мкл рабочей смеси вектора в полной среде (смесь готовят на 2,5 лунки с запасом 25%, MOI рассчитывают так же, как в разделе 6.4). Через 6 ч (не позднее 8 ч) в каждую лунку, включая контроли, не удаляя среду, добавляют по 250 мкл подогретой полной среды (итоговый объём 500 мкл), вектор остаётся в лунках; смену среды в задании 3 при этом не проводят, а ограничиваются осмотром.

Задание 3 (День 2, +24 ч). Смена среды

Осмотрите клетки под микроскопом (морфология, плотность, цвет среды) в проходящем свете и в канале EGFP: при высоких MOI первые флуоресцирующие клетки могут появиться уже через 12–24 ч. Сфотографируйте по одному типичному полю в каждой лунке. Аккуратно удалите среду из каждой лунки (отбирая со стороны стенки), добавьте по 500 мкл свежей полной среды. Среду со следами вектора собирайте в ёмкость с дезинфектантом.

Задание 4 (День 3, +48 ч). Флуоресцентная микроскопия

1. Осмотрите клетки в проходящем свете (фазовый контраст): отметьте морфологию, плотность, признаки токсичности (округление, отслоение, обломки клеток).
2. Используя интактные лунки, подберите время экспозиции и усиление так, чтобы автофлуоресценция была минимальной, и далее **не меняйте** параметры для всех остальных лунок.
3. Для каждой лунки сделайте снимки пяти непересекающихся полей зрения (центр и четыре области на расстоянии около половины радиуса от центра) в фазовом контрасте и в канале EGFP при увеличении ×10 (при необходимости ×20).
4. Оцените долю флуоресцирующих клеток визуально по шкале: «−» (нет сигнала), «+» (до 10%), «++» (10–30%), «+++» (30–60%), «++++» (более 60% клеток) и интенсивность свечения. Результаты занесите в таблицу.
5. Для количественной оценки по изображениям используйте программу ImageJ/Fiji: переведите изображение в 8-битный формат, задайте порог интенсивности по интактному контролю и подсчитайте EGFP-положительные клетки (команда Analyze Particles); общее число клеток определите по изображению в фазовом контрасте. Долю положительных клеток вычислите как отношение числа EGFP-положительных клеток к общему числу клеток в поле и усредните по полям.
6. Если к 48 ч среда стала жёлтой, а клетки приближаются к конфлюэнтности, осторожно замените половину объёма среды (250 мкл) на свежую полную среду одинаково во всех лунках и зафиксируйте это в журнале.

Задание 5 (День 4, +72 ч). Проточная цитометрия

1. Осмотрите клетки, сделайте контрольные снимки. Если конфлюэнтность превышает 90%, отметьте это в протоколе.
2. Удалите среду, промойте лунки 0,5 мл DPBS, добавьте по 100 мкл 0,05% трипсина-ЭДТА, инкубируйте 1–2 мин, добавьте по 400 мкл полной среды и осторожно ресуспендируйте до одиночных клеток. Для подсчёта общего числа клеток в лунке отберите 20 мкл суспензии в камеру Горяева (с трипановым синим).
3. Перенесите суспензию в пробирки, центрифугируйте при 300 g в течение 5 минут. Осторожно удалите надосадочную жидкость, не касаясь осадка; ресуспендируйте клетки в 300 мкл DPBS с 2% FBS. Храните пробирки на льду в темноте.
4. Непосредственно перед измерением добавьте иодид пропидия (1 мкг/мл) для исключения мёртвых клеток. Если цитометр с пропидием недоступен, клетки фиксируют 2% раствором параформальдегида (15 мин при комнатной температуре; работа в вытяжном шкафу или боксе, в перчатках) и промывают DPBS.
5. Сначала измерьте интактные клетки: настройте напряжения детекторов и определите границу положительной популяции EGFP так, чтобы в интактном контроле было не более 0,5% положительных событий. Затем измерьте пробирки Mock и опытные образцы с теми же настройками. Регистрируйте не менее 10 000 событий в области одиночных живых клеток.

6. Стратегия гейтирования: (1) FSC-A/SSC-A — исключение обломков; (2) FSC-A/FSC-H — выбор одиночных клеток; (3) пропидий-отрицательные (живые) клетки; (4) EGFP-положительные клетки по границе, установленной по интактному контролю.
7. Для каждого образца запишите: долю EGFP-положительных клеток (%), среднюю (геометрическую) интенсивность флуоресценции в популяции EGFP-положительных клеток (MFI), долю живых клеток.
8. По окончании работы обеззаразьте все отходы и поверхности, как описано в главе 5 и в общей части пособия; результаты экспортируйте в таблицу.

Глава 7. Оценка результатов и оформление отчёта

7.1. Обработка данных

Первичные данные заносят в протокол по формам, приведённым в разделе 7.5. Для каждой лунки вычисляют следующие показатели:

- **Доля EGFP-положительных клеток (%)** — основной показатель эффективности трансдукции.
- **Средняя интенсивность флуоресценции (MFI)** в популяции EGFP-положительных клеток — показатель уровня экспрессии на клетку.
- **Интегральный показатель экспрессии** — произведение доли EGFP-положительных клеток (в долях единицы) на MFI; отражает суммарную экспрессию в популяции.
- **Относительное число клеток (%)** — число клеток в лунке к среднему числу клеток в лунках Mock; снижение показателя при высоких MOI свидетельствует о токсичности или замедлении роста.

Для повторностей рассчитывают среднее значение и стандартное отклонение. Поскольку на группу приходится лишь два повтора каждого условия, для оценки воспроизводимости и статистической обработки объединяют результаты всех групп, рассматривая эксперимент каждой группы как независимый (n равно числу групп). Для сравнения серотипов и доз применяют двухфакторный дисперсионный анализ (факторы — «серотип» и «MOI») с последующим апостериорным тестом (Тьюки) при уровне значимости $p < 0{,}05$; при малом числе независимых экспериментов результаты интерпретируют описательно, без выводов о статистической значимости.

Графики строят в координатах «lg MOI — доля EGFP-положительных клеток» и «lg MOI — MFI» с отдельной линией для каждого серотипа; для столбчатых диаграмм указывают среднее и стандартное отклонение, а на рисунке отмечают число независимых экспериментов.

7.2. Интерпретация результатов

При анализе результатов рекомендуется ответить на вопросы:

1. Как меняется доля EGFP-положительных клеток с ростом MOI для каждого серотипа? Наблюдается ли насыщение (плато) при высоких дозах?

2. Какой серотип обеспечивает наиболее эффективную трансдукцию HEK293 при каждом MOI? Совпадает ли найденная иерархия с данными литературы [10, 43] и с тропизмом, наблюдаемым in vivo?
3. Как меняется интенсивность свечения (MFI) отдельных клеток? В каких случаях увеличение MOI повышает долю положительных клеток, а в каких — уровень экспрессии в уже трансдуцированных клетках?
4. Есть ли признаки токсичности (снижение числа клеток, морфологические изменения) при высоких MOI?
5. Как результаты согласуются с представлениями о рецепторах и гликанах (глава 2)? Какие стадии трансдукции могут лимитировать эффективность для каждого серотипа?

Необходимо учитывать ограничения эксперимента: единственная клеточная линия, одна кассета экспрессии, небольшое число повторностей; различия между препаратами по доле полных капсидов и точности определения титра (вариабельность методов определения титра между лабораториями может быть значительной [5, 16]); ранний момент измерения (72 ч), когда экспрессия некоторых серотипов может ещё нарастать, и влияние аденовирусных белков E1 на промотор CMV [37]. Поэтому выводы следует формулировать осторожно, как наблюдения в данных условиях.

7.3. Возможные проблемы и их устранение

Наблюдение	Возможные причины	Действие
Сигнал EGFP отсутствует во всех лунках	Неверно рассчитаны объёмы; вектор потерял активность (многократное замораживание, хранение при неверной температуре); неверно подобраны фильтры; измерение слишком рано	Проверить расчёты и условия хранения; проверить фильтры по положительному контролю; повторить измерение через 24 ч
Сигнал есть только при MOI 100 000	Низкая эффективность серотипа в данной линии клеток	Это допустимый результат; зафиксировать как наблюдение и обсудить в отчёте
Высокая автофлуоресценция в интактных лунках	Мёртвые клетки и обломки, слишком высокая экспозиция, феноловый красный в среде	Исключить мёртвые клетки, снизить усиление, промыть клетки DPBS перед анализом
Клетки отрываются от пластика	Слишком агрессивное пипетирование, слишком долгое воздействие трипсина, пересев при высокой плотности	Уменьшить силу потока, использовать покрытие поли-L-лизином, сократить время трипсинизации
Неравномерное распределение клеток по лунке (скопление в центре)	Круговые движения при покачивании планшета, неравномерная температура	Покачивать планшет крест-накрест, выдерживать планшет 15–20 мин при комнатной температуре перед помещением в инкубатор
Сильные различия между дублями	Погрешности пипетирования малых объёмов; неоднородный посев	Использовать дозаторы малого объёма, тщательно перемешивать суспензию, промывать наконечники

Наблюдение	Возможные причины	Действие
Чрезмерная конфлюэнтность к 72 ч	Слишком высокая плотность посева; быстрый рост	Анализировать на 48 ч или уменьшить плотность посева в последующих экспериментах
Помутнение среды, жёлтый цвет	Бактериальная контаминация	Утилизировать планшет, обработать оборудование, пересмотреть асептику

7.4. Требования к отчёту

Отчёт оформляется каждой группой и должен содержать:

1. Титульный лист (название работы, исполнители, дата, преподаватель).
2. Цель и задачи работы.
3. Краткое теоретическое введение (1–2 страницы) с обоснованием выбора серотипов и значений MOI.
4. Материалы и методы: использованные препараты (серотип, партия, титр), клетки (пассаж), схема планшета, расчёты объёмов; указать все отклонения от протокола.
5. Результаты: таблицы показателей, микрофотографии (с одинаковыми параметрами съёмки), гистограммы цитометрии (интактный контроль и опыт), графики зависимости от MOI.
6. Обсуждение: интерпретация результатов по вопросам раздела 7.2, анализ ограничений эксперимента и возможных источников ошибок.
7. Выводы (3–5 пунктов).
8. Список литературы, оформленный по ГОСТ.

Общие требования к ведению журнала и оформлению отчётов изложены в общей части пособия.

7.5. Формы протокола эксперимента

Форма 1. Подсчёт клеток при посеве (День 0) и в день трансдукции (День 1)

Показатель	День 0	День 1
Номер пассажа клеток		
Число клеток в 5 больших квадратах (a), живые / окрашенные		
Разведение (d)		
Концентрация C = a × 5·10⁴ × d, клеток/мл		
Жизнеспособность, %		
Число клеток на лунку (N)		

Форма 2. Данные о векторах

Серотип	Номер партии	Титр, vg/мл	Рабочее разведение, vg/мл	Дата и время трансдукции
AAV9				

Серотип	Номер партии	Титр, vg/мл	Рабочее разведение, vg/мл	Дата и время трансдукции
AAV8				
AAV6				

Форма 3. Результаты (72 ч)

Лунка	Условие	EGFP+, %	MFI	Живые клетки, %	Число клеток в лунке
A1–A2	AAV9, 10 000				
A3–A4	AAV9, 50 000				
A5–A6	AAV9, 100 000				
B1–B2	AAV8, 10 000				
B3–B4	AAV8, 50 000				
B5–B6	AAV8, 100 000				
C1–C2	AAV6, 10 000				
C3–C4	AAV6, 50 000				
C5–C6	AAV6, 100 000				
D1–D2	Интактные				
D4–D6	Mock				

Форма 4. Результаты микроскопии и количественной оценки по изображениям (24 / 48 / 72 ч)

Серотип	MOI, vg/клетку	Срок, ч	Доля EGFP+, % (среднее ± SD)	Интенсивность EGFP (усл. ед.)	Морфология и токсичность
AAV9	$1\cdot10^4$	24 / 48 / 72			
AAV9	$5\cdot10^4$	24 / 48 / 72			
AAV9	$1\cdot10^5$	24 / 48 / 72			
AAV8	$1\cdot10^4$	24 / 48 / 72			
AAV8	$5\cdot10^4$	24 / 48 / 72			
AAV8	$1\cdot10^5$	24 / 48 / 72			
AAV6	$1\cdot10^4$	24 / 48 / 72			
AAV6	$5\cdot10^4$	24 / 48 / 72			
AAV6	$1\cdot10^5$	24 / 48 / 72			

Вопросы для самоконтроля

Вопросы по теоретической части

1. К какому семейству и роду относятся AAV? Чем определяется «дефектность» вируса?
2. Опишите строение капсида AAV: сколько субъединиц, какие белки, в каком соотношении?
3. Из каких элементов состоит геном AAV? Какова функция ITR, Rep и Cap?
4. Чем отличаются латентный и продуктивный пути жизненного цикла? Какие вирусы-помощники известны?
5. Какие компоненты необходимы для получения рекомбинантного AAV методом трёхплазмидной трансфекции?
6. Какие стадии включает путь частицы AAV от поверхности клетки до экспрессии трансгена?
7. Что такое AAVR? Какие серотипы зависят от него?
8. Какие гликаны являются первичными рецепторами AAV9 и AAV6?
9. Почему синтез второй цепи — скорость-лимитирующая стадия трансдукции? Как её обходят?
10. Почему экспрессия трансгена в делящихся клетках носит преимущественно транзиторный характер?
11. Дайте определения: vg, TU, MOI. Чем титр по геномам отличается от инфекционного титра?
12. Почему в культуре клеток для трансдукции требуются MOI порядка 10^4–10^5?
13. Назовите препараты на основе AAV, одобренные для клинического применения, и заболевания, для лечения которых они предназначены.
14. Какие основные ограничения имеет применение AAV в клинике?

Вопросы по культивированию клеток

15. Чем адгезионные клетки отличаются от суспензионных?
16. Каков состав питательной среды для HEK293? Зачем нужны сыворотка и CO_2?
17. Для чего необходимы феноловый красный, трипсин и ЭДТА?
18. В какой фазе роста следует использовать клетки для трансдукции? Почему?
19. Как подсчитать концентрацию клеток в камере Горяева? Как определяют жизнеспособность?
20. Чем опасна контаминация микоплазмой? Как её выявляют?
21. Что собой представляет линия HEK293? Почему она широко применяется для получения AAV?

Вопросы по практической части

22. Для чего в эксперименте нужны контроли «интактные клетки» и «Mock»?
23. Зачем во все лунки вносят одинаковый объём добавки?
24. Почему вектор разводят в буфере с плюроником и работают в пробирках с низкой адсорбцией?
25. Как устанавливают порог EGFP-положительных клеток в проточной цитометрии?
26. Какие меры безопасности необходимо соблюдать при работе с pAAV? Как обеззараживают отходы?

Задачи

1. Титр препарата $2 \cdot 10^{13}$ vg/мл, в лунке $1{,}5 \cdot 10^{5}$ клеток. Какой объём исходного препарата необходим для MOI 50 000? Предложите схему разведения для удобного пипетирования.
2. В камере Горяева в пяти больших квадратах подсчитано 120 клеток; суспензия была разведена трипановым синим в 2 раза. Рассчитайте концентрацию клеток (клеток/мл).
3. Для посева 24 лунок необходимо $1{,}35 \cdot 10^{6}$ клеток. Концентрация суспензии равна $1{,}2 \cdot 10^{7}$ клеток/мл. Какой объём суспензии необходим и сколько среды добавить до 13,5 мл?
4. Подсчитайте суммарное число вирусных геномов, внесённых в лунки AAV9 в схеме практикума ($N = 1 \cdot 10^{5}$; дубликаты на каждое MOI).

Ответы: 1) 0,375 мкл (для пипетирования препарат следует предварительно развести, например, 1 : 20 до $1 \cdot 10^{12}$ vg/мл — тогда потребуется 7,5 мкл); 2) $1{,}2 \cdot 10^{7}$ клеток/мл; 3) 0,1125 мл (112,5 мкл), среды 13,39 мл; 4) $(1 \cdot 10^{9} + 5 \cdot 10^{9} + 1 \cdot 10^{10}) \times 2 = 3{,}2 \cdot 10^{10}$ vg.

МОДУЛЬ 2. ПРОТОКОЛ ПОДГОТОВКИ ПЛАЗМИДНОЙ КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ НАПРАВЛЯЮЩИХ РНК ДЛЯ CRISPR/CAS9

Перед началом

Не заглядывая дальше в методичку, попытайтесь ответить на следующие вопросы:

1. Что такое система CRISPR-Cas9?
2. Какие два основных компонента необходимы для работы CRISPR-Cas9?
3. Что такое направляющая РНК (sgRNA) и из каких функциональных доменов она состоит?
4. Что представляет собой PAM-мотив и почему его наличие является обязательным условием для работы Cas9?
5. Что такое экспрессионная плазмида?
6. В чём заключается основное преимущество технологии Golden Gate?
7. Чем ферменты рестрикции типа IIS отличаются от классических рестриктаз?
8. Как образуются «липкие концы» при действии рестриктаз и почему это важно для направленной сборки?
9. Какой метод используется для первичного скрининга рекомбинантных клонов?
10. Какой метод является золотым стандартом для окончательного подтверждения правильности созданной конструкции?

Словарь терминов и сокращений

Cas9 (CRISPR-associated protein 9) — эндонуклеаза бактериального происхождения, катализирующая двуцепочечные разрывы ДНК в составе комплекса CRISPR-Cas9.

sgRNA (single guide RNA, направляющая РНК) — химерная молекула РНК, объединяющая crRNA и tracrRNA, которая направляет Cas9 к комплементарной ДНК-мишени.

PAM (Protospacer Adjacent Motif) — короткий консервативный мотив, расположенный непосредственно рядом с целевой последовательностью в ДНК-мишени. Необходим для узнавания и расщепления Cas9.

SpCas9 — наиболее изученный вариант нуклеазы Cas9, выделенный из бактерии *Streptococcus pyogenes*. Распознаёт PAM-последовательность 5′-NGG-3′.

Экспрессионная плазмида — кольцевая молекула внехромосомной ДНК, используемая для доставки и экспрессии целевого гена в клетке.

Golden Gate клонирование — метод бесшовного клонирования, использующий рестриктазы типа IIS для направленной сборки нескольких фрагментов ДНК без остаточных нуклеотидов в месте вставки.

Рестриктазы типа IIS — эндонуклеазы рестрикции, которые распознают асимметричную последовательность ДНК, но расщепляют её на строго определённом расстоянии вне сайта узнавания.

Компетентные клетки — бактериальные клетки, обработанные химически для приобретения способности к захвату экзогенной ДНК.

Селективный антибиотик — антибиотик, добавляемый в питательную среду для отбора бактерий, несущих плазмиду с соответствующим геном резистентности.

Теоретическая часть

Основы молекулярного механизма системы CRISPR-Cas9 и структура направляющей РНК

Технология направленного редактирования генома CRISPR-Cas9 базируется на адаптированном механизме адаптивного иммунитета прокариот. Высокая специфичность и прецизионность внесения модификаций в генетический материал обеспечиваются согласованным действием двух ключевых компонентов: эндонуклеазы Cas9 и направляющей РНК (sgRNA). Фермент Cas9 выполняет каталитическую функцию, инициируя двуцепочечные разрывы в молекуле ДНК, однако для точного пространственного позиционирования нуклеазного домена на целевом локусе необходима молекула направляющей РНК. Данная химерная РНК структурно дифференцирована на два функциональных домена: вариабельный спейсер длиной двадцать нуклеотидов, который обеспечивает распознавание ДНК-мишени посредством комплементарного связывания, и константную область (trans-activating crRNA), формирующую стебель-петлю для стабильного комплексообразования с апоферментом Cas9. Облигатным условием для реализации каталитической активности эндонуклеазы является присутствие в ДНК-мишени, непосредственно примыкающей к комплементарному участку, специфического мотива PAM (Protospacer Adjacent Motif). При использовании нуклеазы SpCas9 данный мотив строго детерминирован последовательностью нуклеотидов NGG. Отсутствие PAM-мотива полностью блокирует эндонуклеазную активность комплекса, тем самым выполняя функцию критического контрольного механизма, предотвращающего нецелевое расщепление генетического материала.

Плазмидные векторы и промотор U6

Для обеспечения внутриклеточного синтеза целевой направляющей РНК применяются специализированные экспрессионные плазмиды, представляющие собой кольцевые молекулы внехромосомной ДНК, выполняющие функцию векторов для направленной доставки генетического материала. В рамках рассматриваемой методики используется плазмида pRG2 (рис.1), конструктивно предназначенная для эффективной экспрессии sgRNA в системах CRISPR-Cas9. Транскрипционный контроль в данной векторной системе

осуществляется посредством РНК-полимераза III-зависимого промотора U6, часто используемого для транскрипции sgRNA.

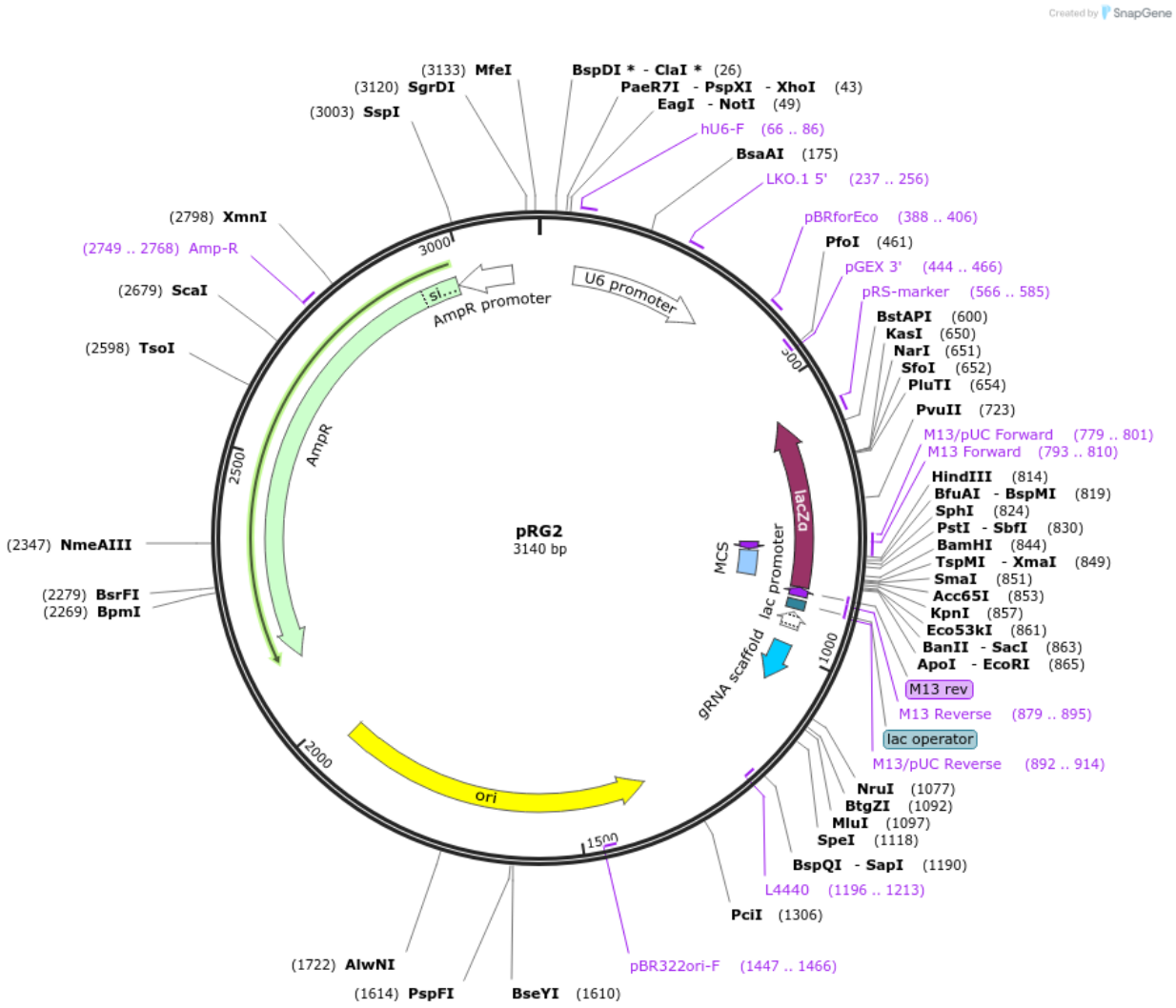


Рисунок 1. Карта плазмиды pRG2 (Addgene #104174).

Ферменты рестрикции и метод бесшовного клонирования

Интеграция нуклеотидной последовательности в кольцевую плазмиду осуществляется посредством технологии бесшовного клонирования Golden Gate. Основным методологическим преимуществом данного подхода является формирование генетической конструкции без сохранения так называемых «шрамов» — избыточных нуклеотидов в сайте вставки. Подобная точность достигается за счет применения эндонуклеаз рестрикции типа IIS, типичным представителем которых является фермент BsaI. В отличие от классических рестриктаз, гидролизующих ДНК непосредственно в пределах сайта узнавания, ферменты типа IIS распознают специфическую асимметричную последовательность ДНК (для BsaI это сайт 5′-GGTCTC-3′), однако осуществляют каталитическое расщепление вне этого сайта на строго фиксированном расстоянии. В частности, BsaI вносит двуцепочечный разрез через один нуклеотид вниз по потоку на верхней цепи и через пять нуклеотидов на нижней цепи от сайта узнавания. Это приводит к генерации выступающих одноцепочечных четырехнуклеотидных «липких концов». Благодаря данной особенности образующихся фрагментов обеспечивается возможность

направленной и строго ориентированной вставки целевых участков ДНК в вектор. После этапа ферментативного лигирования сайты узнавания BsaI безвозвратно удаляются из состава рекомбинантной молекулы, что предотвращает повторный гидролиз вектора и делает реакцию сборки необратимой.

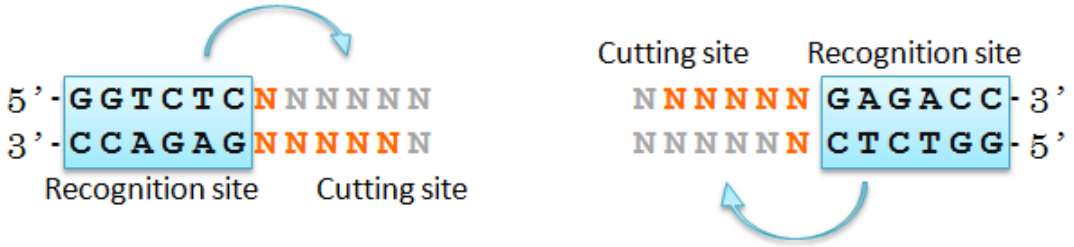


Рисунок 2. Сайты узнавания для BsaI.

Синтез олигонуклеотидов и реакция ферментативного лигирования

Формирование целевого спейсера осуществляется in vitro путем химического синтеза двух комплементарных одноцепочечных молекул ДНК, обозначаемых как прямой и обратный олигонуклеотиды. Для получения функциональной двухцепочечной структуры, способной к интеграции в вектор, применяется процедура термического отжига. Данный физико-химический процесс заключается в первоначальной денатурации смеси олигонуклеотидов при температуре 95°C, что обеспечивает разрушение неспецифических вторичных структур и водородных связей. За этим следует этап строго контролируемого градиентного охлаждения, во время которого происходит высокоспецифичная гибридизация комплементарных цепей с образованием стабильного дуплекса. Окончательная сборка генетической конструкции осуществляется посредством реакции ферментативного лигирования, катализируемой T4 ДНК-лигазой. Данный фермент обеспечивает образование фосфодиэфирных связей между гидроксильной группой на 3'-конце и фосфатной группой на 5'-конце смежных нуклеотидов, ковалентно сшивая сахарофосфатные остовы подготовленного двуцепочечного фрагмента и линеаризованной плазмиды в единую кольцевую рекомбинантную молекулу.

Бактериальная трансформация и селекция рекомбинантных клонов

Для биологической амплификации, сконструированной in vitro рекомбинантной плазмидной ДНК, осуществляется ее наработка в живых бактериальных клетках *Escherichia coli*. Данный процесс называется бактериальная трансформация и требует использования специализированных химически компетентных клеток, например, штамма DH5α. Проникновение экзогенной макромолекулы ДНК сквозь клеточную стенку и плазматическую мембрану инициируется посредством строго контролируемого температурного стресса - теплового шока. Инкубация суспензии компетентных клеток с лигазной смесью на льду сменяется кратковременным нагревом до 42°C в течение 45 секунд, что приводит к транзиторному изменению проницаемости мембранных структур и интернализации вектора. Последующий этап восстановления клеток протекает в жидкой питательной среде LB или SOC в течение одного часа, обеспечивая первичную экспрессию гена антибиотикорезистентности, локализованного в структуре вектора. Изоляция успешно трансформированных клонов от немодифицированной бактериальной популяции достигается путем высева культуры на плотную питательную среду LB-агар, обогащенную

специфическим селективным антибиотиком. Для pRG2 это амоксициллин. Дальнейшая инкубация посевов при температуре 37°C обеспечивает формирование визуально различимых изолированных колоний, каждая из которых представляет собой генетически однородную популяцию клеток, содержащих искомую плазмидную конструкцию.

Выделение и верификация генетической конструкции

Для наработки препаративных количеств генетического материала отобранные изолированные колонии подвергаются культивированию в жидкой питательной среде LB с добавлением специфического антибиотика на протяжении 12–16 часов. Последующая экстракция и очистка плазмидной ДНК от клеточного дебриса, геномной ДНК и ассоциированных белков осуществляется с применением специализированных коммерческих наборов. Данная методология базируется на принципе щелочного лизиса и сорбции нуклеиновых кислот на силикатной мембране, что обеспечивает получение высокоочищенного препарата плазмидной ДНК со средним выходом 50–150 нг/мкл.

Обязательным этапом, завершающим процесс клонирования, является строгая верификация полученной генетической конструкции. Первичный аналитический скрининг рекомбинантных клонов проводится методом полимеразной цепной реакции с использованием специфических олигонуклеотидных праймеров, фланкирующих область вставки sgRNA. Визуализация продуктов амплификации посредством электрофореза в агарозном геле позволяет косвенно подтвердить факт интеграции целевого дуплекса на основании конформационных изменений и размера ПЦР-фрагмента.

Окончательное подтверждение структурной целостности и нуклеотидной идентичности рекомбинантной молекулы достигается исключительно путем секвенирования по методу Сэнгера. Биоинформатическое сопоставление полученной электроферограммы с ожидаемой теоретической последовательностью позволяет надежно верифицировать отсутствие спонтанных точечных мутаций, инсерций или делеций в вариабельной области спейсера, подтверждая полную пригодность созданной плазмиды для последующих экспериментов.

Целью данной работы является создание плазмидной конструкции для экспрессии, направляющей РНК путем встраивания синтетического дуплекса олигонуклеотидов в вектор pRG2 (Addgene #104174). Методика основана на использовании технологии Golden Gate и специфических свойств рестриктаз типа IIS.

1. Основы дизайна направляющей РНК

Эффективность системы CRISPR-Cas9 напрямую зависит от корректного подбора последовательности спейсера.

1. Искомый участок генома должен иметь длину 20 нуклеотидов (N20) и непосредственно примыкать к мотиву PAM (Protospacer Adjacent Motif), который для нуклеазы SpCas9 представлен последовательностью 5'-NGG-3'.
2. В векторе pRG2 экспрессия sgRNA находится под управлением промотора U6. Поскольку РНК-полимераза III наиболее эффективно инициирует синтез с гуанина, в первой позиции целевой последовательности (1-й нуклеотид 20-нуклеотидного спейсера) рекомендуется использовать G.

Подбор последовательностей осуществляется с помощью специализированных алгоритмов (CRISPOR, Benchling, CHOPCHOP). Основными критериями отбора являются высокий индекс предсказанной эффективности и отсутствие гомологичных участков в других локусах генома.

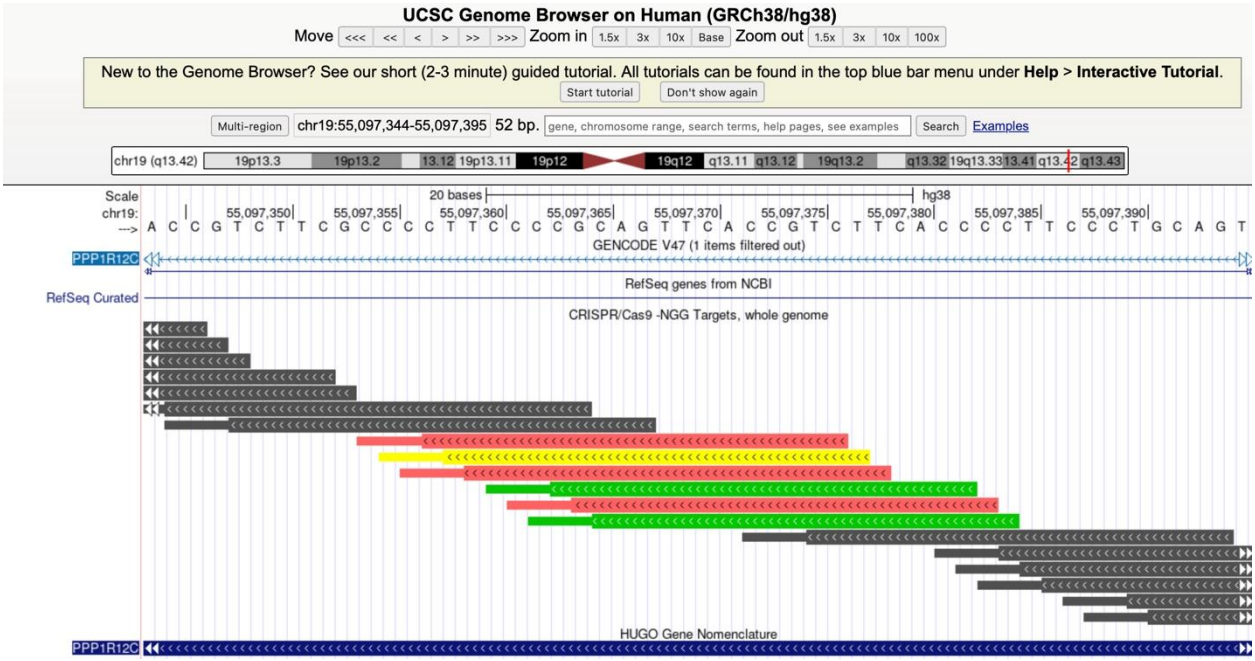


Рисунок 3. Подбор направляющих на сайте https://genome.ucsc.edu

2. Проектирование и подготовка вставки

Для формирования дуплекса ДНК, имитирующего целевую sgRNA, синтезируются два одноцепочечных комплементарных олигонуклеотида с искусственно введенными «липкими» концами.

Дизайн праймеров:

- Forward-олигонуклеотид: 5'-CACC — [N20] - 3'. Если N20 начинается не с G, то первый нуклеотид необходимо заменить на G.
- Reverse-олигонуклеотид: 5'-AAAC — [обратно-комплементарная последовательность N20] - 3'.

Процедура отжига

Для образования стабильного двухцепочечного фрагмента необходимо провести гибридизацию синтезированных цепей.

1. Приготовьте реакционную смесь: по 1 мкл каждого олигонуклеотида (исходная концентрация 100 мкМ) и 23 мкл буфера (например, 10x NEB 2.1 или аналогичный универсальный буфер).
2. Поместите смесь в термоциклер. Режим инкубации: денатурация при +95°C в течение 3 минут, последующее ступенчатое снижение температуры до +25°C.
3. Оптимальная скорость охлаждения составляет от -0.1°C до -2.0°C в секунду. Медленное снижение температуры критически важно для корректного связывания комплементарных цепей и минимизации образования вторичных структур.

3. Реакция направленного лигирования

Вектор pRG2 содержит сайты узнавания рестриктазы BsaI, расположенные в противоположных ориентациях. Это позволяет проводить вырезание промежуточного фрагмента и встраивание подготовленного дуплекса в одну стадию (или последовательно).

Компоненты реакционной смеси:

- Деионизированная вода (свободная от нуклеаз) — 5.5 мкл;
- Буфер для T4 ДНК-лигазы (10x) — 2.0 мкл;
- T4 ДНК-лигаза — 1.0 мкл;
- Плазмидный вектор pRG2 (предварительно гидролизованный BsaI) — 0.2 мкл;
- Продукт отжига олигонуклеотидов — 1.0 мкл.

Инкубация проводится при комнатной температуре (+22...+25°C) в течение 60 минут. При необходимости повышения выхода целевого продукта допускается инкубация при +16°C в течение ночи.

4. Трансформация компетентных клеток E. coli

Для амплификации (размножения) полученной генетической конструкции используются штаммы кишечной палочки (например, DH5α).

1. К 50 мкл суспензии химически компетентных клеток добавьте 2–5 мкл лигазной смеси. Инкубируйте на льду 30 минут.
2. Проведите тепловой шок: поместите пробирки в термостат или водяную баню при температуре +42°C на 30–45 секунд. Сразу после этого перенесите образцы на лед на 2 минуты.
3. Добавьте 500 мкл жидкой среды SOC или LB без антибиотика. Инкубируйте в шейкере-термостате (200–250 об/мин) при +37°C в течение 60 минут для восстановления клеток и экспрессии гена резистентности.
4. Произведите высев суспензии на плотную среду LB-агар, содержащую селективный антибиотик (согласно маркеру вектора pRG2). Инкубируйте чашки Петри в термостате при +37°C в течение 12–16 часов.

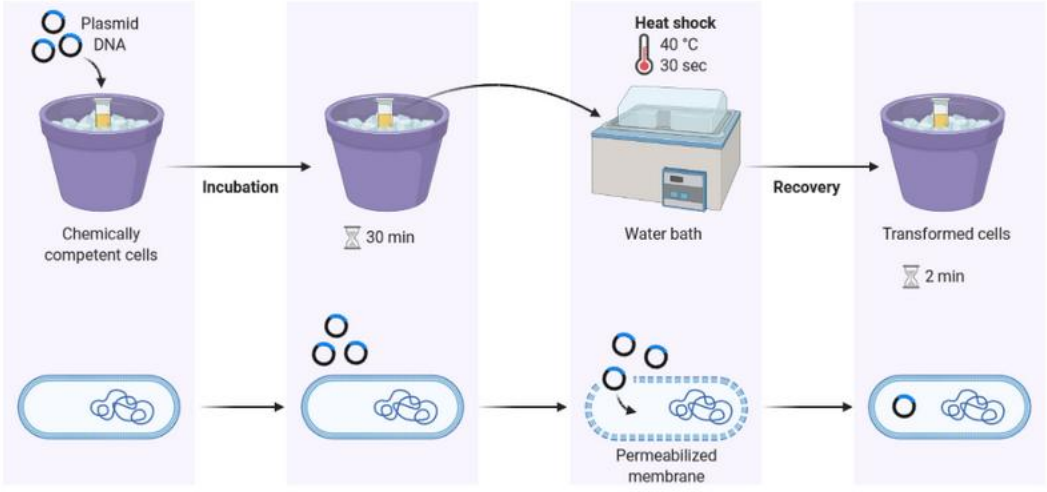


Рисунок 4. Трансформация компетентных клеток E. Coli.

5. Ночное культивирование и создание архива (сток)

Для наработки достаточного количества генетического материала отобранные колонии переводятся в жидкую фазу.

1. Каждая отобранная колония (3-5 штук) переносится в 5 мл среды LB с антибиотиком и инкубируется при +37°C и постоянном перемешивании (200–250 об/мин) в течение ночи.
2. Часть культуры (обычно 500–800 мкл) смешивается со стерильным глицерином до конечной концентрации 20% и помещается в условия сверхнизких температур (-80°C). Данная мера обеспечивает сохранность клона для долгосрочного использования.

6. Экстракция и количественный анализ плазмидной ДНК

Выделение проводится с использованием коммерческих систем (наборов для плазмидной очистки), основанных на методе щелочного лизиса и адсорбции ДНК на силикатной мембране.

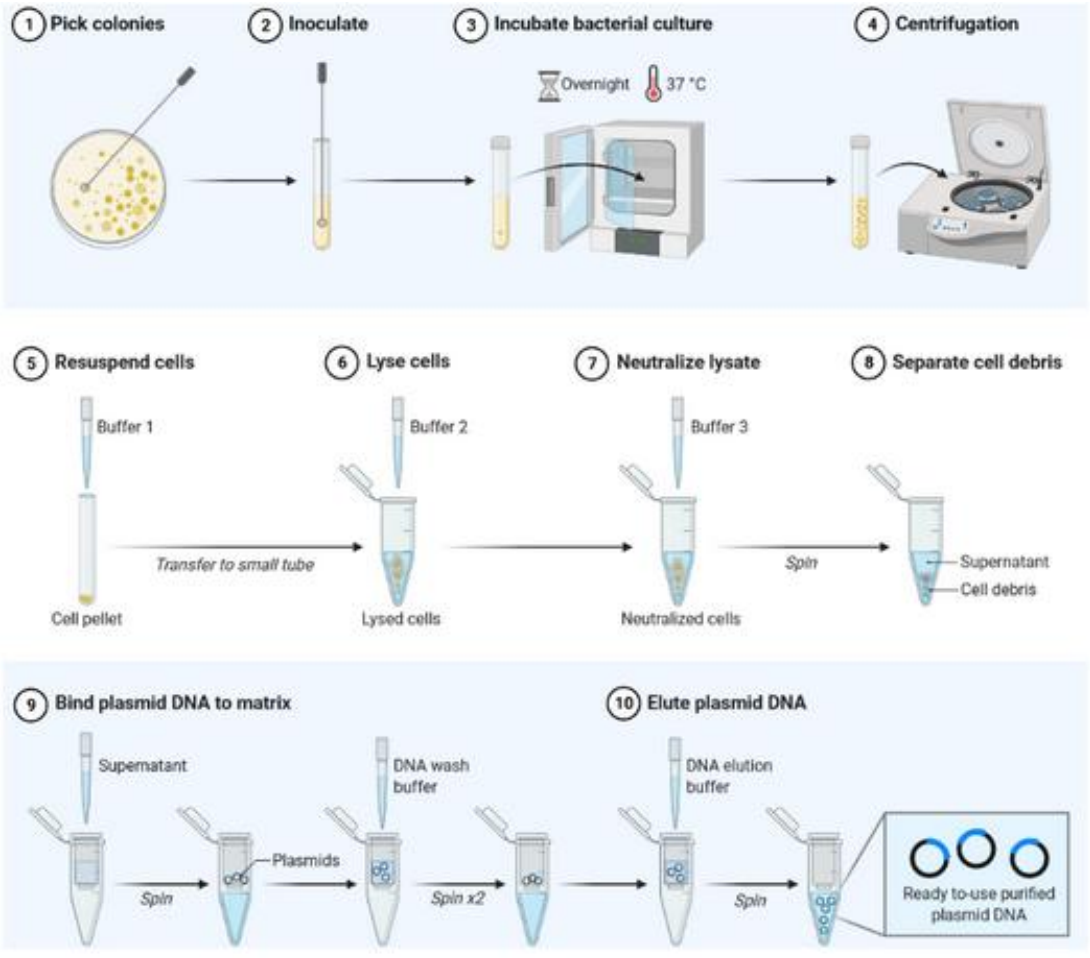


Рисунок 5. Экстракция и количественный анализ плазмидной ДНК

7. Аналитическая верификация конструкции

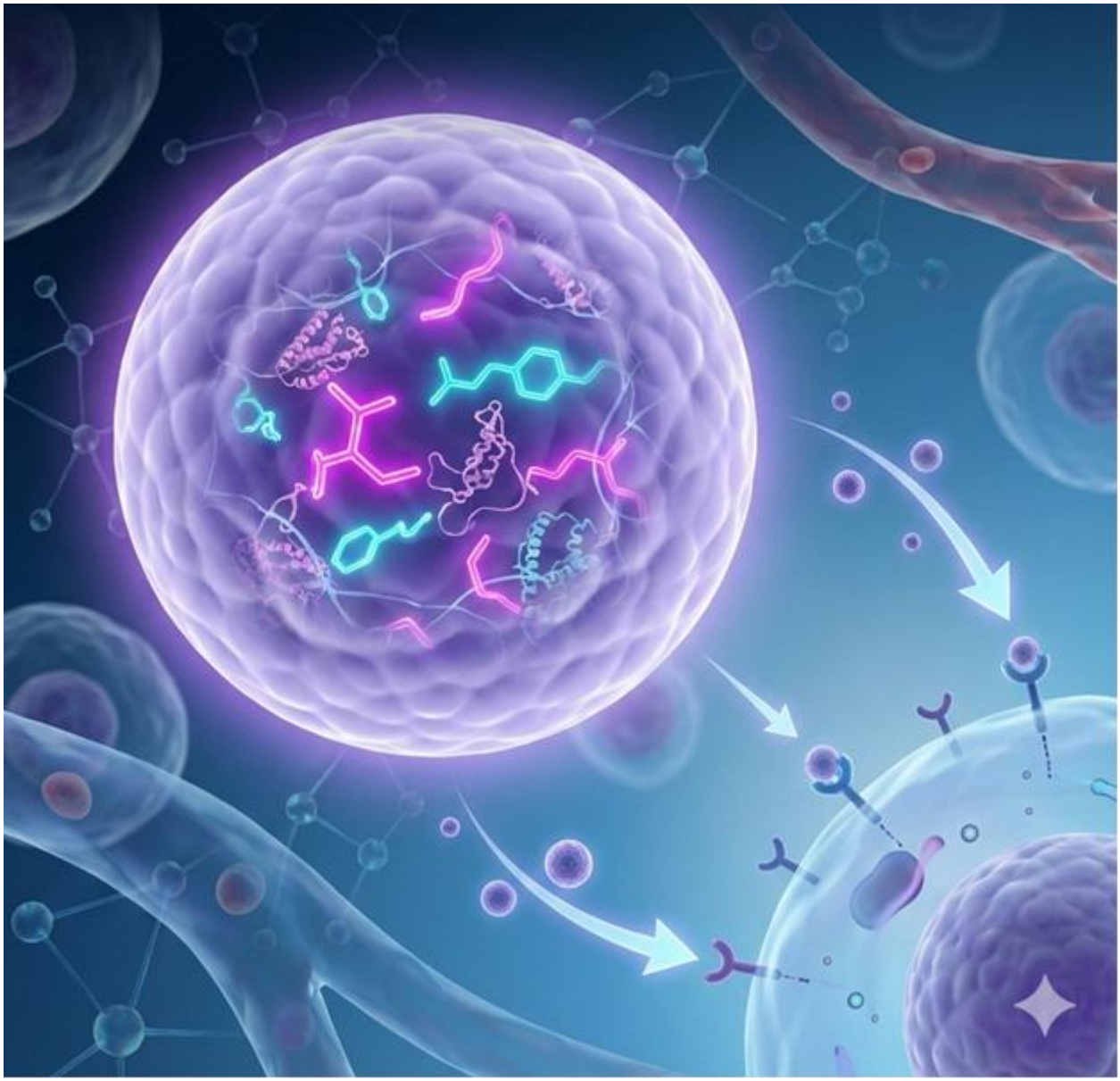
Финальный этап подтверждает корректность проведенного клонирования.

1. Проводится полимеразная цепная реакция с использованием праймеров, фланкирующих сайт вставки (U6 и Reverse primer направляющей). Продукты реакции разделяются в 1–2% агарозном геле. Наличие полосы соответствующего размера подтверждает факт интеграции олигонуклеотида.
2. Полученная плазмида направляется на секвенирование для подтверждения первичной последовательности вставки и отсутствия мутаций в области sgRNA. Только после получения точного прочтения нуклеотидного кода конструкция считается верифицированной и готовой к применению в экспериментах по редактированию генома.

Вопросы для самоконтроля:

1. Какие функциональные элементы плазмиды pRG2 необходимо идентифицировать при анализе карты в SnapGene, и для чего нужен каждый из них?
2. Почему для транскрипции sgRNA выбран промотор U6, а не, например, CMV?
3. В чём принципиальное отличие рестриктаз типа IIS от рестриктаз типа II, и как это отличие используется в Golden Gate клонировании?
4. Почему после лигирования сайты узнавания BsaI исчезают из рекомбинантной плазмиды и какое значение это имеет для стабильности конструкции?
5. Какие компоненты входят в реакцию лигирования по Golden Gate?
6. Почему для трансформации используют химически компетентные клетки DH5α, а не обычную культуру E. coli?
7. Как отличить истинно рекомбинантные колонии от колоний с пустым вектором или с неспецифическими вставками?
8. Что вы увидите на электроферограмме, если в спейсере произошла мутация или делеция?
9. Назовите три возможные причины, почему после трансформации не выросло ни одной колонии.
10. Почему в реакции Golden Gate важно поддерживать строго определённую температуру и что даёт финальная инактивация при 60°C?

МОДУЛЬ 3. НАНОЧАСТИЦЫ В МОЛЕКУЛЯРНОЙ МЕДИЦИНЕ: АЛЬБУМИНОВЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ КАК ПЛАТФОРМА ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ



Перед началом

Не заглядывая дальше в методичку, попытайтесь ответить на следующие вопросы:

1. В каких областях применяются нанотехнологии?
2. Каково значение нанотехнологий в медицине?
3. Какой смысл у понятия «наночастица»?
4. Какие типы наночастиц существуют?
5. Как охарактеризовывают наночастицы?

Словарь терминов и сокращений

Нанометр (нм) – это одна миллиардная часть метра (10^{-9} м)

Нанотехнология – это раздел науки, ключевым направлением которой является моделирование, создание и использование наноматериалов

Наноматериалы – это материалы, размер которых хотя бы в одном измерении находятся в диапазоне от 1 до 100 нм

HSA – человеческий сывороточный альбумин

BSA – бычий сывороточный альбумин

Milli-Q – деионизованная вода

DLS – метод динамического светорассеяния

SEM – сканирующая электронная микроскопия

STEM – просвечивающая электронная микроскопия

AFM – атомно-силовая микроскопия

ХЧ – химически чистый

ОСЧ – особо чистые вещества

ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА №1

Теоретическая часть

Приставка «нано» (от греч. nanos – «карлик») используется для описания одной миллиардной части единицы. Например, 1 нанометр (нм) – это 1 метр (м) уменьшенный в миллиард раз (1 нм = 10^{-9} м). Для того, чтобы показать, насколько мал 1 нм, на рисунке 6 приведено сравнение размеров некоторых объектов из окружающего нас мира.

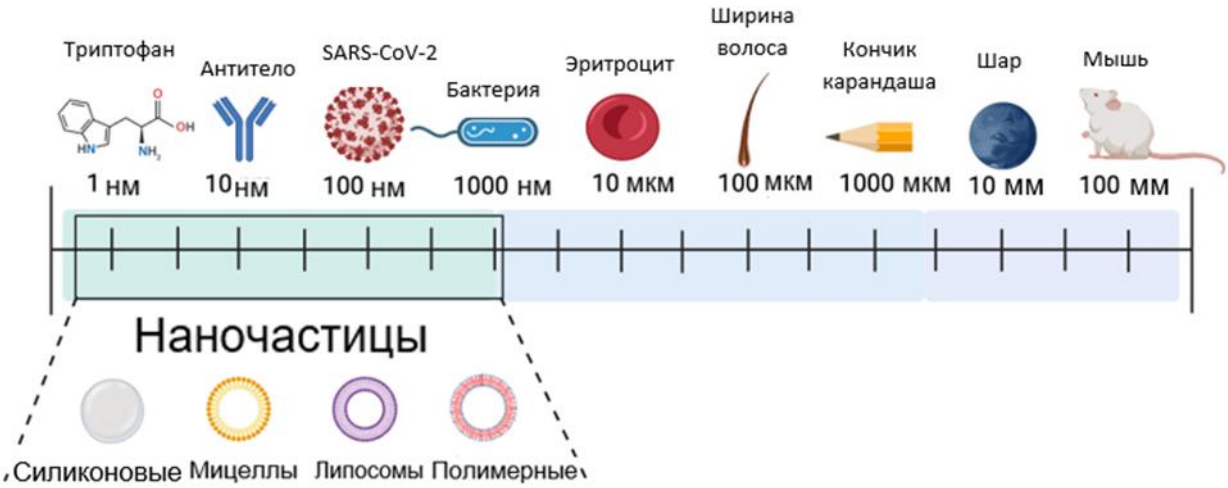


Рисунок 6 – Шкала размеров некоторых естественных и искусственных объектов

Нанотехнология – это раздел науки, ключевым направлением которой является моделирование, создание и использование материалов размером от 1 до 100 нм, известных как наноматериалы. Идейным основателем данной области знаний считается лауреат Нобелевской премии Ричард Фейнман, который в своей лекции «Внизу еще много места» (1959 год) предложил манипулировать веществом на атомном уровне для создания новых материалов и устройств. Сегодня наноматериалы используются широком спектре отраслей, включая медицину, электронику, энергетику, информационные технологии, аэрокосмическую промышленность, экологию и конструкционные материалы. Благодаря уникальным физико-химическим свойствам, наноматериалы обеспечивают миниатюризацию, повышение прочности и функциональность различных систем.

Одной из активно развивающихся областей нанотехнологии является наномедицина. Наномедицина представляет собой междисциплинарную область, объединяющую достижения химии, биологии, физики и фармакологии для разработки новых подходов к диагностике и лечению заболеваний на молекулярном уровне. Ключевыми направлениями использования наночастиц в медицине являются:

- адресная (таргетная) доставка лекарственных агентов непосредственно к пораженным клеткам (например, к опухоли за счет реализации EPR-эффекта);
- контрастные агенты для диагностики и визуализации (например, наночастицы оксида железа используются в МРТ, а наночастицы золота в КТ);
- иммунодиагностика и экспресс-тесты (например, наночастицы золота для определения COVID-19);

- применение в качестве антимикробных средств (например, наночастицы серебра в перевязочных материалах и антисептиках);

Наиболее широко исследуемым наноматериалом в медицине являются наночастицы. Наночастицы могут иметь различную форму (сферические, цилиндрические, конические, трубчатые и т.д.), размер (1-100 нм) и структуру (однородные или состоять из нескольких слоев). В зависимости от состава, наночастицы обычно делятся на три типа: органические, на основе углерода и неорганические. Основные характеристики различных классов наночастиц представлены в таблице 1.

Таблица 1. Основные классы наночастиц, используемые в медицине

Класс наночастиц	Подклассы, примеры	Материал, структура	Основные преимущества	Ограничения	Основные области применения
Липидные наночастицы	Липосомы, SLN (solid lipid NPs), NLC (nanostructured lipid carriers), липидные наночастицы для мРНК	Фосфолипидный бислой или липидная матрица	Высокая биосовместимость, возможность инкапсуляции гидрофильных и липофильных веществ, контролируемый релиз	Нестабильность, захват RES, ограниченная тканевая пенетрация	Доставка лекарств, вакцины, генная терапия
Полимерные наночастицы	PLGA, PLA, PGA, PEG-NPs, дендримеры, полимерные мицеллы	Биодеградируемые или синтетические полимеры	Контролируемое высвобождение, защита препарата, функционализация поверхности	Возможная токсичность продуктов распада, сложность синтеза	Доставка лекарств, генотерапия, таргетная терапия
Белковые наночастицы	Альбуминовые НЧ (BSA/HSA), желатиновые НЧ	Белковые матрицы (альбумин, желатин)	Биосовместимость, биодеградируемость, рецептор-опосредованный транспорт	Иммунный ответ, вариабельность синтеза, высокая стоимость	Онкология, доставка гидрофобных препаратов
Неорганические наночастицы	Золото, серебро, железооксид, кремнезем, квантовые точки	Металлы, оксиды металлов, кремнезем	Оптические, магнитные и плазмонные свойства, высокая стабильность	Потенциальная токсичность, низкая биодеградация	Диагностика, биовизуализация, фототермальная терапия
Полимер-белковые гибридные НЧ	Polymer-protein conjugates, core-shell системы	Комбинация полимера и белка	Улучшенная стабильность, таргетинг, биосовместимость	Сложность синтеза и контроля структуры	Таргетная доставка, биосенсоры
Биомиметические наночастицы	Мембранно-покрытые НЧ (RBC-membrane coated), экзосомы	Мембраны клеток, везикулы	Уклонение от иммунной системы, высокая специфичность	Сложность производства и стандартизации	Таргетная терапия, вакцины
Мезопористые и органо-силикатные НЧ	Mesoporous silica nanoparticles (MSN), organosilica	Кремнезем с пористой структурой	Высокая загрузка лекарств, контролируемый релиз	Биосовместимость зависит от модификации	Доставка лекарств, theranostics
Органические наночастицы	Полимерные красители, фоточувствительные НЧ	Органические хромофоры и полимеры	Фототермальная терапия, визуализация	Ограниченная стабильность	Фотодинамическая терапия

В последние десятилетие наибольший интерес для медицинского использования представляют белковые наночастицы. Их преимущество заключается в высокой биосовместимости, низкой иммунногенности и безопасности. В качестве матрицы могут использоваться различные белки, включая желатин, казеин, альбумин и ферритин. Однако уникальные характеристики альбумина, такие как высокая связывающая способность и специальные механизмы транспорта (опосредованные рецептором GP60 и белком SPARC), значительно способствовали его более широкому применению.

Альбумин является основным белком плазмы крови млекопитающих и выполняет ключевые функции по поддержанию онкотического давления и транспорту низкомолекулярных соединений. Человеческий сывороточный альбумин (HSA) представляет собой одноцепочечный глобулярный белок из 585 аминокислотных остатков с молекулярной массой около 66,5 кДа. Его структура организована в три гомологичных домена (I, II и III), каждый из которых разделен на субдомены A и B (рис. 7). Такая модульная организация формирует множество гидрофобных карманов, ответственных за связывание и транспорт эндогенных лигандов – жирных кислот, билирубина, гормонов и различных лекарственных веществ. Бычий сывороточный альбумин (BSA) имеет высокую степень гомологии с человеческим (75–76% идентичности) и сходную доменную структуру, что делает его удобной и экономичной моделью для доклинических исследований.

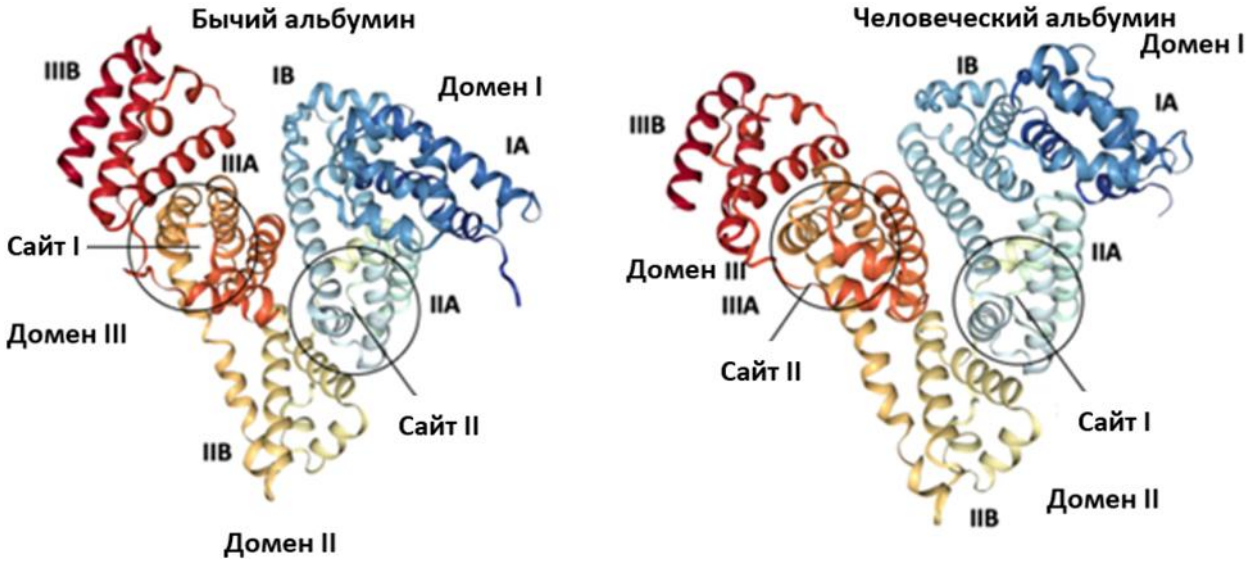


Рисунок 7 – Строение бычьего и человеческого сывороточных альбуминов

Привлекательность альбумина для создания наночастиц заключается в том, что он естественным образом транспортируется через сосудистый энедотелий, который в свою очередь может выступать в качестве барьера для других типов частиц. Трансцитоз альбуминовых наночастиц во многом обусловлен рецептором GP60, также известным как альбондин. Связывание с данным рецептором ведет к кластеризации альбумина-GP60 на поверхности клетки и ассоциацию с критически важным белком, участвующим в образовании кавеол, Cav-1. Это приводит к интернализации образовавшегося комплекса в составе везикулы в интерстиций опухоли. Стоит отметить, что GP60 связывается только с

нативным альбумином, в то время как модифицированный альбумин будет транспортироваться через GP18 и GP30.

После попадания альбуминовых наночастиц в околоопухолевое пространство, они могут связываются со SPARC, представляющий собой белок, экспрессия которого повышена в различных опухолевых тканях (например, рак молочной железы и поджелудосной железы). Такое связывание способствует накоплению и эндоцитозу наночастиц в опухолевых клетках. Также было показано, что такой рецептор-опосредованный путь позволяет альбуминовым наночастицам преодолевать механизмы лекарственной устойчивости.

Ярким примером использования альбуминовых наночастиц в клинической практике является одобренный препарат Абраксан, представляющий собой альбуминовые наночастицы размером 130 нм с включенным в них химиотерапевтическим препаратом паклитакселом. В отличие от классического паклитаксела, требовавшего токсичных растворителей, Абраксан использует естественные механизмы транспорта альбумина, что привело к повышению эффективности терапии и снижению побочных эффектов при лечении рака молочной железы, легкого и поджелудочной железы.

Методы получения белковых наночастиц основаны на контролируемой агрегации или самосборке белковых макромолекул под действием физико-химических факторов. В соответствии с современной классификацией, методы их синтеза можно разделить на три крупные группы: химические, физические и методы самосборки. К химическим методам относят эмульсионные подходы и методы комплексной коацервации. Физические методы включают электроспрей и распылительную сушку. К методам самосборки относят прежде всего десольватацию, кроме этого, дополнительно выделяют самоорганизацию амфифильных белков в мицеллярные структуры после их гидрофобной модификации. Выбор метода получения белковых наночастиц определяется в первую очередь природой самого белка, а также требуемым размером частиц, типом инкапсулируемого вещества и условиями дальнейшего применения. Однако наиболее широко используемым и технологически простым остается метод десольвации.

Процесс десольвации заключается в добавлении к водному раствору белка десольватирующего агента (например, этанола или ацетона), который снижает растворимость белка и инициирует его агрегацию с образованием наночастиц. После формирования частиц они стабилизируются сшивающими агентами (например, глутаральдегидом или EDC). При этом варьируя такие параметры как pH среды, температуру, концентрацию белка и скорость добавления десольватора можно влиять на размер получаемых частиц.

Цель работы

Получение наночастиц бычьего сывороточного альбумина методом десольватации и изучение влияния технологических параметров на процесс формирования частиц

Оборудование и материалы

- Аналитические весы;

- Перистальтический насос с возможностью регулировки скорости подачи 1–2 мл/мин;

- Магнитная мешалка;

- Дозаторы переменного объема (2–20 мкл, 100–1000 мкл);

- Бычий сывороточный альбумин, >96%;

- Деионизованная вода (Milli-Q);

- Десольватирующие агенты: ацетон, этанол 96%, изопропанол, ацетонитрил (все марки «ХЧ» или «ОСЧ»);

- Сшивающий агент: глутаровый альдегид (25% водный раствор), из которого готовят рабочие растворы концентрацией 0.1% и 1% в соответствующем растворителе.

Ход работы

Синтез наночастиц проводят методом десольватации с последующей химической сшивкой. Для изучения влияния параметров синтеза проводят серию экспериментов, варьируя условия согласно Таблице 1.

Параметры	Варианты значений
Десольватирующий агент (растворитель)	ацетон, метанол, этанол, изопропанол, ацетонитрил
Скорость перемешивания, об/мин	250, 500
Скорость подачи растворителя, мл/мин	1, 2
Концентрация сшивающего агента (глутаровый альдегид), %	0.1, 1

1. Приготовление раствора белка

На аналитических весах отвешивают 40 мг BSA и переносят в стеклянный химический стакан вместимостью 25–50 мл. К навеске добавляют 2 мл деионизованной воды Milli-Q и перемешивают на магнитной мешалке при комнатной температуре до полного растворения белка (обычно 5–10 минут).

2. Стадия десольватации

Стакан с раствором BSA помещают на магнитную мешалку и устанавливают заданную скорость перемешивания (250 или 500 об/мин). В перистальтический насос заправляют силиконовый шланг, один конец которого опускают в емкость с десольватирующим агентом, а второй – фиксируют над стаканом с раствором белка так, чтобы капли падали в центр воронки, создаваемой мешалкой.

Включают насос и начинают подачу десольватирующего агента с заданной скоростью (1 или 2 мл/мин). Общий объем добавляемого растворителя фиксирован и составляет 8 мл (из расчета 40 мг BSA/2 мл воды). В процессе добавления наблюдают изменение оптических свойств раствора – появление помутнения, свидетельствующее о формировании наночастиц (коацерватов белка). После завершения подачи десольватирующего агента, суспензию оставляют перемешиваться на 30 минут для стабилизации образовавшихся частиц и завершения процесса десольватации.

ВНИМАНИЕ! При работе с ацетонитрилом необходимо соблюдать особые меры предосторожности в вытяжном шкафу ввиду его токсичности.

3. Сшивка наночастиц

По истечении 30 минут в суспензию добавляют 1 мл раствора глутарового альдегида заданной концентрации (0.1% или 1%), приготовленного на соответствующем десольватирующем агенте (том же, который использовался для десольватации). Добавление проводят медленно, чтобы избежать локального повышения концентрации сшивателя.

4. Окончание эксперимента

Реакционную смесь оставляют инкубироваться при комнатной температуре в течение 12 часов при непрерывном перемешивании с заданной ранее скоростью. По истечении времени инкубации полученную суспензию наночастиц очищают от непрореагировавших реагентов путём центрифунирования с отмывкой или хранят в холодильнике при 4°C.

Примечание: процедуры очистки в рамках данной работы не проводятся в связи с ограниченным временем.

Рекомендации:

- Ключевым моментом является поддержание постоянной скорости подачи десольватирующего агента, что обеспечивается использованием перистальтического насоса. Ручное добавление может привести к широкому распределению частиц по размерам.

- Соотношение растворителей в десольватирующем агенте подобрано для обеспечения полного смешивания с водой и эффективной десольватации. Для изопропанола требуется большее соотношение (5:1) из-за его меньшей полярности.

ПРАКТИЧЕСКАЯ РАБОТА №2

Теоретическая часть

Обязательным этапом разработки наночастиц, в том числе и альбуминовых, является оценка их физико-химических характеристик. Совокупность таких параметров как размер, распределение, морфология поверхности и электрический заряд оказывает влияние на стабильность, фармакокинетику, клеточное поглощение и биологическую активность наночастиц. Для комплексного анализа альбуминовых наночастиц используют сочетание методов светорассеяния, электронной и зондовой микроскопии.

Метод динамического светорассеяния (DLS) позволяет определить гидродинамический диаметр частиц в растворе с учетом их гидратной оболочки, индекс полидисперсности (однородность распределения по размерам) и дзета-потенциал. Для системной доставки целевым является диапазон размеров 50–300 нм, обеспечивающий баланс между длительной циркуляцией и способностью к пассивному накоплению в опухолях. Значения индекса полидисперсности ниже 0,2 указывают на высокую однородность системы, что критически важно для воспроизводимости фармакологических

свойств. Дзета-потенциал, отражающий поверхностный заряд, служит индикатором коллоидной стабильности: для альбуминовых наночастиц типичны отрицательные значения в диапазоне от –10 до –30 мВ.

Для визуализации морфологии и оценки реальных размеров в сухом состоянии применяют сканирующую электронную микроскопию (SEM) и просвечивающую электронную микроскопию (STEM). Альбуминовые наночастицы, как правило, имеют сферическую форму с гладкой или слегка шероховатой поверхностью. Размеры, определенные методом SEM, обычно несколько меньше гидродинамического диаметра, что связано с отсутствием гидратационной оболочки в условиях вакуума. Дополнительную информацию о топографии поверхности и механических свойствах предоставляет атомно-силовая микроскопия (AFM), которая подтверждает относительно мягкую, эластичную структуру альбуминовых частиц, способствующую их эффективному клеточному поглощению. Комплексное применение этих методов обеспечивает всестороннюю характеристику наносистемы и позволяет оптимизировать параметры синтеза для получения частиц с заданными свойствами.

Поскольку одним из ключевых направлений применения наночастиц в медицинской практике является использование их для адресной доставки лекарственных препаратов, то еще одним оцениваемым параметром является загрузочная ёмкость. Эта характеристика определяется как массовое соотношение лекарства к общей массе, нагруженной наночастицы. Приоритетной задачей является разработка систем с высокой загрузкой (более 10% по массе) так как это позволит снизить количество вводимого носителя, минимизировать побочные эффекты, уменьшить стоимость производства и повысить терапевтическую эффективность. В современной литературе выделяют три основные стратегии создания наночастиц с высокой загрузкой: пост-загрузку, со-загрузку и пре-загрузку (рис. 8). Выбор оптимальной стратегии диктуется физико-химическими свойствами лекарства и требуемыми характеристиками конечной наночастицы: для пролонгированного действия предпочтительна пре-загрузка, для максимальной концентрации действующего вещества – со-загрузка.

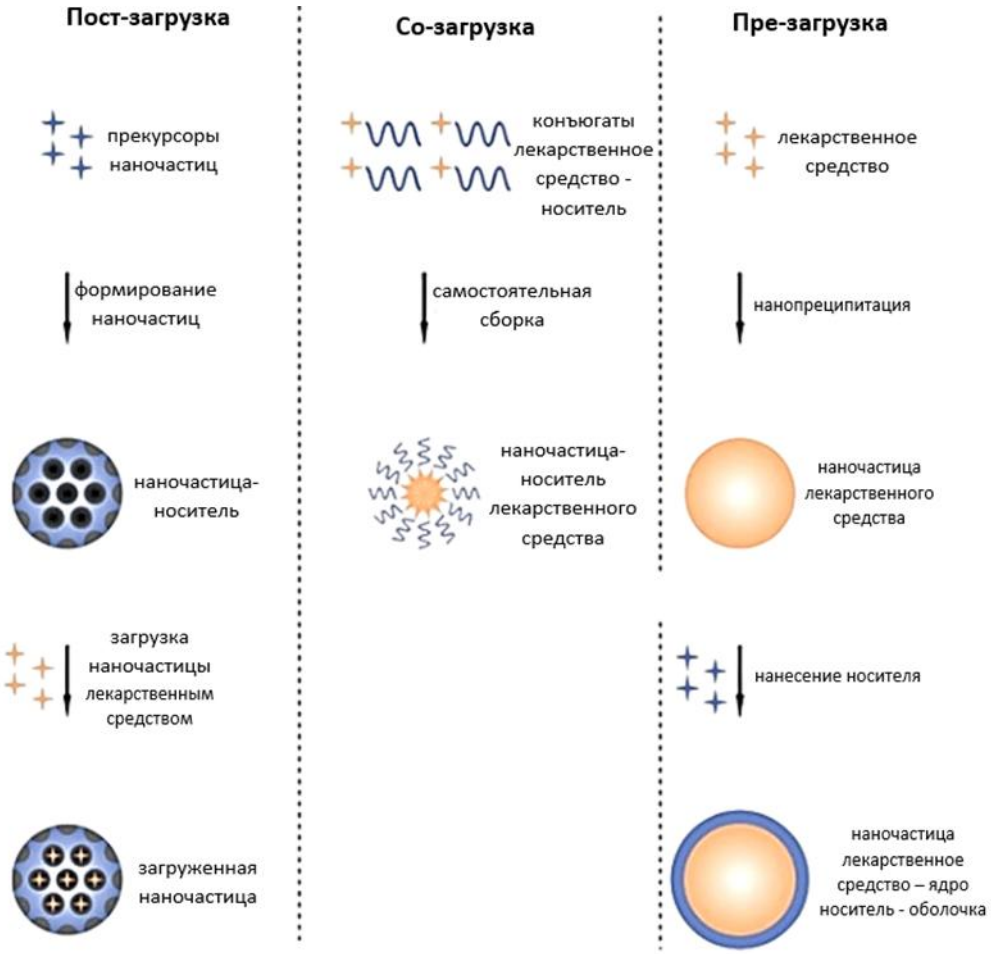


Рисунок 8 – Стратегии загрузки наночастиц

Стратегия пост-загрузки является наиболее традиционной и подразумевает синтез пустого нанокаркаса с последующим насыщением его лекарством. Удержание молекул происходит за счет физической адсорбции, электростатических или гидрофобных взаимодействий. Преимуществом метода является его универсальность, однако из-за слабых сил адсорбции часто наблюдается взрывное высвобождение препарата в начальный момент времени.

При со-загрузке формирование наночастицы и включение лекарства происходят одновременно, причем молекулы препарата выступают активными участниками самосборки. Например, гидрофобное лекарство могут ковалентно связывать с гидрофильным белком, и полученный амфифильный конъюгат самопроизвольно собирается в наночастицы. Этот подход позволяет достичь рекордно высокой загрузки, но сложен в реализации для различных типов лекарств.

Стратегия пре-загрузки основана на создании структуры ядро-оболочка. Сначала методом нанопреципитации формируется ядро из чистого лекарства, которое затем покрывается защитной белковой оболочкой. Такой подход обеспечивает отличный контроль высвобождения и высокую стабильность частиц, однако разработан преимущественно для гидрофобных препаратов и требует тонкого контроля кинетики осаждения.

Цель работы

Загрузка наночастиц бычьего сывороточного альбумина флуоресцентным красителем Родамин Б различными методами

Оборудование и материалы

- Аналитические весы;

- Перистальтический насос с возможностью регулировки скорости подачи 1–2 мл/мин;

- Магнитная мешалка;

- Центрифуга;

- Дозаторы переменного объема (2–20 мкл, 100–1000 мкл);

- Бычий сывороточный альбумин, >96%;

- Деионизованная вода (Milli-Q);

- Десольватирующие агенты: ацетон, этанол 96%, изопропанол, ацетонитрил (все марки «хч» или «осч»);

- Сшивающий агент: глутаровый альдегид (25% водный раствор), из которого готовят рабочие растворы концентрацией 0.1% и 1% в соответствующем растворителе;

- Родамин Б (Rhodamine B), раствор концентрацией 10 мг/мл в деионизованной воде.

Ход работы

МЕТОД 1. Инкапсулирование Родамина Б

В этом методе краситель добавляется непосредственно в раствор белка до начала процесса десольватации. Молекулы родамина Б захватываются формирующейся белковой матрицей и оказываются включенными внутрь наночастиц.

1.1. Приготовление раствора белка с красителем

На аналитических весах отвешивают 40 мг BSA и переносят в стеклянный химический стакан вместимостью 25–50 мл. К навеске добавляют 1 мл деионизованной воды Milli-Q и перемешивают на магнитной мешалке при комнатной температуре до полного растворения белка (5–10 минут).

В полученный раствор белка добавляют 1 мл раствора родамина Б концентрацией 10 мг/мл. Смесь тщательно перемешивают до гомогенного состояния. Конечный объем водной фазы составляет 2 мл, что соответствует стандартным условиям синтеза.

Примечание: Раствор с красителем следует оберегать от прямого света для предотвращения фотообесцвечивания.

1.2. Стадия десольватации

Стакан с окрашенным раствором BSA помещают на магнитную мешалку и устанавливают заданную скорость перемешивания (250 или 500 об/мин). В перистальтический насос заправляют силиконовый шланг, один конец которого опускают в емкость с десольватирующим агентом, а второй фиксируют над стаканом с раствором белка.

Включают насос и начинают подачу десольватирующего агента с заданной скоростью (1 или 2 мл/мин). Общий объем добавляемого растворителя составляет 8 мл. В процессе добавления наблюдают помутнение раствора и равномерное распределение розовой окраски в объеме формирующихся частиц. После завершения подачи десольватирующего агента суспензию оставляют перемешиваться на 30 минут для стабилизации образовавшихся частиц.

1.3. Сшивка наночастиц

По истечении 30 минут в суспензию добавляют 1 мл раствора глутарового альдегида заданной концентрации (0.1% или 1%), приготовленного на соответствующем десольватирующем агенте. Добавление проводят медленно, избегая локального повышения концентрации сшивателя.

Реакционную смесь инкубируют при комнатной температуре в течение 12 часов при непрерывном перемешивании с заданной ранее скоростью. По окончании инкубации получают суспензию наночастиц с инкапсулированным родамином Б.

1.4. Очистка

Для удаления невключившегося красителя проводят центрифугирование при 20913 g в течение 5 минут. Супернатант удаляют, осадок ресуспендируют в 1-2 мл Milli-Q воды. Процедуру повторяют 3 раза.

МЕТОД 2. Адсорбция родамина Б (инкубация готовых частиц с красителем)

В этом методе сначала получают пустые (немеченые) наночастицы BSA по стандартному протоколу (описанному в практической работе №1), а затем проводят их инкубацию с раствором красителя. Молекулы родамина Б связываются с поверхностью частиц за счет физико-химических взаимодействий.

2.1. Инкубация с красителем

К полученной суспензии очищенных пустых наночастиц добавляют 1 мл раствора родамина Б концентрацией 10 мг/мл. Смесь тщательно инкубируют при комнатной температуре в течение 15 минут при непрерывном перемешивании (на магнитной мешалке или орбитальном шейкере). В процессе инкубации происходит адсорбция молекул родамина Б на поверхности и в приповерхностных порах наночастиц.

2.2. Отделение несвязавшегося красителя

По окончании инкубации суспензию центрифугируют при 20 913 g в течение 10 минут. Супернатант, содержащий избыток несвязавшегося родамина Б, аккуратно удаляют. Осадок, представляющий собой наночастицы с адсорбированным на поверхности красителем, ресуспендируют в 1–2 мл Milli-Q воды. При необходимости процедуру отмывки повторяют.

Вопросы для самоконтроля:

1. Что понимается под наночастицами в молекулярной медицине? Укажите диапазон их размеров.
2. Какие основные классы наночастиц используются в медицине? Приведите не менее трёх примеров.
3. В чём заключается преимущество наночастиц по сравнению с традиционными лекарственными формами?
4. Какие физико-химические параметры наиболее важны для характеристики наночастиц?
5. Что такое ζ-потенциал и какую информацию о системе он даёт?
6. Опишите принцип метода десольватации для получения альбуминовых наночастиц.
7. Как влияет тип органического растворителя на размер и стабильность BSA-NPs?
8. Объясните, почему альбумин является удобной матрицей для доставки гидрофобных лекарств.
9. Как размер наночастиц влияет на их циркуляцию в организме и проникновение в ткани?
10. Сравните белковые, липидные и полимерные наночастицы по биосовместимости и возможностям функционализации.
11. Какие механизмы клеточного захвата наночастиц существуют? Охарактеризуйте их.
12. Объясните роль рецепторов gp60 и белка SPARC в транспорте альбуминовых наночастиц.
13. Почему отрицательный ζ-потенциал обычно способствует повышению коллоидной стабильности?
14. Как изменение pH среды влияет на формирование и стабильность альбуминовых наночастиц?
15. Предложите способ модификации поверхности BSA-NPs для таргетной доставки в опухолевые клетки.
16. Разработайте эксперимент по сравнению различных десольватирующих агентов и их влияния на свойства наночастиц.
17. Предложите стратегию повышения стабильности альбуминовых наночастиц in vivo.
18. Опишите, каким образом можно использовать альбуминовые наночастицы для доставки ингибиторов сигнального пути TGF-β.
19. Разработайте концепцию наночастицы для комбинированной терапии (доставка лекарства + диагностический маркер).
20. В чем принципиальное различие между инкапсулированием и адсорбцией как методами загрузки лекарственных веществ в наночастицы?
21. Почему для метода адсорбции обязательна предварительная очистка пустых наночастиц?
22. Какой метод обеспечит более пролонгированное высвобождение красителя и почему?
23. Предложите способ количественной оценки эффективности загрузки красителя для каждого из методов.
24. Какие факторы могут повлиять на адсорбцию родамина Б на поверхности частиц?

МОДУЛЬ 4. ИЗУЧЕНИЕ ПРИНЦИПОВ CAR-T ТЕРАПИИ

Перед началом

Не заглядывая дальше в методичку, попытайтесь ответить на следующие вопросы:

1. Что такое Т-клетки и какова их роль в иммунной системе?
2. Как работают антиген-специфические рецепторы на поверхности клеток?
3. Что такое химерный антиген-рецептор (CAR)?
4. Откуда берутся CAR-T клетки для терапии?
5. Какова структура CAR?
6. Для чего используют CAR-T терапию в медицине?
7. Какую функцию CAR-T клетки выполняют в организме пациента?
8. Что такое генная инженерия и как она применяется в CAR-T?
9. От чего зависит эффективность CAR-T терапии?
10. Какая молекула является ключевой для активации Т-клеток?
11. Что такое цитокиновый шторм?
12. Какие бывают поколения CAR?
13. Как клетка может регулировать распознавание антигенов?
14. Какие типы рака лечат с помощью CAR-T?

Словарь терминов и сокращений

CAR-T – химерные антиген-рецепторные Т-клетки (Chimeric Antigen Receptor T-cells)
TCR – Т-клеточный рецептор (T-cell receptor)
MHC – главный комплекс гистосовместимости (Major Histocompatibility Complex)
CD19 – маркер на поверхности В-клеток, часто используемый как мишень в CAR-T
Аффинность – сила взаимодействия рецептора и антигена
Авидность – суммарная сила взаимодействия, зависящая от количества связывающих сайтов
Лентивирус – вирусный вектор для доставки генов в клетки
PBS – фосфатный буфер (Phosphate-Buffered Saline)
IL-2 – интерлейкин-2, цитокин для пролиферации Т-клеток
CRS – синдром высвобождения цитокинов (Cytokine Release Syndrome)
Fab – фрагмент антитела, связывающий антиген
Fc – кристаллизующийся фрагмент антитела
scFv – одноцепочечный вариабельный фрагмент антитела (single-chain variable fragment)
CD3ζ – сигнальный домен для активации Т-клеток
CD28 – костимулирующий домен для усиления сигнала
4-1BB – другой костимулирующий домен для повышения активности клеток

Теоретическое введение

CAR-T-терапия представляет собой инновационный подход в иммуноонкологии, основанный на генетической модификации Т-клеток пациента для направленного уничтожения злокачественных клеток. Т-клетки, являющиеся ключевыми эффекторами адаптивного иммунитета, в норме распознают антигены через Т-клеточный рецептор в комплексе с молекулами главного комплекса гистосовместимости. Однако при многих злокачественных новообразованиях опухолевые клетки уклоняются от такого распознавания вследствие мутаций, снижения экспрессии MHC или формирования иммуносупрессивного микроокружения. Для преодоления этого ограничения была разработана технология химерных антигенных рецепторов, представляющих собой искусственно сконструированные белки, которые объединяют внеклеточный домен, происходящий из моноклональных антител, с внутриклеточными сигнальными доменами Т-клеток. Такая конструкция позволяет CAR-T-клеткам распознавать и уничтожать опухолевые клетки независимо от презентации антигена через MHC, что оказалось особенно эффективным при лечении гематологических злокачественных новообразований, включая острый лимфобластный лейкоз и диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому.

Структура химерного антигенного рецептора имеет модульный дизайн, включающий три основных домена: эктодомен, трансмембранный домен и эндодомен. Эктодомен, ответственный за узнавание антигена, состоит из одноцепочечного вариабельного фрагмента, полученного из вариабельных участков тяжелой и легкой цепей антитела, а также шарнирного участка, обеспечивающего гибкость и необходимое расстояние между антигенсвязывающим сайтом и мембраной Т-клетки. Выбор типа шарнирного участка имеет критическое значение: более длинные шарниры обеспечивают

доступ к мембрано-проксимальным эпитопам или сложным гликозилированным антигенам, тогда как более короткие предпочтительны при нацеливании на дистальные эпитопы. Трансмембранный домен не только фиксирует рецептор в мембране, но и участвует в димеризации CAR после связывания антигена, а также опосредует передачу активационного сигнала за счет взаимодействия с эндогенными сигнальными молекулами. Внутриклеточный сигнальный домен традиционно содержит CD3ζ-цепь, несущую иммунорецепторные тирозин-активирующие мотивы, которые служат сайтами фосфорилирования для рекрутирования киназы ZAP70, запускающей каскад активации Т-клетки. Для полноценной активации, пролиферации и выживания CAR-Т-клеток одного лишь сигнала CD3ζ недостаточно, поэтому в состав эндодомена включены один или несколько костимулирующих доменов, наиболее изученными из которых являются CD28 и 4-1BB. CD28-опосредованная костимуляция усиливает продукцию интерлейкина-2, метаболическую активность и обеспечивает быстрый противоопухолевый ответ, однако может способствовать более раннему истощению Т-клеток и развитию системных токсичностей, а 4-1BB способствует формированию центральных клеток памяти и длительной персистенции CAR-Т-клеток за счет менее интенсивной тонической сигнализации.

Эволюция CAR-конструкций прошла через несколько поколений, каждое из которых было направлено на повышение эффективности и безопасности. Первое поколение CAR содержало только CD3ζ-цепь без костимулирующих доменов, что в клинических испытаниях приводило к слабой пролиферации и недостаточной противоопухолевой активности. Второе поколение CAR, дополненное одним костимулирующим доменом CD28 или 4-1BB, продемонстрировало значительно улучшенную активацию, цитотоксичность и выживаемость in vivo, и именно конструкции второго поколения легли в основу всех шести одобренных FDA препаратов для терапии В-клеточных злокачественных новообразований. Третье поколение CAR, содержащее два последовательных костимулирующих домена, в доклинических исследованиях показало превосходный противоопухолевый ответ и длительную персистенцию, однако клинические данные не всегда подтверждали значимое преимущество перед вторым поколением. Четвертое поколение CAR, также известное как TRUCKs – T cells redirected for universal cytokine killing, включает дополнительный трансген для индуцибельной секреции провоспалительных цитокинов, что позволяет рекрутировать врожденные иммунные клетки в опухолевое микроокружение и усиливать противоопухолевый ответ. Пятое, или «следующее поколение» CAR, находится в стадии активной разработки: такие рецепторы могут включать укороченный цитоплазматический домен β-цепи рецептора IL-2 для активации JAK-STAT-пути, химерные переключающие рецепторы, превращающие ингибирующий сигнал PD-1 в активирующий, или же «киллерные переключатели» для контролируемой элиминации CAR-Т-клеток при развитии тяжелых токсичностей.

Традиционный процесс получения CAR-Т-клеток осуществляется ex vivo и включает несколько последовательных этапов. У пациента с помощью лейкафереза собирают мононуклеарные клетки периферической крови, после чего Т-клетки активируют in vitro с использованием антител к CD3 и CD28 в присутствии цитокинов. Затем в активированные Т-клетки с помощью вирусных векторов вводят ген, кодирующий CAR. После этого трансдуцированные клетки подвергают экспансии в биореакторах до

достижения терапевтической дозы, проводят серию тестов на стерильность, жизнеспособность, чистоту и активность, а затем криоконсервируют и транспортируют обратно в клинику для инфузии пациенту. Весь цикл от забора клеток до введения занимает от 2 до 7 недель. Непосредственно перед инфузией CAR-T-клеток пациент получает курс лимфодеплеционной химиотерапии, необходимой для элиминации эндогенных лимфоцитов, которые выступают в качестве «стоков» для гомеостатических цитокинов, и для подавления иммуносупрессивных клеток-регуляторов, что в итоге создает благоприятные условия для приживления и пролиферации введенных CAR-T-клеток. Несмотря на впечатляющую клиническую эффективность, особенно при рефрактерных В-клеточных злокачественных новообразованиях, данный ex vivo подход сопряжен с рядом ограничений, среди них высокая стоимость, длительное производство, вариабельность продукта, необходимость специализированных мощностей и риск инфекционных осложнений, связанный с лимфодеплецией.

В ответ на эти вызовы в последние годы активно разрабатывается альтернативная стратегия, а именно прямая in vivo генерация CAR-T-клеток путем системного введения препаратов, содержащих генетический материал, кодирующий CAR. Этот подход позволяет полностью отказаться от сложного ex vivo культивирования и лимфодеплеции, предоставляя готовое (off-the-shelf) терапевтическое средство, которое можно вводить пациенту практически сразу после установления диагноза. Для in vivo репрограммирования Т-клеток используются две основные технологические платформы: невирусные наночастицы с мРНК-матрицей CAR и вирусные векторы, псевдотипированные для специфического нацеливания на Т-клетки.

Целью данной работы является изучение принципов генерации и функции CAR-T клеток с помощью анализа генетических конструктов, мониторинга экспрессии и оценки цитотоксической активности в различных условиях.

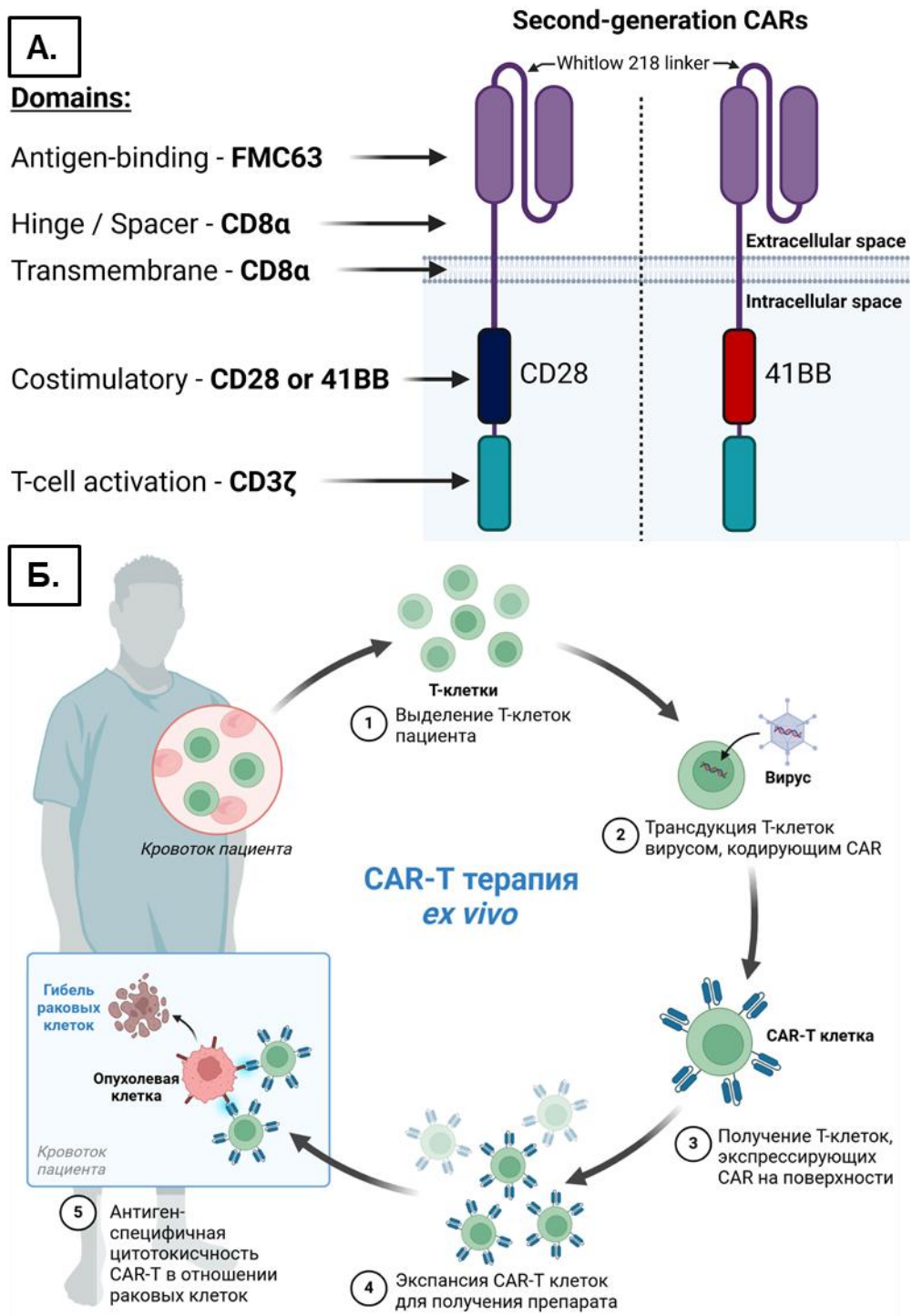


Рисунок 9. А) Структура CAR. Внеклеточный scFv, шарнир, трансмембранный домен, сигнальные домены. Б) Процесс CAR-T терапии. На рисунке показана схема извлечения Т-клеток, трансдукции, инфузии.

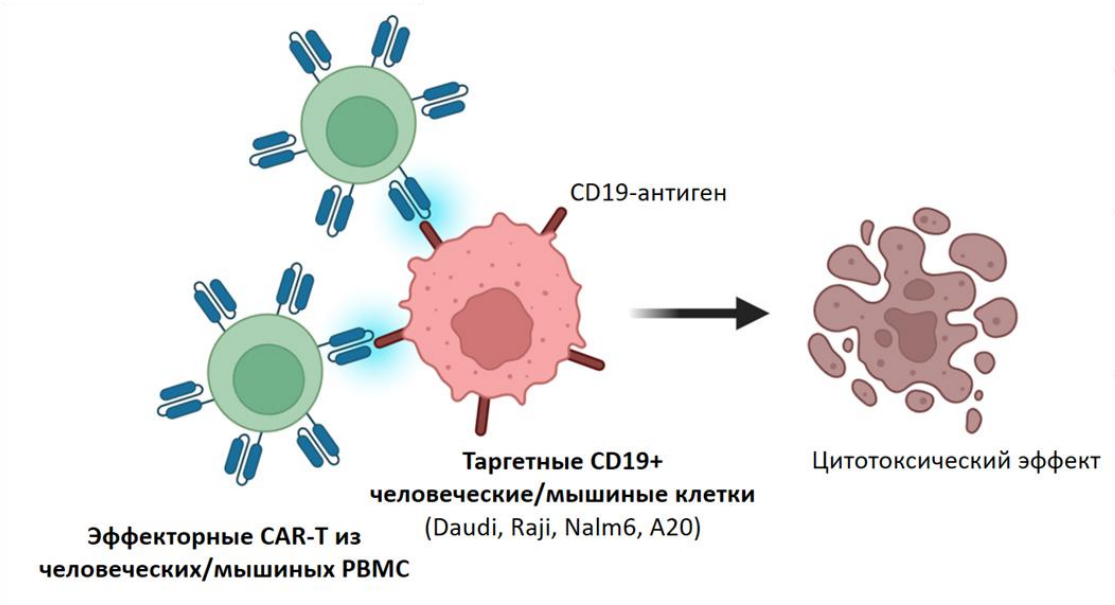


Рисунок 10. Механизм действия CAR-T: распознавание антигена, активация, лизис опухолевой клетки.

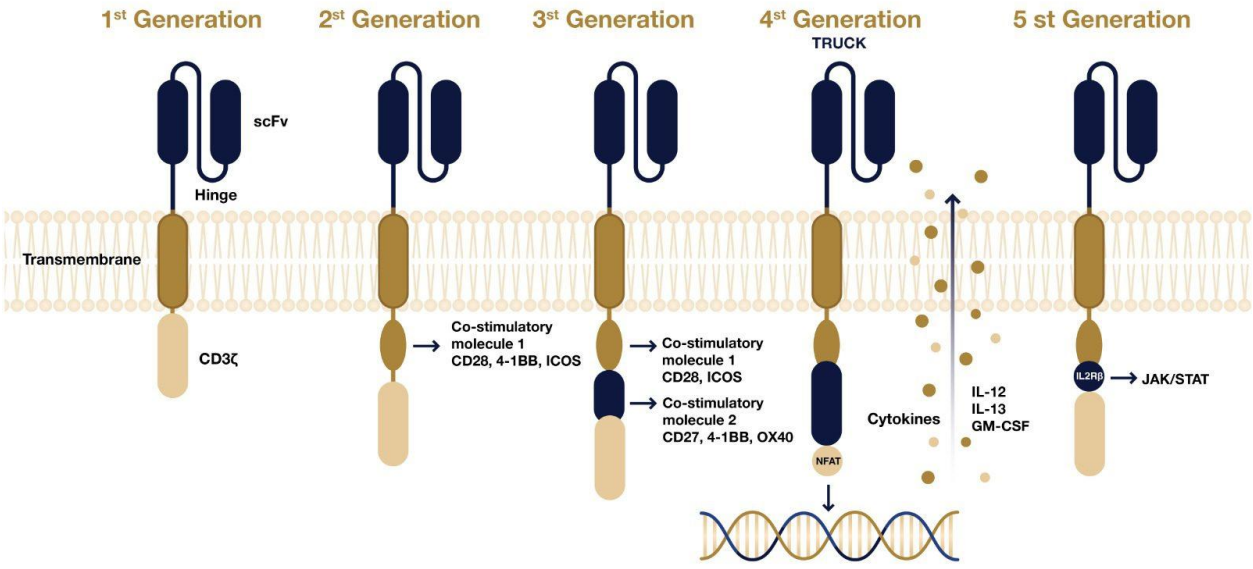


Рисунок 11. Поколения CAR и их сигнальные домены.

Описание практикума

CAR-T-терапия базируется на принципах генной инженерии и иммунологии. Ключевым этапом является трансдукция Т-клеток вирусным вектором, несущим ген химерного антигенного рецептора. В рамках лабораторного практикума используются инструменты биоинформатики, например, SnapGene для анализа и конструирования

плазмид, а также проточная цитометрия (анализатор CytoFLEX) для мониторинга экспрессии CAR и оценки цитотоксичности.

Проточная цитометрия позволяет анализировать клетки по флуоресценции с использованием следующих меток: GFP для детекции CAR, CellTrace Red для мечения клеток-мишеней и DAPI для определения жизнеспособности. **Стандартная стратегия гейтинга включает: выделение популяции по параметрам FSC/SSC – размер и гранулярность, отбор одиночных клеток, затем выделение живых клеток и, наконец, анализ экспрессии целевых маркеров, например, CAR на поверхности Т-клеток. Для оценки специфичности целесообразно использовать как CD19-положительные клетки-мишени, например, линия NALM6, так и CD19-отрицательные контрольные клетки – K562.**

Цитотоксический анализ предназначен для количественной оценки способности CAR-T-клеток лизировать клетки-мишени. Процент специфического лизиса рассчитывают по формуле:

% лизиса = (1 – (число живых мишеней в ко-культуре / число живых мишеней в контрольной культуре)) × 100%

Материалы и реагенты

1. Компьютер с SnapGene для анализа плазмид (файлы pLV-CD19-28z-GFP и pLV-CD19-41BB-GFP).
2. Данные CytoFLEX из предыдущих экспериментов (файлы FCS для дней 6, 9, 11 до/после заморозки).
3. PBMC с CAR-T (MOI=10) и UTD контроль.
4. NALM6 клетки (мишени).
5. Анти-CD19 антитела (конъюгированные с флуорофором, напр. PE).
6. CellTrace Red (Invitrogen).
7. DAPI (1 мг/мл сток).
8. PBS, RPMI полный (с 10% FBS, глутамином).
9. 96-луночные планшеты.
10. CytoFLEX цитометр.
11. Программное обеспечение CytExpert для анализа.

1. Анализ карт CAR-T-конструкций в SnapGene (28z и 41BBz)

Откройте файлы плазмид в программе SnapGene. Изучите структуру каждого вектора, идентифицируя следующие элементы: промотор EF-1α, сигнальный пептид (SP GM-CSF), вариабельные домены лёгкой и тяжёлой цепей (VL/VH) одноцепочечного фрагмента FMC63 (scFv), линкер 218, шарнирный и трансмембранный домены CD8a, костимулирующие домены (CD28 или 4-1BB), сигнальный домен CD3ζ, а также последовательности P2A, eGFP и FLAG-метки. Сравните две конструкции второго поколения: 28z (содержит CD28) и 41BBz (содержит 4-1BB). Обратите особое внимание на

различия в сигнальных доменах. Зафиксируйте длины нуклеотидных последовательностей и перечень ключевых элементов. Выделите на этот этап 20–30 минут.

2. Обработка и интерпретация данных проточной цитометрии CytoFLEX по генерации CAR-T

Откройте файлы с расширением .FCS. Проведите гейтинг в следующей последовательности: график Time vs. FSC (для оценки стабильности сигнала), затем FSC vs. SSC (выделение одиночных клеток — singlets), далее $DAPI^-$ (живые клетки) vs. FSC, и наконец GFP^+ vs. FSC. Для дней 6, 9 и 11 до заморозки а также после разморозки рассчитайте процент GFP-положительных клеток для значений множественности инфекци 1, 5 и 10, а также для необработанных контрольных клеток (UTD). Интерпретируйте полученные данные: оцените динамику нарастания доли CAR-позитивных клеток во времени, а также влияние процедуры заморозки. Постройте график зависимости процента CAR-положительных клеток от дня культивирования и MOI.

3. Окрашивание клеток-мишеней антителами к CD19

Соберите примерно 1 миллион клеток линии NALM6. Осадите клетки центрифугированием при 1500 об/мин в течение 3 минут. Ресуспендируйте осадок в 100 мкл PBS, содержащем антитела к CD19, конъюгированные с PE (разведение 1:100). Инкубируйте 30 минут на льду в темноте. Дважды промойте PBS с центрифугированием. Ресуспендируйте клетки в PBS с добавлением DAPI (разведение 1:200 000). Проведите анализ на цитометре CytoFLEX, гейтируя CD19-позитивные клетки (канал PE) для подтверждения экспрессии антигена на клетках-мишенях.

4. Постановка цитотоксического теста — окрашивание клеток-мишеней красителем CellTrace Red

Соберите 2 миллиона клеток NALM6 и ресуспендируйте их в 1 мл PBS до концентрации 1×10^6 клеток/мл. Добавьте CellTrace Red из расчёта 1 мкл красителя на 1 мл клеточной суспензии (исходный раствор в DMSO). Инкубируйте 10 минут при 37°C. Удалите избыток красителя, добавив четырёхкратный объём полной среды RPMI, и инкубируйте ещё 5 минут. Осадите клетки центрифугированием (500 g, 5 минут), промойте средой с FBS. Ресуспендируйте окрашенные клетки-мишени в 1 мл RPMI до конечной концентрации 1×10^5 клеток/мл.

Подготовка эффекторных клеток: соберите CAR-T-клетки (MOI=10) и необработанные Т-клетки (UTD). Проведите подсчёт (с помощью трипанового синего или на цитометре). Приготовьте серийные разведения эффекторов для достижения соотношений эффектор: мишень (E:T) 5:1, 2,5:1, 1,25:1 и 0,625:1 (последовательные двукратные разведения). В 96-луночный планшет внесите в каждую лунку 100 мкл суспензии клеток-мишеней (10 000 клеток/лунку) и 100 мкл суспензии эффекторных клеток. Контрольные образцы: только клетки-мишени и только эффекторные клетки. Инкубируйте планшет 72 часа при 37°C.

5. Анализ результатов окрашивания и ко-культуры на CytoFLEX

По окончании инкубации (через 72 часа; если временные рамки не позволяют провести анализ в тот же день, ко-культуру можно анализировать позднее, но в тот же день после инкубации) соберите клетки из каждой лунки, осадите центрифугированием (400 g, 3 минуты). Промойте PBS, ресуспендируйте в PBS с DAPI (0,05 мкг/мл). Запустите образцы на цитометре CytoFLEX. Проведите гейтинг: Time vs. FSC, FSC vs. SSC, $DAPI^-$, затем определите фракцию CellTrace Red-положительных клеток (канал APC) — это живые клетки-мишени, и отдельно GFP-положительные клетки (CAR-T-эффекторы). Подсчитайте количество живых клеток-мишеней в лунках с ко-культурой и в контрольных лунках.

6. Просмотр результатов предыдущих цитотоксических экспериментов

Откройте ранее полученные FCS-файлы. Рассчитайте процент цитотоксичности (лизиса) по формуле:

% цитотоксичности = [1 – (количество живых мишеней в ко-культуре / количество живых мишеней в контроле)] × 100%.

Постройте график зависимости процента лизиса от соотношения E:T для CAR-T-клеток и для контроля UTD. Обсудите специфичность: лизис должен наблюдаться только в отношении CD19-положительных клеток-мишеней.

7. Анализ результатов

Проанализируйте динамику накопления CAR-позитивных Т-клеток: оцените зависимость процента GFP^+ клеток от множественности инфекции (MOI) и от времени культивирования. Охарактеризуйте влияние заморозки на жизнеспособность и экспрессию CAR.

Для цитотоксичности составьте таблицу процента лизиса для каждого соотношения E:T. Постройте калибровочный график зависимости % лизиса от E:T. Сравните полученные данные с литературными значениями (ожидается эффективность >50% при соотношении 5:1). При наличии данных об уровнях цитокинов обсудите потенциальные риски развития синдрома высвобождения цитокинов (CRS).

Таблица 2. Экспрессия CAR в PBMC

День/MOI	% GFP+ (CAR+)
День 6, MOI=10	~XX% (из данных)
День 11 до freezing, MOI=10	~YY%
После thawing, MOI=10	~ZZ%

Таблица 3. Цитотоксичность

E:T	% Лизиса CAR-T	% Лизиса UTD
5:1	XX	YY
2.5:1	ZZ	WW

Вопросы для самоконтроля:

1. В чем заключается принцип действия CAR по сравнению с TCR?
2. От каких параметров зависит аффинность CAR?
3. Почему CAR-T эффективны против B-клеточных раков, но не солидных опухолей?
4. Какие соединения добавляют для активации T-клеток in vitro?
5. Как зависит эффективность от костимулирующих доменов?
6. Для чего анализируют цитокины в крови пациента?
7. В чем заключается принцип вирусной трансдукции?
8. Зачем перед инфузией проводят лимфодеплецию?
9. Какие особенности CAR позволяют специфически распознавать опухоли?
10. Может ли CAR-T терапия применяться для других болезней? От чего это зависит?
11. Что будет, если не контролировать CRS?
12. Как интерпретировать снижение % CAR+ после разморозки?
13. Почему используют CellTrace Red и DAPI в ассэе?
14. Что показывает гейтинг в CytoFLEX?

Список литературы

1. Фрешни Р. Я. Культура животных клеток: практическое руководство / пер. с англ. — М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2010.
2. Федеральный закон от 05.07.1996 № 86-ФЗ «О государственном регулировании в области генно-инженерной деятельности» (в действующей редакции).
3. СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» (утв. постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 28.01.2021 № 4).
4. Akache B., Grimm D., Pandey K., Yant S. R., Xu H., Kay M. A. The 37/67-kilodalton laminin receptor is a receptor for adeno-associated virus serotypes 8, 2, 3, and 9 // J. Virol. 2006. Vol. 80, № 19. P. 9831–9836.
5. Aurnhammer C., Haase M., Muether N., et al. Universal real-time PCR for the detection and quantification of adeno-associated virus serotype 2-derived inverted terminal repeat sequences // Hum. Gene Ther. Methods. 2012. Vol. 23, № 1. P. 18–28.
6. Bartlett J. S., Wilcher R., Samulski R. J. Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors // J. Virol. 2000. Vol. 74, № 6. P. 2777–2785.
7. Berns K. I., Parrish C. R. Parvoviridae // Fields Virology / eds. D. M. Knipe, P. M. Howley. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013.
8. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 6th ed. Washington, DC: U.S. Department of Health and Human Services, CDC, NIH, 2020.
9. Colella P., Ronzitti G., Mingozzi F. Emerging issues in AAV-mediated in vivo gene therapy // Mol. Ther. Methods Clin. Dev. 2018. Vol. 8. P. 87–104.
10. Ellis B. L., Hirsch M. L., Barker J. C., et al. A survey of ex vivo/in vitro transduction efficiency of mammalian primary cells and cell lines with nine natural adeno-associated virus (AAV1-9) and one engineered adeno-associated virus serotype // Virol. J. 2013. Vol. 10. Art. 74.
11. Ferrari F. K., Samulski T., Shenk T., Samulski R. J. Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors // J. Virol. 1996. Vol. 70, № 5. P. 3227–3234.
12. Foust K. D., Nurre E., Montgomery C. L., et al. Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes // Nat. Biotechnol. 2009. Vol. 27, № 1. P. 59–65.
13. Gao G. P., Alvira M. R., Wang L., et al. Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. Vol. 99, № 18. P. 11854–11859.
14. Gao G., Vandenberghe L. H., Alvira M. R., et al. Clades of adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues // J. Virol. 2004. Vol. 78, № 12. P. 6381–6388.
15. Graham F. L., Smiley J., Russell W. C., Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5 // J. Gen. Virol. 1977. Vol. 36, № 1. P. 59–74.
16. Grieger J. C., Choi V. W., Samulski R. J. Production and characterization of adeno-associated viral vectors // Nat. Protoc. 2006. Vol. 1, № 3. P. 1412–1428.

17. Hinderer C., Katz N., Buza E. L., et al. Severe toxicity in nonhuman primates and piglets following high-dose intravenous administration of an adeno-associated virus vector expressing human SMN // Hum. Gene Ther. 2018. Vol. 29, № 3. P. 285–298.
18. Kuzmin D. A., Shutova M. V., Johnston N. R., et al. The clinical landscape for AAV gene therapies // Nat. Rev. Drug Discov. 2021. Vol. 20, № 3. P. 173–174.
19. Large E. E., Silveria M. A., Zane G. M., Weerakoon O., Chapman M. S. Adeno-associated virus (AAV) gene delivery: dissecting molecular interactions upon cell entry // Viruses. 2021. Vol. 13, № 7. Art. 1336.
20. McCarty D. M., Monahan P. E., Samulski R. J. Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis // Gene Ther. 2001. Vol. 8, № 16. P. 1248–1254.
21. Meier A. F., Fraefel C., Seyffert M. The interplay between adeno-associated virus and its helper viruses // Viruses. 2020. Vol. 12, № 6. Art. 662.
22. Mendell J. R., Al-Zaidy S., Shell R., et al. Single-dose gene-replacement therapy for spinal muscular atrophy // N. Engl. J. Med. 2017. Vol. 377, № 18. P. 1713–1722.
23. Mendell J. R., Al-Zaidy S. A., Rodino-Klapac L. R., et al. Current clinical applications of in vivo gene therapy with AAVs // Mol. Ther. 2021. Vol. 29, № 2. P. 464–488.
24. Mingozzi F., High K. A. Immune responses to AAV vectors: overcoming barriers to successful gene therapy // Blood. 2013. Vol. 122, № 1. P. 23–36.
25. Naso M. F., Tomkowicz B., Perry W. L. 3rd, Strohl W. R. Adeno-associated virus (AAV) as a vector for gene therapy // BioDrugs. 2017. Vol. 31, № 4. P. 317–334.
26. Nathwani A. C., Reiss U. M., Tuddenham E. G. D., et al. Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B // N. Engl. J. Med. 2014. Vol. 371, № 21. P. 1994–2004.
27. Nonnenmacher M., Weber T. Intracellular transport of recombinant adeno-associated virus vectors // Gene Ther. 2012. Vol. 19, № 6. P. 649–658.
28. Pillay S., Meyer N. L., Puschnik A. S., et al. An essential receptor for adeno-associated virus infection // Nature. 2016. Vol. 530, № 7588. P. 108–112.
29. Pillay S., Zou W., Cheng F., et al. Adeno-associated virus (AAV) serotypes have distinctive interactions with domains of the cellular AAV receptor // J. Virol. 2017. Vol. 91, № 18. Art. e00391-17.
30. Rabinowitz J. E., Rolling F., Li C., et al. Cross-packaging of a single adeno-associated virus (AAV) type 2 vector genome into multiple AAV serotypes enables transduction with broad specificity // J. Virol. 2002. Vol. 76, № 2. P. 791–801.
31. Russell S., Bennett J., Wellman J. A., et al. Efficacy and safety of voretigene neparvovec (AAV2-hRPE65v2) in patients with RPE65-mediated inherited retinal dystrophy: a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial // Lancet. 2017. Vol. 390, № 10097. P. 849–860.
32. Samulski R. J., Muzyczka N. AAV-mediated gene therapy for research and therapeutic applications // Annu. Rev. Virol. 2014. Vol. 1, № 1. P. 427–451.

33. Shen S., Bryant K. D., Brown S. M., Randell S. H., Asokan A. Terminal N-linked galactose is the primary receptor for adeno-associated virus 9 // J. Biol. Chem. 2011. Vol. 286, № 15. P. 13532–13540.
34. Sonntag F., Schmidt K., Kleinschmidt J. A. A viral assembly factor promotes AAV2 capsid formation in the nucleolus // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. Vol. 107, № 22. P. 10220–10225.
35. Srivastava A., Lusby E. W., Berns K. I. Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome // J. Virol. 1983. Vol. 45, № 2. P. 555–564.
36. Summerford C., Samulski R. J. Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions // J. Virol. 1998. Vol. 72, № 2. P. 1438–1445.
37. Thomas P., Smart T. G. HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins // J. Pharmacol. Toxicol. Methods. 2005. Vol. 51, № 3. P. 187–200.
38. Wang D., Tai P. W. L., Gao G. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery // Nat. Rev. Drug Discov. 2019. Vol. 18, № 5. P. 358–378.
39. Weber T. Anti-AAV antibodies in AAV gene therapy: current challenges and possible solutions // Front. Immunol. 2021. Vol. 12. Art. 658399.
40. Wu Z., Asokan A., Samulski R. J. Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy // Mol. Ther. 2006. Vol. 14, № 3. P. 316–327.
41. Wu Z., Miller E., Agbandje-McKenna M., Samulski R. J. α2,3 and α2,6 N-linked sialic acids facilitate efficient binding and transduction by adeno-associated virus types 1 and 6 // J. Virol. 2006. Vol. 80, № 18. P. 9093–9103.
42. Zengel J., Carette J. E. Structural and cellular biology of adeno-associated virus attachment and entry // Adv. Virus Res. 2020. Vol. 106. P. 39–84.
43. Zincarelli C., Soltys S., Rengo G., Rabinowitz J. E. Analysis of AAV serotypes 1–9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection // Mol. Ther. 2008. Vol. 16, № 6. P. 1073–1080.