

УДК 577.218

## РЕГУЛИРУЕМЫЕ СИСТЕМЫ ЭКСПРЕССИИ ДЛЯ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ

© 2013 г. А. В. Брутер\*, А. В. Авдеев, А. В. Белявский

*Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва 119991*

Поступила в редакцию 10.10.2012 г.

Принята к печати 10.01.2013 г.

Генная терапия – перспективное и быстро развивающееся направление современной медицины, призванное значительно улучшить состояние или даже полностью излечить больных, помочь которым существующие классические методы в достаточной степени не могут. Логика развития генной терапии в недалеком будущем потребует использования систем, в которых экспрессия терапевтических генов может регулироваться. Настоящий обзор посвящен критическому рассмотрению существующих регулируемых систем генной терапии, которые можно разделить на два основных класса. Первый класс образуют системы, в которых индукция экспрессии терапевтического гена происходит за счет внешнего, вводимого в организм, индуктора. Второй класс включает системы, основанные на принципе ауторегуляции и функционирующие без внешнего индуктора. Рассмотрены наиболее важные системы регуляции генной экспрессии первого класса, в том числе, основанные на регуляции тетрациклином, димеризации под действием рапамициновых производных, регуляции стероидными гормонами, регуляторных РНК и физических принципах, а также наиболее важные системы второго класса, регулируемые уровнем кислорода или глюкозы.

**Ключевые слова:** генная терапия, экспрессия генов, регулируемые системы, тетрациклин-зависимые системы, индукторы димеризации, рапамицин-зависимые системы, ядерные гормоны, индуцируемые гипоксией системы, регулируемые глюкозой системы.

**REGULATED EXPRESSION SYSTEMS FOR GENE THERAPY, by A. V. Bruter\*, A. V. Avdeev, A. V. Belyavsky (Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia); \*e-mail: aleabruter@gmail.com).** Gene therapy is a perspective and rapidly developing field of modern medicine, which is expected to improve state of or even cure patients that are not curable by classical methods of therapy. The logics of development of gene therapy in the near future will require the use of systems in which expression of therapeutic gene can be regulated. This review critically evaluates current regulated systems of gene therapy that can be divided into two major classes. The first class is formed by systems in which induction of therapeutic gene expression is effected by an external inducer introduced into an organism. The second class includes systems based on autoregulation principle that function without an external inducer. The review evaluates the most important systems of gene expression regulation belonging to the first class, namely systems based on tetracycline regulation, dimerization induced by rapamycin derivatives, regulation by steroid hormones, regulatory RNAs and physical principles. The most important systems of the second class that are regulated by oxygen or glucose levels are also discussed.

**Keywords:** gene therapy, gene expression, regulated systems, tetracycline-dependent systems, dimerization inducers, rapamycin-dependent systems, nuclear hormones, hypoxia-inducible systems, glucose-regulated systems, ribozyme, aptamer.

DOI: 10.7868/S0026898413030026

### ВВЕДЕНИЕ

Генная терапия – появившееся два десятилетия назад перспективное и быстро развивающееся направление современной медицины. Генотерапия открывает возможность разработки терапевтических систем, позволяющих значительно улучшить состояние или даже полностью излечить больных, помочь которым известные клас-

сические методы в достаточной степени не могут. В ряде клинических испытаний, проведенных за последнее десятилетие, были получены первые доказательства реальной эффективности генной терапии. Особенно значительными представляются успехи в случае моногенных наследственных заболеваний. Например, удалось восстановить иммунитет у больных несколькими видами врожденного иммунодефицита, введя им функциональную копию поврежденного гена [1, 2].

\* Эл. почта: aleabruter@gmail.com

Определенные успехи достигнуты в лечении больных амаврозом Лебера — слепотой, возникающей вскоре после рождения из-за гибели светочувствительных клеток [3]. Кроме медицинских перспектив, немаловажен также экономический аспект генной терапии. Длительность действия и активация синтетических и регенерационных возможностей самого организма позволит, как представляется в настоящее время, значительно снизить расходы на лекарственные средства и медицинское обслуживание больных, особенно старших возрастных групп.

Основное внимание в представленном обзоре будет уделено системам, функционирующие которых регулируется на уровне транскрипции терапевтических генов. Учитывая множественность уровней и способов регуляции работы белков, очевидно, что будут разработаны новые варианты систем генной терапии, работающие с другими уровнями регуляции. В настоящее время эти работы слишком немногочисленны и представляют собой скорее наброски будущих терапевтических стратегий.

Несмотря на то, что генотерапевтические подходы страдают в основном от недостаточной эффективности и/или кратковременности продукции терапевтических белков, остается мало сомнений в том, что в ближайшие годы эти проблемы будут успешно решаться. Исследователи и клиницисты встретятся тогда лицом к лицу с наиболее принципиальной особенностью генной терапии — пролонгированностью действия. Неконтролируемая продолжительная экспрессия терапевтических генов при этом может представлять собой значительную опасность. Например, бесконтрольная продукция фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF), часто применяемого в экспериментальной генной терапии сердечно-сосудистых заболеваний, может вызывать ряд негативных побочных эффектов, в том числе, повышение проницаемости сосудов, вплоть до кровотечения, и образование гемангиом [4, 5]. Более того, при постоянной продукции VEGF не происходит формирования зрелых, полностью функциональных сосудов [6].

В зависимости от патологии требования к регуляции работы конструкций могут сильно различаться. В случае наследственных заболеваний желательно, чтобы терапевтические конструкции работали как можно дольше — в идеале, в течение всей жизни. Регуляция экспрессии при таких ситуациях теоретически не требуется. Тем не менее, возможны случаи, когда уровни экспрессии терапевтических генов недостаточны или избыточны, поэтому даже при терапии наследственных заболеваний желательно иметь возможность корректировать уровни экспрессии. В других случаях необходимо, чтобы введенные конструкции работали ограниченное время — до излечения (например, при ишемических заболеваниях). Часто, например

при сахарном диабете, нужна быстрая реакция системы в ответ на изменения физиологического параметра, в данном случае уровня глюкозы в крови. Наконец, в некоторых ситуациях важно иметь возможность регулировать работу конструкции в ходе лечения или в связи с отклонением ситуации от стандартных сценариев.

Регулируемые системы генной терапии можно разделить на два основных класса. Первый класс образуют системы, в которых экспрессия терапевтического гена индуцируется внешним, вводимым в организм индуктором. Во второй класс входят системы без внешнего индуктора, основанные на принципе ауторегуляции. В них работа терапевтического гена определяется, прежде всего, физиологическим состоянием регулируемого процесса. Для больных, очевидно, более удобны системы второго типа, однако, вопрос сравнительной безопасности двух систем остается весьма непростым. С одной стороны, ауторегулируемые системы обеспечивают более тонкий и во многих случаях более оперативный контроль работы. В то же время, при их использовании затруднено вмешательство в работу системы и ее коррекция в тех случаях, когда это становится желательным.

В данном обзоре будут рассмотрены некоторые наиболее широко применяемые на сегодняшний день и наиболее близкие к применению в клинике системы контроля экспрессии — пять систем первого класса и две — второго, а также системы первого класса, основанные на физических принципах.

Надо отметить, что несмотря на многочисленные работы, выполненные с использованием различных лабораторных животных, ни одна система контроля экспрессии еще не находится на стадии клинических испытаний. Более того, опыты с использованием приматов, которые могли бы стать последним шагом на пути к клиническим испытаниям, до сих пор остаются единичными. Как правило, в них изучается поведение конструкций, несущих репортерный, а не терапевтический, ген. Таким образом, несмотря на многообещающие результаты, полученные при использовании более простых моделей, еще немало работы необходимо проделать до того, как системы контроля экспрессии начнут применяться на практике.

## СИСТЕМЫ ЭКСПРЕССИИ, РЕГУЛИРУЕМЫЕ ТЕТРАЦИКЛИНОМ

### *Принципы работы*

В основу данной системы положен транспозон Tn10 *Escherichia coli*, обеспечивающий устойчивость к антибиотику тетрациклину и его аналогам. В состав этого транспозона входят гены, кодирующие белок-репрессор TetR и ассоциированный с мембраной белок TetA, который и обеспечивает

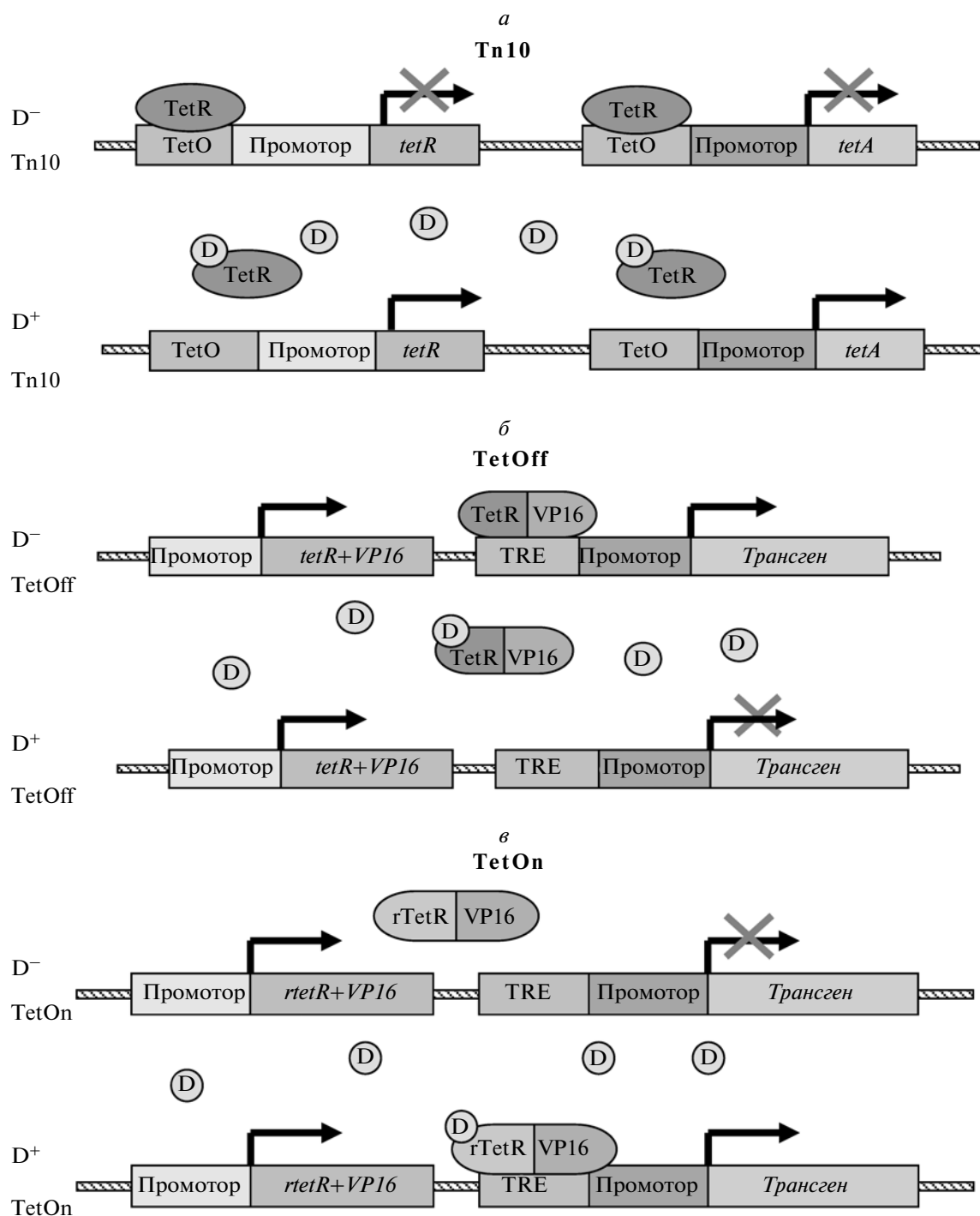
устойчивость к тетрациклину. В регуляторных областях этих генов локализованы операторы *tetO*. Связываясь с ними, TetR подавляет транскрипцию как *tetA*, так и *tetR*, регулируя таким образом устойчивость к тетрациклину по принципу отрицательной обратной связи (рис. 1а). При связывании с тетрациклином сродство TetR к *tetO* снижается, что вызывает дерепрессию *tetA* и самого *tetR* [7].

Поскольку логика транскрипционного контроля у прокариот и эукариот кардинально различается, описанную схему невозможно использовать в клетках эукариот. Изменив направление регуляции транспозона Tn10 на противоположное, в 1992 году создали первую систему тетрациклин-зависимой экспрессии генов в клетках эукариот [8]. В основу системы был положен вариант репрессора TetR, слитого с активационным доменом белка 16 вируса простого герпеса. Такой репрессор фактически действует как контролируемый тетрациклином трансактиватор (tTA). В отсутствие тетрациклина он способен активировать транскрипцию генов, находящихся под контролем базального промотора (предранний цитомегаловирусный промотор (CMV) и др.), соединенного с мультимерами (от 1 до 7) *tetO*. Простейшая тетрациклин-зависимая система регуляции экспрессии состоит при этом из двух транскрипционных единиц, одна из которых содержит ген трансактиватора под контролем конститутивно активного промотора, в то время как в состав второй входит регулируемый ген, контролируемый чувствительным к тетрациклину промотором (рис. 1б). Созданная система оказалась способной к плавной регуляции уровня экспрессии трансгена в зависимости от концентрации тетрациклина [8]. Эта система получила название Tet-Off, поскольку в присутствии тетрациклина уровень экспрессии падает; очевидно, она оптимальна в ситуациях, когда требуется длительная экспрессия трансгена, а тетрациклин применяется кратковременно. Длительное применение тетрациклина, очевидно, мало приемлемо, хотя бы потому, что тетрациклин имеет тенденцию накапливаться в костях, а его полное выведение из организма и, соответственно, “включение” регулируемого гена требуют длительного промежутка времени.

Впоследствии за счет введения четырех мутаций в ген, кодирующий репрессор TetR, была разработана система TetOn. Мутантный белок, в противоположность TetR, связывается с реагирующим на тетрациклин промотором только в присутствии тетрациклина. В слитом с VP16 варианте, названном rtTA, такой регулятор активирует транскрипцию под действием тетрациклина (рис. 1в) [9]. Недостатки первых вариантов трансактиватора rtTA – прежде всего низкая степень индукции и высокий базальный уровень экспрессии трансгена, были устранены введением дополнительных мутаций в TetR [10].

Поскольку оба трансактиватора представляют собой искусственные белки, новые для организма, при использовании *in vivo* они вызывают иммунный ответ. В целях снижения остроты проблемы фрагмент VP16 уменьшили до 12 аминокислотных остатков, что позволило снизить иммунную реакцию и избежать нежелательного взаимодействия трансактиватора с регуляторными белками хозяйского организма, хотя и не без падения активности [11]. Другой способ снизить иммунный ответ состоит в замене вирусного белка VP16 на клеточный полипептид. Одним из подходящих вариантов оказался домен KRAB, входящий в состав примерно трети белков с мотивом цинковых пальцев [12]. В отличие от VP16 домены KRAB не активируют, а подавляют транскрипцию [13]. В результате слияния TetR и домена KRAB получили трансингибитор tTS. В отсутствие тетрациклина tTS связывается с промотором, содержащим сайты связывания TetR, и подавляет транскрипцию гена, регулируемого этим промотором (рис. 1з). Данная система относится к классу TetOn [14]. Следует упомянуть, впрочем, что меры, направленные на снижение иммунного ответа против активационного домена, вряд ли способны решить проблему возникновения иммунного ответа против самого бактериального репрессора.

Одну из серьезных проблем регулируемых транскрипционных систем, в том числе и тетрациклинновой, представляет недостаточно низкий базальный уровень экспрессии регулируемого гена. Решить эту проблему попытались, объединив трансактиватор rtTA и трансингибитор tTS(KRAB) в одной экспрессионной кассете и разделив их сайтом IRES (internal ribosome entry site – внутренний участок посадки рибосомы) (рис. 1д) [15]. В такой системе значительно снижен уровень экспрессии трансгена в отсутствие активации, а уровень экспрессии при активации почти так же высок, как и в предшествующих системах [16]. Предложен и другой способ снижения базального уровня экспрессии регулируемого гена, а также иммунного ответа на трансактиватор [17], в котором использовали систему с положительной обратной связью, поместив под контроль промотора, индуцируемого тетрациклином, не только регулируемый ген, но и сам трансактиватор (рис. 1е). При использовании такой системы в отсутствие тетрациклина в клетке резко уменьшается концентрация трансактиватора, приводя к дополнительному снижению уровня транскрипции регулируемого гена. Предложенные системы, однако, не решают проблемы высокого базального уровня работы регулируемого промотора, вызванного расположением активных промоторов вблизи места интеграции терапевтической конструкции.



**Рис. 1.** Системы экспрессии, регулируемые тетрациклином. *a* – Бактериальный транспозон Tn10. Поступивший в клетку доксициклин (D) связывается с Tet-репрессором, вследствие чего репрессор теряет способность взаимодействовать с ДНК. Происходит активация гена, ответственного за устойчивость к доксициклину. *б* – Система TetOff контроля экспрессии у эукариот. В качестве фактора транскрипции используется химерный белок, состоящий из Tet-репрессора транспозона Tn10 и вирусного активатора транскрипции VP16. В присутствии доксициклина Tet-репрессор связывается с соответствующим фрагментом ДНК, а VP16 инициирует транскрипцию. При поступлении доксициклина в клетку Tet-репрессор теряет способность связываться с ДНК, и транскрипция не инициируется. *в* – Система TetOn. Получена мутированием трансактиватора, при этом принцип действия изменен на противоположный. *г* – Система Tet-KRAB. Получена заменой вирусного активатора транскрипции на эукариотический домен KRAB, репрессирующий транскрипцию; при отсутствии в клетке доксициклина трансингибитор Tet-KRAB связывается с ДНК, и транскрипция прекращается. *д* – Система TetOn + KRAB. Создана для снижения уровня экспрессии в “выключенном” состоянии, сочетает в себе химерный трансингибитор Tet + KRAB и химерный трансактиватор системы TetOn. *е* – Система с петлей положительной обратной связи. Создана для снижения уровня экспрессии в “выключенном” состоянии и риска иммунного ответа, что достигается индуцируемой в присутствии доксициклина экспрессией самого трансактиватора.

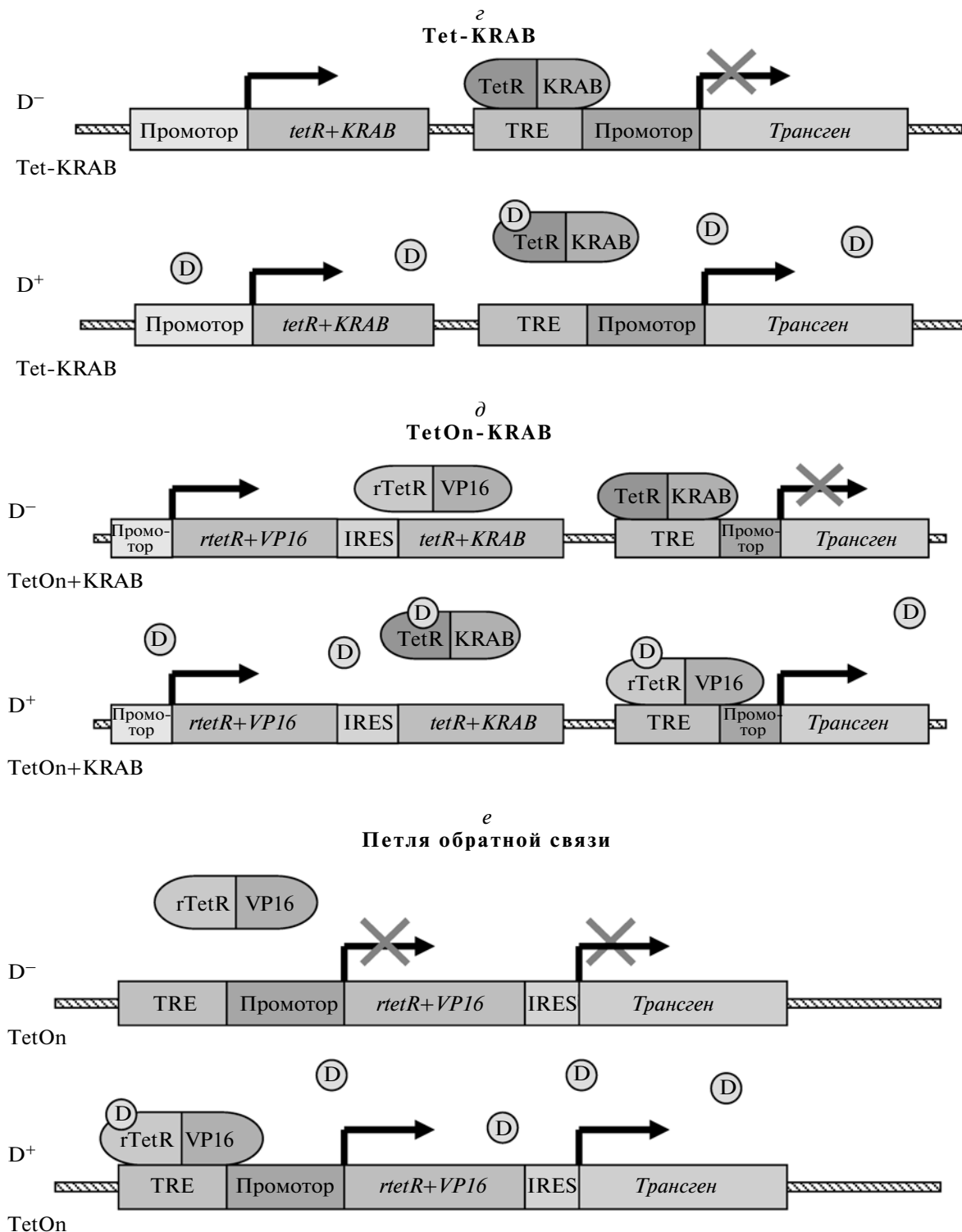


Рис. 1. Окончание.

**Эксперименты *in vivo*.**

**Применение в фундаментальных исследованиях**

Впервые трансгенных мышей с тетрациклиновым (TetOff) контролем экспрессии трансгена получили в 1994 году, при этом в качестве репор-

терных генов использовали гены люциферазы и β-галактозидазы. Различия в уровнях экспрессии трансгена в отсутствие тетрациклина и в его присутствии достигали в некоторых случаях нескольких тысяч раз [18]. Эффективность тетра-

циклин-зависимой системы экспрессии для получения новых экспериментальных данных впервые показали в 1996 году Мэйфорд (Mayford) и соавт. [19]. Они использовали трансгенных мышей, у которых конститутивно активная мутантная форма кальций/кальмодулин-зависимой протеинкиназы II (CaMKII) контролировалась специфичным для переднего мозга промотором с целью пространственного ограничения экспрессии и TetOff-системой для временного ограничения экспрессии. Оказалось, что наблюдаемые дефекты памяти обусловлены не нарушениями в развитии, а именно присутствием в клетках мозга мутантной формы CaMKII: нарушения памяти появлялись каждый раз при “включении” экспрессии и исчезали при “выключении”. Сходным образом тетрациклин-зависимые системы использовали, например, для выяснения механизмов прионных заболеваний [20] и болезни Гентингтона [21].

### *Применение в генной терапии*

На сегодняшний день опубликован целый ряд работ [6, 22–41], в которых изучается возможность применения тетрациклин-зависимых систем в генной терапии. Большинство из них выполнено на мышинных или крысиных моделях, хотя в некоторых случаях уже удалось перейти к исследованиям на приматах. До сих пор, однако, ни одна методика не получила разрешения на проведение клинических испытаний.

**Фундаментальные аспекты применения генотерапевтических Tet-регулируемых систем.** В одной из работ [22] мышам внутримышечно вводили аденоассоциированные вирусы, несущие репортерный ген эритропоэтина под контролем системы TetOn. При этом у мышей, в течение 1 нед получавших питьевую воду с доксициклином, уровень эритропоэтина в сыворотке крови увеличивался в 10 раз и возвращался к базальному через 2 нед после окончания приема доксициклина [22]. В другой работе [23] мышам внутримышечно вводили первичные миогенные клетки, зараженные ретровирусом, несущим ген эритропоэтина под контролем тетрациклин-зависимой системы. В такой системе синтез эритропоэтина удавалось “включать” и “выключать” с помощью доксициклина на протяжении 5 мес [23]. Результаты, полученные с использованием системы TetOn и аденоассоциированных вирусов, в опытах на обезьянах оказались гораздо менее радужными, поскольку регуляция синтеза эритропоэтина наблюдалась в течение не более двух–пяти циклов введения доксициклина. Непродолжительность регуляции была связана с возникновением клеточного и гуморального иммунных ответов на трансактиватор rtTA и элиминацией клеток, синтезирующих rtTA [24, 25]. Примечательно, что введение подобных же вирусов под сетчатку глаза не привело к развитию у обезьян иммунного ответа и

выработке антител к rtTA, что, очевидно, обусловлено иммунопривилегированным статусом глаза. В такой системе даже спустя 5 лет после введения rtTA сохранялась эффективная регуляция экспрессии под действием доксициклина [26]. В случае генной терапии других органов понадобятся менее иммуногенные конструкции, уже разработанные, но еще не прошедшие более ранних стадий исследования, например, конструкции, содержащие KRAB, вместо вирусного VP16, или конструкции, в которых синтез трансактиватора контролируется тетрациклином [14–16].

**Генная терапия аутоиммунных заболеваний.** Противовоспалительный цитокин интерлейкин-10 (IL-10), как показано на экспериментальных моделях, эффективен при генной терапии воспалительных процессов, однако его постоянная продукция может вызывать побочные эффекты. TetOn-систему использовали для регуляции синтеза IL-10 при проведении генной терапии ревматоидного артрита, вызванного иммунизацией мышей коллагеном. Показано, что при внутримышечной доставке векторов на основе аденоассоциированных вирусов, несущих терапевтический ген, вероятность развития артрита снижалась. В экспериментальной группе заболевание развилось у 30% животных против 89% — в контрольной. Тем не менее, в отсутствие доксициклина базальный уровень транскрипции терапевтического гена оставался слишком высоким [27]. Переход на комбинированную систему (rtTA + tTS) с использованием плазмидных векторов позволил значительно снизить фоновый синтез IL-10, при этом регуляция продукции IL-10 наблюдалась в течение 3 мес после введения конструкций. Отмечено также значительное улучшение состояния мышей с индуцированным артритом [28].

Систему TetOn, регулирующую продукцию IL-10, применяли при экспериментальном аутоиммунном увеите у крыс. После введения S-антигена крупного рогатого скота у крыс из контрольной группы развивались тяжелые формы увеита с практически полной потерей фоторецепторов, в то время как у крыс, которым вводили терапевтические конструкции, после индукции доксициклином развивались более легкие формы заболевания [29]. Описано успешное применение системы TetOn и гена *IL-10* в качестве терапевтического при генной терапии аутоиммунного дакриoadенита у кроликов [30].

**Генная терапия заболеваний центральной нервной системы.** Гены нейротрофических факторов часто выбирают в качестве терапевтических при разработке методов генной терапии нейродегенеративных заболеваний, включая болезни Альцгеймера, Паркинсона и Гентингтона. В мышинной модели болезни Альцгеймера использовали систему TetOff и ген *NGF*, кодирующий фактор роста нервов, в качестве терапевтического. Конструк-

цию, несущую ген *NGF*, доставляли при помощи ретровирусных векторов в фибробласты, которые затем имплантировали животным; в других опытах конструкцию доставляли непосредственно лентивирусами. Показано, что такая система обеспечивает регулируемую экспрессию на протяжении как минимум 3 мес. Анализ выживания холинергических нейронов показал положительный эффект такой терапии [31].

Продукция глиального нейротрофического фактора (GDNF) в головном мозге приводит к ослаблению симптомов болезни Паркинсона у крыс, однако сопровождается нежелательными побочными эффектами, например, снижением синтеза тирозингидроксилазы. Для регуляции продукции GDNF использовали систему TetOn, доставляемую в головной мозг при помощи лентивирусных векторов. Базальный уровень синтеза GDNF и степень индукции доксициклином зависели от вводимой дозы вирусов, при этом через 2 нед после прекращения приема доксициклина продукция GDNF прекращалась, а исходный уровень синтеза тирозингидроксилазы восстанавливался через 2–8 нед [32]. Базальный уровень GDNF снизили, используя описанную выше систему с положительной обратной связью, в результате чего удалось в 12 раз повысить индукцию экспрессии гена *GDNF* [33].

Регулируемую продукцию нейротрофических факторов использовали также в терапии механических повреждений нервной системы. Так, для регенерации аксонов после механического повреждения спинного мозга крысам имплантировали первичные фибробласты, в которые с помощью ретровирусной трансдукции вводили ген нейротрофического фактора головного мозга (BDNF) под контролем системы TetOn [34].

**Генная терапия сердечно-сосудистых заболеваний.** В генной терапии сердечно-сосудистых заболеваний, проводимой на животных, часто используют ангиогенные факторы: VEGF, основной фактор роста фибробластов (bFGF) и др. Результаты этих экспериментов были обнадеживающими, однако продолжительная продукция факторов роста вызывала ряд нежелательных побочных эффектов. Так, например, VEGF повышает проницаемость стенок сосудов, может вызывать кровотечение [4], и даже приводит к образованию гемангиом [5]. Вектор на основе аденоассоциированных вирусов, несущий ген *VEGF* под контролем системы TetOn, использовали для оптимизации вызванного VEGF неоангиогенеза у мышей [6]. Показано, что для формирования функциональных сосудов оптимальна продукция VEGF на протяжении 30 дней. При менее продолжительной (15 дней) продукции новообразовавшиеся сосуды деградировали, при длительной — были дефектными. В случае индуцированной ишемии конечности продукция VEGF приводила к более быстрому восстановлению ее функции, а гистологический анализ выявил

гораздо более обширные области некроза у мышей, не получавших доксициклина.

Аденоассоциированными вирусами, экспрессирующими ген *bFGF* под контролем системы TetOff, заражали мезенхимные стволовые клетки [35]. Модифицированные клетки трансплантировали животным с повреждениями костей черепа. В группе животных, не получавших доксициклин, ангиогенез и формирование костей были более выражены [35].

**Генная терапия онкологических заболеваний.** В генной терапии онкологических заболеваний чаще всего используются гены, кодирующие цитотоксичные белки, или гены, экспрессия которых делает клетки чувствительными к нужному лекарственному средству. В таких случаях особенно важно иметь возможность прекратить экспрессию терапевтических генов, например, после выздоровления. Одна из перспективных стратегий генной терапии онкологических заболеваний — экспрессия в опухолевых клетках гена тимидинкиназы вируса простого герпеса человека (HSV-1-ТК) в сочетании с введением в организм ганцикловира. Тимидинкиназа катализирует превращение безопасного ганцикловира в продукт, токсичный для клеток. В некоторых случаях вместе с геном тимидинкиназы используют и другие терапевтические гены, например, ген лиганда FMS-подобной тирозинкиназы 3 (Flt3L). Этот белок способен привлекать к месту своей продукции дендритные клетки, которые фагоцитируют остатки опухолевых клеток, усиливая иммунный ответ к ним. Хорошие результаты получены с помощью этого подхода в случае генотерапии глиобластомы у крыс [36]. Систему на основе аденоассоциированных векторов HSV-1-ТК/Flt3L использовали в генной терапии глиомы у собак. Применение системы TetOn позволило добиться высокого уровня экспрессии трансгенов и отсутствия побочных эффектов *in vivo* [37]. Еще один пример применения TetOn вместе с HSV-1-ТК — генная терапия рака молочной железы в мышинной модели [38, 39].

Другая стратегия связана со специфической продукцией в опухолевых клетках цитотоксических белков. С этой целью использовали проапоптотический ген *BAX* [40]. Высокий уровень селективности и регулируемости работы терапевтического гена обеспечивала система TetOff, в которой опухолевую специфичность продукции трансактиватора tTA обеспечивал промотор гена теломеразной обратной транскриптазы, активный во многих типах раковых клеток. Показана эффективность этой системы *in vivo*, отсутствие экспрессии регулируемого гена в нормальных клетках и возможность его регуляции доксициклином в опухолевых клетках [40].

Еще одна стратегия генной терапии онкологических заболеваний заключается в активации иммунного ответа на клетки опухоли. В опытах на

мышьях изучали влияние системы TetOn, несущей ген *IL-12*, на метастазирование опухоли прямой кишки в печень [41]. В этой системе доксициклин индуцировал экспрессию не только *IL-12*, но и *rtTA*, что приводило к дозозависимому росту уровня *IL-12*. Такая конструкция обеспечивала значительное снижение уровня метастазирования, а также активацию Т-клеток памяти.

## СИСТЕМЫ ЭКСПРЕССИИ, РЕГУЛИРУЕМЫЕ РАПАМИЦИНОМ И ЕГО ПРОИЗВОДНЫМИ

### *Принцип работы и устройство*

В основе этой системы лежит известная способность рапамицина, природного антибиотика из класса макролидов, связываться с клеточным белком FKBP12 и стимулировать взаимодействие последнего с белком FRAP, иначе называемым mTOR (mammalian target of rapamycin) — протеинкиназой, участвующей в регуляции целого ряда клеточных процессов. Рапамицин выступает как димеризатор FKBP12 и FRAP (рис. 2а). Первые регуляторные системы, разработанные на этой основе, состояли из ДНК-связывающего и активационного компонентов, способных к димеризации под действием рапамицина. В ДНК-связывающем компоненте три tandemных повтора FKBP12 были слиты с составным ДНК-связывающим доменом ZFHD1, который содержит фрагмент фактора транскрипции Zif268, соединенный с гомеодоменом фактора Oct-1, и обладает новой ДНК-связывающей специфичностью [42]. Активационным компонентом служил названный FRB (FKBP-rapamycin binding, FKBP-рапамицин-связывающий) домен FRAP/mTOR (89 аминокислотных остатков), слитый с С-концевым активационным доменом фактора NF-κB. Цис-регуляторный элемент включал в себя минимальный CMV-промотор, функцию энхансера при этом выполняли 12 tandemных повторов сайта связывания домена ZFHD1 (рис. 2б, в). Обнадеживающие результаты получены при тестировании этой системы *in vitro* и *in vivo*: уровень экспрессии репортерного гена в отсутствие рапамицина был крайне низким, уровень индукции после введения рапамицина достигал четырех порядков. Линейный дозозависимый эффект наблюдали в определенном диапазоне концентраций рапамицина [43].

Таким образом, рапамициновая система контроля экспрессии оказалась вполне эффективной, однако не без существенных недостатков. Белок FRAP/mTOR выполняет в клетке ряд фундаментальных функций, регулируя, прежде всего, клеточный цикл и пролиферацию, его ингибирование может приводить к нежелательным побочным эффектам. Так, например, широко известно, что рапамицин (также называемый сиролимусом) обладает иммуносупрессорным эффектом — он ча-

сто используется для предотвращения отторжения органов и тканей после трансплантации. Предотвратить взаимодействие системы индукции с иммунной системой удалось путем химической модификации рапамицина и подбора варианта FRAP таким образом, чтобы комплекс FKBP/лиганд связывался только с этим мутантным FRAP, но не с белком дикого типа.

Существенно улучшить систему регуляции транскрипции помогло использование химической димеризации [44, 45]. Получена мутантная (F36V) форма FKBP12, обладающая высоким сродством к модифицированным вариантам такролимуса (FK506), природного FKBP12-связывающего лиганда. Создана также серия димерных модифицированных лигандов, обладающих высоким и средним сродством к мутантному FKBP12, и низким — к природному белку, что позволило использовать мультимерный мутантный FKBP12 в качестве димеризационного домена как в ДНК-связывающем, так и в активационном компоненте. Интересно, что наиболее эффективная регуляция транскрипции в такой системе достигается с использованием лигандов, обладающих невысоким сродством, в то время как лиганды с высоким сродством неэффективны [44, 45].

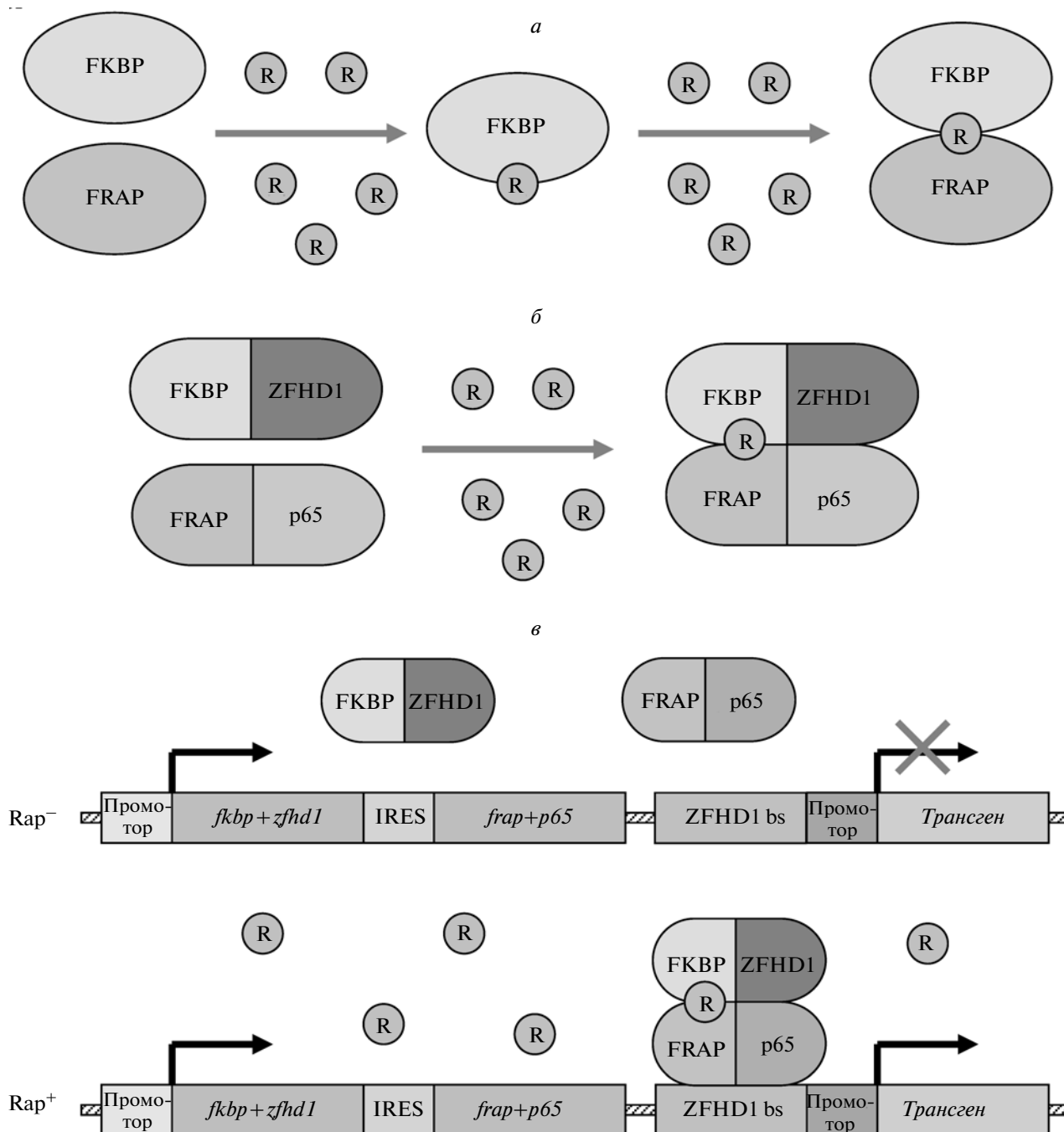
### *Эксперименты in vivo.*

#### *Применение в генной терапии*

**Исследования на приматах с использованием репортерных генов.** В различных тканях приматов изучали экспрессию гена эритропоэтина, выполнявшего функцию репортерного, под контролем рапамициновой системы. Макакам-резус ввели вспомогательные аденоассоциированные вирусы, экспрессирующие регуляторные компоненты системы, и вирусы, несущие регулируемый ген эритропоэтина, в соотношении 1 : 10. Значительное увеличение уровня эритропоэтина и рост гематокрита отмечали лишь в ходе двух первых раундов индукции рапамицином, что, скорее всего, определялось постепенным падением уровня регуляторных компонентов системы ниже порогового [46]. В 2004 году та же группа авторов сообщила о продолжительной (до 6 лет) регулируемой экспрессии введенного внутримышечно макакам-резус гена эритропоэтина под контролем рапамициновой системы [47]. Успех этой работы предположительно определялся повышенным уровнем экспрессии регуляторных компонентов системы оптимизированными векторами второго поколения. Использование нового синтетического аналога рапамицина, AP2259, который обладал сходной с рапамицином способностью активировать транскрипцию гена эритропоэтина, имея при этом в 100 раз более низкую иммуносупрессорную активность, позволило еженедельно вводить индуктор, что привело к стабилизации уровня эритропоэтина в крови [47].

Рапамициновую систему контроля экспрессии применили в генной терапии заболеваний сетчат-





**Рис. 2.** Системы экспрессии, регулируемые рапамицином (R). Добавление рапамицина индуцирует димеризацию как естественных FKBP и FRAP (а), так и генноинженерных FKBP + ZFHD1 и FRAP + p65 (б). в – Схема генетической конструкции для рапамицинового контроля экспрессии трансгена. Конструкция состоит из двух экспрессионных кассет. Одна из них содержит под контролем конститутивного промотора гены, кодирующие химерные белки, димеризация которых приводит к запуску транскрипции во второй экспрессионной кассете, содержащей в промоторной области сайт связывания ZFHD1 и трансген.

ки. Вирусные частицы вводили макакам-резус локально. После введения рапамицина высокая дозозависимая индукция синтеза эритропоэтина в сетчатке наблюдалась даже через 100 дней. Кроме того, в отсутствие рапамицина уровень эритропоэтина оказался пренебрежимо низким. При этом

уровень эритропоэтина в сыворотке крови изменялся минимально, а гематокрит не изменялся вообще, что указывает на относительную безопасность такой системы [48].

**Генная терапия онкологических заболеваний.** Одна из стратегий генной терапии опухолей, состоя-

щая в использовании онколитических вирусов, селективно поражающих раковые клетки, была реализована с помощью рапамициновой системы контроля экспрессии на основе бинарной аденовирусной системы, в которой вспомогательный вектор содержал регуляторные компоненты, а основной — ген белка E1, необходимого для репликации вируса. Эффективное функционирование такой системы показано как в опытах на опухолевых клетках нескольких типов (HT1080, Mel17), так и в опытах *in vivo* с подкожным введением клеток HT1080 мышам с иммунодефицитом. Максимальное количество аденовирусной ДНК выявлено в опухолях, в которые аденовирусную систему вводили вместе с аналогом рапамицина (AP21967). В этом случае количество аденовирусной ДНК было в 6 раз больше, чем при применении только аденовируса [49].

Использование рапамициновой системы в терапии опухолей особенно перспективно с учетом того, что рапамицин обладает ингибирующим действием на рост многих опухолей [50]. Вспомогательный вектор бинарной аденовирусной системы кодировал одновременно ДНК-связывающий и активирующий домены, при этом вектор с двумя противоположно направленными транскрипционными единицами обеспечивал значительно более высокий уровень регулируемой экспрессии, чем вектор, содержащий IRES-элемент вируса энцефаломиокардита. В качестве терапевтических генов использовали гены ингибиторов ангиогенеза — ангиостатина и растворимого рецептора sVEGFR1/R2. Последний белок, как отмечали и ранее [51, 52], обладал более выраженными антиангиогенными свойствами. На мышинной модели глиобластомы 4C8, имплантированной под кожу, показано, что и сам рапамицин существенно замедлял рост опухоли. Введение вместе с рапамицином бинарной системы, экспрессирующей sVEGFR1/R2, значительно усиливало противоопухолевый эффект. Сходные результаты получены в опытах с клетками глиобластомы U-251 человека, трансплантированными под кожу мышам с иммунодефицитом NCR-Nu, хотя эффект самого рапамицина на рост опухоли был менее выражен [52].

**Генная терапия заболеваний центральной нервной системы.** На модели болезни Паркинсона у обезьян показано, что использование конститутивной экспрессии гена декарбоксилазы ароматических

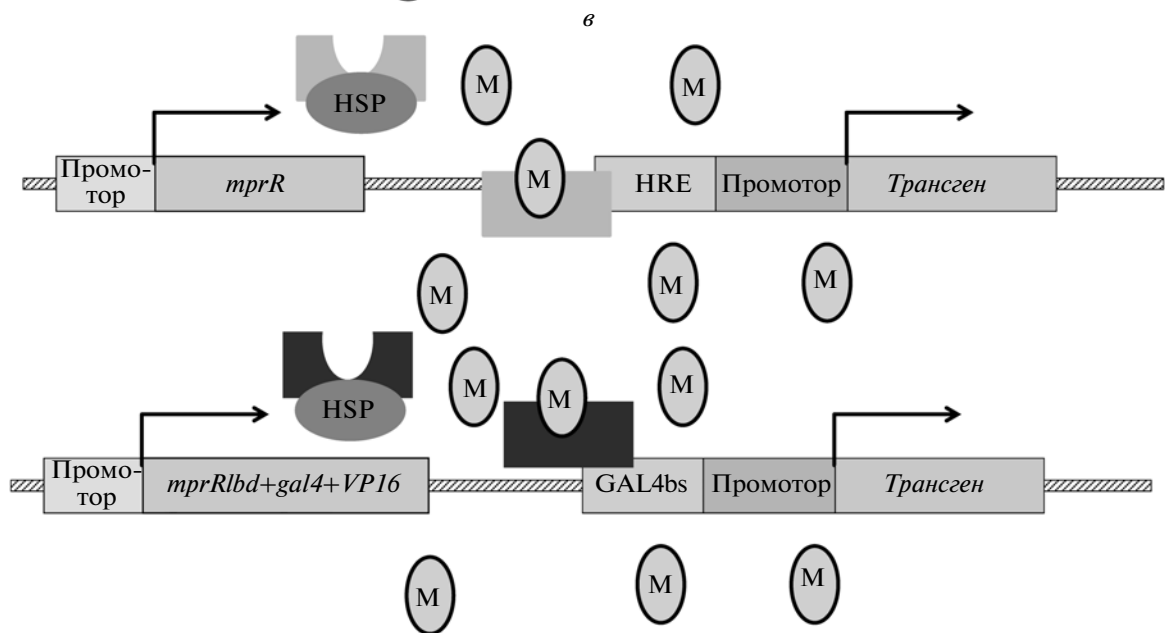
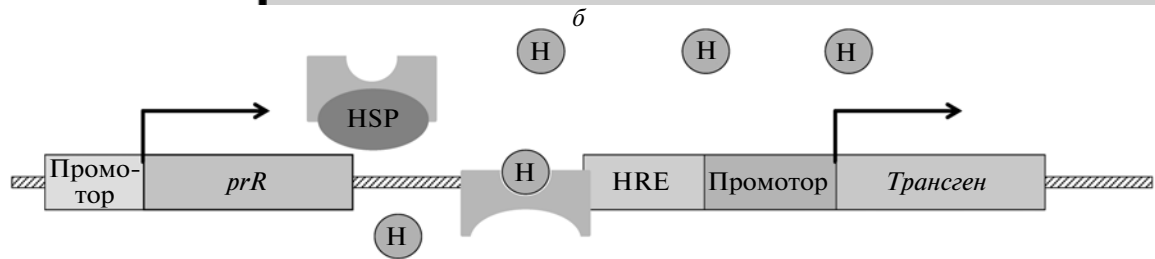
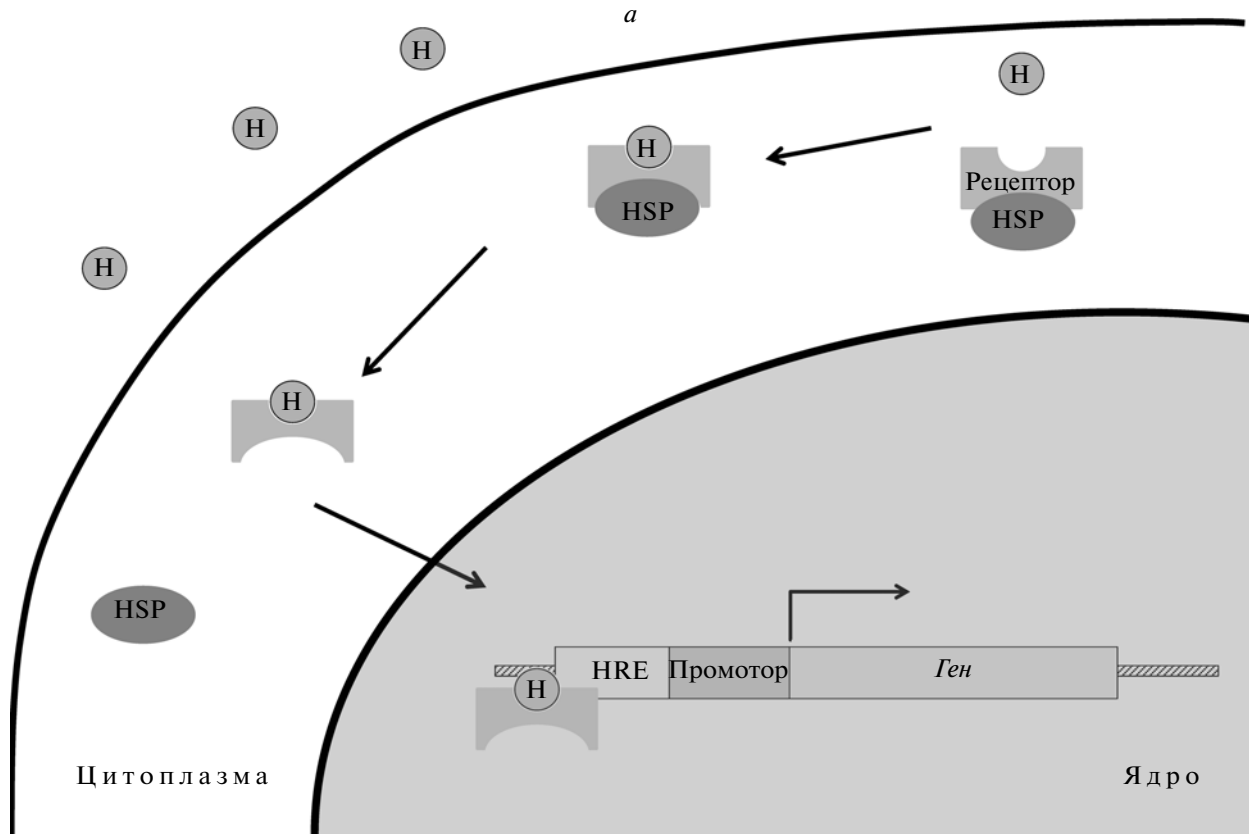
L-аминокислот (AADC) в полосатом теле головного мозга в комбинации с приемом дигидроксифенилаланина (ДОФА) позволяет существенно снизить дозы ДОФА, необходимые для достижения терапевтического эффекта [53]. Аналогичную схему терапии применяли на крысах, но в этом случае использовали регулируемую рапамицином экспрессию AADC. Вспомогательные аденовирусы, продуцирующие регуляторные факторы, и терапевтические вирусы, регулируемые индуцибельным промотором, вводили в головной мозг крыс, у которых дофаминергические нейроны были повреждены 6-гидроксидофамином. Через 3 нед после трехкратного введения рапамицина при помощи поведенческих тестов оценивали реакцию организма на ДОФА. Оказалось, что у крыс, которым вводили и терапевтические векторы, и рапамицин, нормализация поведения обеспечивалась применением ДОФА в низких (нетерапевтических) дозах [54].

## СИСТЕМЫ ЭКСПРЕССИИ, РЕГУЛИРУЕМЫЕ ЯДЕРНЫМИ ГОРМОНАМИ

### *Принцип работы и устройство*

Стероидные гормоны и их рецепторы играют важную роль в регуляции транскрипции генов млекопитающих, и располагаются они, как правило, в цитоплазме или на цитоплазматической мембране. Рецепторы стероидных гормонов содержат ДНК-связывающий домен и обладают активностью факторов транскрипции, однако в отсутствие гормона они находятся в цитоплазме, поскольку образуют комплекс с белком теплового шока, который и удерживает рецептор в цитоплазме. Стероидные гормоны способны проникать через клеточную мембрану в цитоплазму клетки, где связываются с рецептором и высвобождают его из комплекса с белком теплового шока, что приводит к перемещению рецептора в ядро. Участок ДНК, узнаваемый рецептором, находится в регуляторных областях генов, регулируемых гормоном, поэтому называется реагирующим на гормон элементом (hormone-responsive element, HRE) (рис. 3а) [55]. Стероидные гормоны и их рецепторы представляют интерес для регуляции экспрессии генов, особенно терапевтических, т.е. вводимых в организм при генной терапии. До-

**Рис. 3.** Системы экспрессии, регулируемые ядерными гормонами (Н). *а* — Схема проведения сигнала в клетке ядерными гормонами. Попадая в клетку, гормон связывается с находящимся в цитоплазме рецептором. Это приводит к отделению от рецептора удерживающих его в цитоплазме белков теплового шока, после чего рецептор направляется в ядро, где, связавшись со специфичным участком ДНК, инициирует транскрипцию. *б* — Базовая система контроля экспрессии, основанная на прогестероне. Одна экспрессионная кассета содержит ген рецептора прогестерона (*prR*) под контролем конститутивного промотора. Другая кассета несет трансген под контролем реагирующего на гормон промотора. *в* — Система контроля, основанная на мифепристоне (М). Прогестерон утратил способность связываться с мутированными рецепторами, а нужные для индукции дозы мифепристана достаточно малы и не влияют значительно на процессы, происходящие в организме. *mprR* — ген рецептора мифепристана. *г* — Встраивание в систему элементов системы транскрипции GAL4/UAS дрожжей и вирусного активатора транскрипции VP16 позволяет дополнительно снизить дозу индуктора, необходимую для экспрессии трансгена. GAL4bs — сайт связывания GAL4; *mprRlbd* — лиганд-связывающий домен рецептора мифепристана.



полнительную привлекательность придает им способность проникать сквозь гематоэнцефалический барьер. В состав бинарной системы регуляции с помощью гормонов входит вспомогательный компонент, экспрессирующий ген рецептора, и терапевтический компонент, содержащий трансген под контролем HRE (рис. 3б). Подобная система регуляции не содержит чужеродных белков, поэтому она не вызывает иммунной реакции, что делает ее особенно привлекательной в тех случаях, когда требуется длительная экспрессия. У этой системы в ее изначальном виде есть, однако, два существенных недостатка. Во-первых, введение стероидных гормонов с целью регуляции трансгена влияет на экспрессию не только самого трансгена, но и мишеней данного гормона в организме. Во-вторых, естественные колебания в содержании соответствующего гормона будут приводить к незапланированным изменениям уровня экспрессии трансгена [56].

В течение последних двух десятилетий предложено несколько стратегий, позволяющих преодолеть эти сложности. Установлено [57], что рецептор прогестерона с делецией С-концевого домена перестает связывать прогестерон, но приобретает способность быть активированным мифепристомом — синтетическим аналогом и антагонистом прогестерона (он же RU486). Несколько точечных мутаций в рецепторе эстрогенов мышей приводят к тому, что рецептор не может связывать эстроген, но может связывать антиэстроген (4-ОН-тамоксифен) и запускать тот же сигнальный каскад (рис. 3в) [58]. В такой системе исключено влияние эндогенных гормонов на экспрессию регулируемого трансгена, однако остается проблема воздействия 4-ОН-тамоксифена как антагониста прогестерона на физиологические процессы в организме. Частично эту проблему удалось решить, существенно снизив дозу, необходимую для индукции экспрессии, с помощью химерного трансактиватора, состоящего из лиганд-связывающего домена рецептора прогестерона, ДНК-связывающего домена GAL4 и вирусного активатора транскрипции VP16. При этом элемент HRE в регуляторной области трансгена заменяли на последовательность, связывающую GAL4 (рис. 3г) [59]. Вероятно, впрочем, что данная система, включающая дрожжевой (GAL4) и вирусный (VP16) белки, способна вызывать иммунный ответ в организме.

Другая стратегия, позволяющая избежать взаимного влияния процессов, происходящих в организме, и системы регуляции экспрессии трансгена, заключается в использовании пар лиганд-рецептор, принадлежащих другим видам. Так, например, у *Drosophila melanogaster* метаморфозом управляет гормон экдизон. Этот гормон связывается со своим рецептором (EcR), который, формируя гетеродимер с USP (ultraspiracle protein), инициирует транскрипцию генов, содержащих определенную регуляторную последователь-

ность. Помимо экдизона с его рецептором могут связываться стероиды растительного происхождения — муристерон А и понастерон А, а также некоторые нестероидные лиганды [60]. Таким образом, регуляторный компонент бинарной системы регуляции должен включать экспрессионные единицы EcR и USP, а регулируемый компонент — сайт связывания EcR в регуляторной области трансгена. В первоначальном виде такая система обеспечивала лишь трехкратную индукцию регулируемого гена [61]. Более чем двухсоткратную степень индукции удалось получить, заменив N-концевой участок EcR активационным доменом VP16, а USP — его гомологом у млекопитающих — ретиноидным рецептором X (RXR). Модифицированный рецептор имел также измененный сайт узнавания [62]. Сходную степень индукции обеспечивала альтернативная система, в которой трансактиватор VP16 был слит с RXR, а EcR — с GAL4, при этом в регуляторную область экспрессируемого гена был встроены пентамер сайта связывания GAL4 [63].

Недавно была разработана, по-видимому, еще более безопасная система контроля экспрессии. В качестве лиганд-связывающего домена в этой системе используется бензоатный X-рецептор  $\beta$  лягушки *Xenopus laevis*, а ДНК-связывающий домен состоит из нескольких цинковых пальцев, специфически узнающих определенные триплеты нуклеотидов. Лиганды этого рецептора — этил-4-гидроксibenzoат и пропил-4-гидроксibenzoат — уже многие годы используются в качестве консервантов, их безопасность и отсутствие побочных эффектов можно считать доказанными [64]. Следует, однако, подчеркнуть, что повышенная безопасность систем с использованием рецепторов дрозофилы и лягушки имеет обратную сторону, поскольку, вероятно, будет сопровождаться иммунным ответом организма против чужеродных белков.

### *Эксперименты in vivo. Применение в генной терапии*

**Генная терапия онкологических заболеваний.** Регуляцию стероидными гормонами использовали для создания онколитического вируса, который реплицируется в присутствии тамоксифена. С этой целью использовали мутантный вариант гормон-связывающего домена [58] и тамоксифен для индукции. Реагирующие на эстроген элементы помещали в регуляторную область вирусного белка E1A, участвующего в репликации вируса. Противоопухолевую эффективность онколитических вирусов изучали на модели клеток H441, ксено-трансплантированных мышам с иммунодефицитом. Клетки предварительно заражали тестируемыми конструкциями, а введение тамоксифена приводило к 30-кратной индукции репликации вирусов и значительному замедлению роста опухоли *in vivo* [65].

## СИСТЕМЫ АУТОРЕГУЛЯЦИИ

### *Системы, регулируемые уровнем кислорода*

**Принцип работы и устройство.** Известно, что при некоторых патологиях в отдельных клетках, тканях или во всем организме снижается содержание кислорода, т.е. развивается гипоксия. Так, например, при сердечно-сосудистых заболеваниях недостаточное поступление кислорода может не только нарушать функции тканей, но даже приводить к их необратимым повреждениям. В опухолях из-за их быстрого роста, не сопровождающегося адекватным образованием сосудов, также зачастую развивается гипоксия [66, 67]. Животные, особенно позвоночные, в ходе эволюции выработали клеточные, тканевые и организменные адаптивные реакции на гипоксический стресс [68, 69]. К настоящему времени молекулярные механизмы этих реакций и генные ансамбли, участвующие в них, в значительной мере изучены. В промоторных областях генов, индуцируемых при гипоксии, находятся так называемые HRE-мотивы (hypoxia response elements, не путать с описанными выше hormone-responsive elements, которые также обозначают как HRE), содержащие сайты (A/G)CGTG, узнаваемые фактором транскрипции HIF-1 [70, 71] (hypoxia inducible factor 1), гетеродимерным белком, состоящим из субъединиц HIF-1 $\alpha$  и HIF-1 $\beta$  (ARNT). Ответ на гипоксию обеспечивается субъединицей HIF-1 $\alpha$ , весьма нестабильной при нормальном уровне кислорода (период полужизни около 10 мин) [72]. На C-концевом участке HIF-1 $\alpha$  расположен домен ODD (домен, вызывающий деградацию в присутствии кислорода), с которым связывается убиквитин-лигаза VHL (von Hippel-Lindau), способствующая протеасомной деградации HIF-1 $\alpha$  путем убиквитинирования [73]. Взаимодействие ODD и VHL обеспечивается гидроксированием двух остатков пролина в составе ODD, которое катализируется пролилгидроксилазами, используемыми в качестве субстрата молекулярный кислород [74, 75]. При недостатке кислорода замедление гидроксирования остатков пролина снижает взаимодействие с VHL и, соответственно, деградацию HIF-1 $\alpha$ . В результате стабилизации HIF-1 $\alpha$  концентрация активного HIF-1 повышается, индуцируя транскрипцию генов-мишеней (рис. 4).

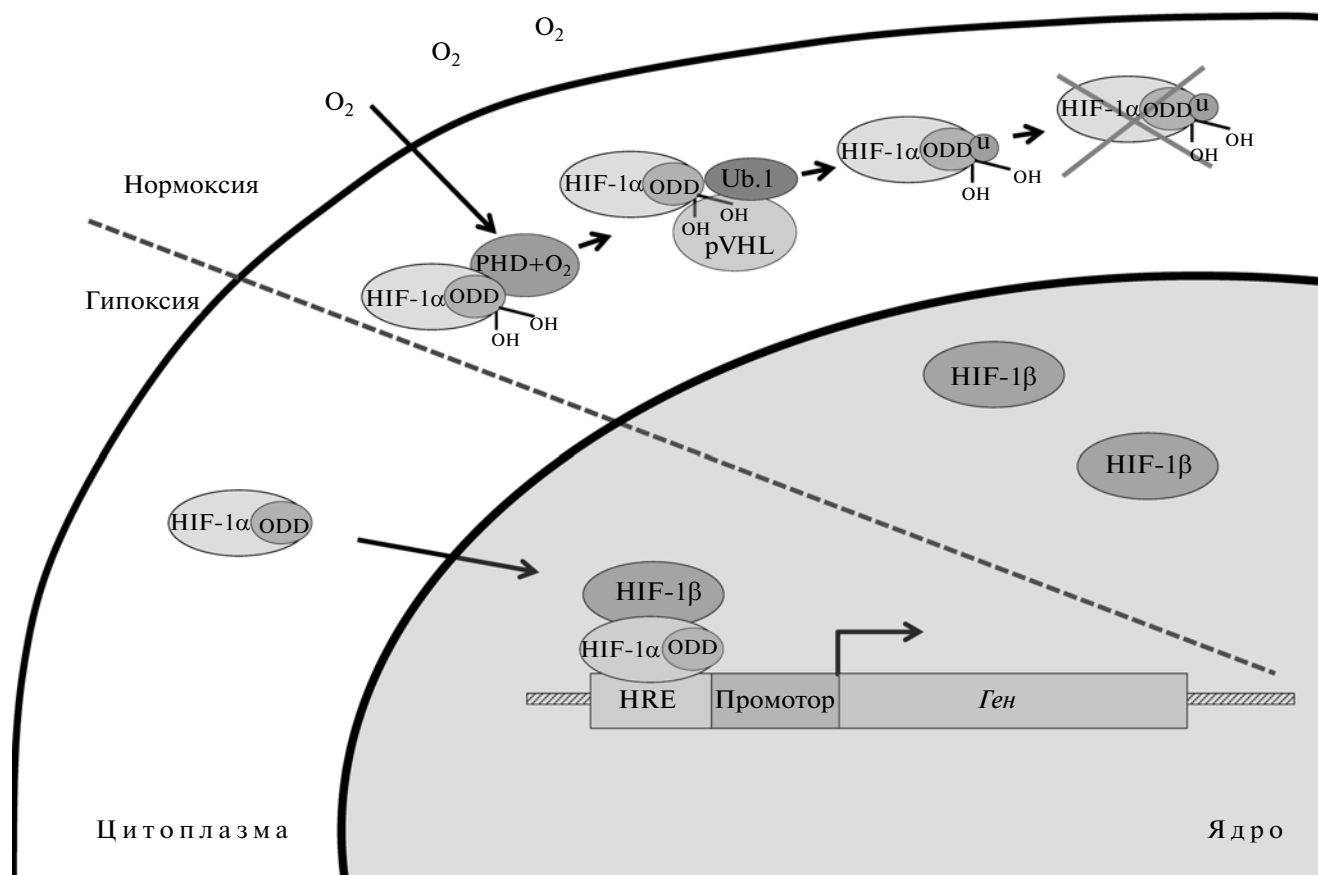
Описанный сигнальный каскад использовали для создания систем регуляции экспрессии, зависящих от уровня кислорода. В настоящее время в основном используется транскрипционная стратегия регуляции, реализуемая путем введения в промоторные области мультимеров HRE, что делает транскрипцию трансгена индуцируемой в условиях гипоксии. Впервые подобную систему создали в 1997 г. на основе HRE фосфоглицираткиназы 1 (PGK 1) и минимального промотора SV40. Систему тестировали на клетках фибросаркомы и показали, что она достаточна для индук-

ции экспрессии трансгена при гипоксии [76]. Во второй, менее распространенной, стратегии экспрессия регулируется на посттрансляционном уровне за счет слияния регулируемого белка с ODD. При этом слитый белок, подобно HIF-1 $\alpha$ , оказывается стабильным только в условиях гипоксии [77]. Третья стратегия, посттранскрипционная, основана на обнаружении в 3'-нетранслируемых областях мРНК генов, отвечающих на гипоксию, участков, которые влияют на стабильность мРНК при изменении концентрации кислорода. В этих областях, как правило, находят AU-богатые участки, способствующие быстрой деградации несущих их РНК. Нейтрализация действия этих участков при гипоксии происходит за счет РНК-белковых взаимодействий и сопровождается стабилизацией РНК и повышением уровня соответствующих белков. Подобный механизм существует, в частности, у тирозингидроксилазы [78] и VEGF [79]. В основанных на этом принципе работах по регулируемой генной терапии использовали 3'-нетранслируемые области генов *VEGF* и эритропоэтина [80–82]. Повышение степени индукции регулируемого гена при гипоксии в таких системах может, однако, сопровождаться снижением максимального уровня экспрессии из-за присутствия вышеупомянутых дестабилизирующих участков.

### *Применение в генной терапии*

**Генная терапия онкологических заболеваний.** Гипоксия, возникающая в быстрорастущих опухолях, дает возможность разработки стратегий специфичной противоопухолевой генной терапии. Во многих подходах используется присутствие в опухолевых клетках ферментов, способных катализировать превращение неактивных нетоксичных соединений в цитотоксические, т.е. так называемая суицидная генная терапия. В частности, проверена пригодность разных вариантов индуцируемых гипоксией конструкций для суицидной генной терапии рака яичника. Наибольшей эффективностью в эксперимента обладали конструкции, содержащие минимальный CMV-промотор, соединенный с пентамером HRE гена *VEGF*. При этом система, в которой для превращения неактивной формы препарата CB1954 в цитотоксическую используется ген нитратредуктазы, показала лучшие результаты, чем сходная система, содержащая ген тимидинкиназы и ганцикловир. Обнаружено снижение скорости роста имплантированных опухолей у мышей, а также высокая корреляция в локализации областей экспрессии трансгенов и гипоксии [83].

На основе HRE-элемента *PGK1* получили чувствительный к гипоксии аденовирусный вектор, содержащий промотор, названный OBHRE [84]. В культуре клеток при наступлении гипоксии OBHRE обеспечивал 100-кратную индукцию и высокий уровень экспрессии. *In vivo* уровень



**Рис. 4.** Схема зависимой от концентрации кислорода регуляции экспрессии. При нормоксии цитоплазматическая субъединица HIF-1α фактора транскрипции HIF-1 убитинируется и подвергается быстрой деградации в протеасомах. При гипоксии она стабилизируется и проникает в ядро, где вместе с ядерной субъединицей HIF-1β образует димерный фактор, связывающийся со специфическими сайтами узнавания ДНК. Ub.1 – убитинлигаза. U – убитин.

экспрессии генов, регулируемых промотором OBHRE, сравнивали с уровнем экспрессии генов под контролем конститутивного CMV-промотора в опухолях, а также в печени, почках и легких. Оказалось, что в опухоли промотор OBHRE обеспечивал примерно такой же уровень экспрессии, как и CMV-промотор. В остальных тканях активность CMV-промотора была на три порядка выше. В терапии опухолей использовали системы суицидной генной терапии с применением пар тимидинкиназа/ганцикловир или цитохром P450(CYP2B6)/циклофосфамид [84]. В этих условиях промоторы OBHRE и сильный CMV-промотор обеспечивали сходное снижение темпов роста опухолей. В то же время побочные эффекты были менее выражены, например, отсутствовала обусловленная гепатотропизмом аденовирусов гепатотоксичность, наблюдаемая при использовании CMV-промотора [85]. Для усиления терапевтического эффекта генную терапию совместили с клеточной. Аденовирусами, несущими систему CYP2B6 под контролем OBHRE, заражали макрофаги, способные

не только проникать внутрь опухоли, но и оказывать противоопухолевый эффект. Инъекции циклофосфамида позволили увеличить продолжительность жизни мышей экспериментальной группы с трансплантированными опухолями [86].

Разрабатывается и другой способ использования гипоксии в терапии опухолей с помощью онколитических аденовирусов. На основе гексамера HRE-элемента гена *VEGF* [87] создан индуцируемый гипоксией промотор, под контроль которого поместили ген вирусного белка E1A, необходимого для репликации вирусов. Вследствие этого аденовирусы реплицировались только в клетках, находящихся в условиях гипоксии и содержащих активный HIF-1, что приводило к клеточной гибели [88]. Инъекции вирусов в уже сформированные опухоли значительно снижали скорость роста опухолей у мышей [89]. Применение двунаправленного промотора, активируемого гипоксией, позволило в дальнейшем экспрессировать также ген интерлейкина-4 и добиться дополнительного увеличения терапевтического эффекта онколитических вирусов [90]. Недавно при помощи оптими-

зации активируемого гипоксией промотора и введения ранее отсутствовавшей аденовирусной области *E3* создано второе поколение онколитических вирусов этого типа. Эти модификации позволили значительно повысить репликацию аденовирусов в условиях гипоксии и их противоопухолевый эффект [91]. Использование онколитических вирусов такого класса представляется весьма перспективным, так как они могут действовать на опухоли самой разной этиологии, а также на метастазирующие опухоли.

**Генная терапия сердечно-сосудистых заболеваний.** Впервые попытку создания вектора для индуцируемой гипоксией экспрессии генов в миокарде предприняли в 2002 году. Этот вектор на основе аденоассоциированного вируса содержал промотор, состоящий из нонамера HRE гена эритропоэтина, минимального промотора SV40 и гена *VEGF* в качестве терапевтического. После прямой инъекции вирусов в ишемизированный миокард крыс синтез *VEGF* в нем возрастал в 20 раз по сравнению с контрольной группой [92].

Системное введение генотерапевтических векторов во многих случаях предпочтительнее локального, поэтому сконструировали пригодный для системного введения индуцируемый гипоксией вектор, предназначенный для генной терапии ишемической болезни сердца. С этой целью использовали укороченный вариант промотора гена легкой цепи миозина желудочкового типа (*MLC2v*), соединенный с содержащим HRE фрагментом промотора гена енолазы-1. Хотя введенные конструкции и обнаруживались во многих органах, репортерный ген экспрессировался только в сердце. Использование такого варианта промотора *MLC2v* приводило, однако, к слишком высокому базальному уровню экспрессии трансгена. Четырехкратную индукцию уровня экспрессии репортерного гена при гипоксии удалось наблюдать, только вводя одновременно плазмиду, дополнительно экспрессирующую ген *HIF-1 $\alpha$*  [93].

На основе аденоассоциированного вируса создан вектор, экспрессирующий терапевтический ген *VEGF* под контролем промотора *MLC2v* и нонамера HRE. Этот вектор вводили непосредственно в миокард мыши. Благодаря промотору *MLC2v* продукцию *VEGF* наблюдали только в сердце, однако уровень индукции при гипоксии был низким и не превышал 74% [94].

В 2002 году описали новый ген *RTP801*, индуцируемый гипоксией [95]. Экспрессия этого гена возрастала в 14 раз за 4 ч экспозиции при гипоксии и в 37 раз за 16 ч, что в несколько раз превышало аналогичные показатели для гена *VEGF*. В дальнейшем показали, что свой вклад в индукцию вносят как сайты связывания HIF1, находящиеся в промоторе, так и сайты связывания фактора Sp1. Многообещающие результаты получены при использовании плазмидной конструкции с этим промотором в

опытах *in vitro* на клеточных линиях [96]. На *in vivo* модели инфаркта миокарда у кроликов конструкция также показала высокий уровень экспрессии и шестикратную индукцию [97].

В некоторых случаях для гипоксической индукции экспрессии генов используют двухплазмидную систему. При этом в одной плазмиде под контролем индуцируемого гипоксией промотора находится гибридный трансактиватор (или трансактиватор, слитый с ODD), а в другой под контролем промотора, соответствующего трансактиватору, — терапевтический или репортерный ген. В первом исследовании, выполненном с использованием этой стратегии [98], в качестве трансактиватора выбрали гибридный белок, состоящий из ДНК-связывающей части дрожжевого фактора *GAL4* и субъединицы р65 эукариотического фактора транскрипции NF- $\kappa$ B. В качестве сенсора гипоксии авторы использовали мономерный HRE гена енолазы-1. Вторая плазида содержала гексамер участка длиной 17 п.н., связывающего *GAL4*, и репортерный ген люциферазы. Эта стратегия привела к увеличению базального уровня экспрессии репортерного гена в 200–400 раз при сохранении уровня индукции при гипоксии в 2–7 раз [98].

Для регуляции экспрессии терапевтического гена гемоксигеназы-1 человека (*hHO-1*) использовали также ODD HIF-1 $\alpha$  [99]. Последовательность, кодирующую ODD, встроили в регуляторную плазмиду, аналогичную описанной выше, но без HRE-элемента между *GAL4* и *p65*. В клеточной культуре система обеспечила 12-кратную индукцию уровня экспрессии трансгена. После введения плазмид мышам продукцию *hHO-1* обнаруживали только в сердце и только в условиях ишемии, при этом наблюдался ряд положительных терапевтических эффектов [99]. В дальнейшем объединили два предыдущих подхода [100]. Регуляторная плазида в этой двухплазмидной системе содержала димер или гексамер HRE-элемента и экспрессировала *GAL4*-р65, слитый с ODD. *In vitro* система обеспечила 1000-кратную индукцию экспрессии репортерного гена. В опытах *in vivo* также выявлен высокий уровень экспрессии и значительный уровень индукции репортерного гена [100]. Хотя системы гипоксической индукции, основанные на применении дрожжевого белка *GAL4*, доказали свою высокую эффективность, их работоспособность при длительном или повторном использовании вызывает сомнения, связанные с возможностью иммунного ответа организма на чужеродный белок.

В последние годы во многих лабораториях ведутся исследования, направленные на совместное применение стратегий генной и клеточной терапии. Так, в мезенхимные стволовые клетки вводили плазмидные конструкции, обеспечивающие синтез *VEGF* в ответ на гипоксию. Эти клетки имплантировали крысам в зону инфаркта, после чего наблюдали продукцию *VEGF*. Последствия

инфаркта в экспериментальной группе были менее выражены, чем в контрольной, неоваскуляризация поврежденного миокарда существенно повышалась, а количество апоптотических клеток в области инфаркта, наоборот, снижалось. Интересно, что модифицированные клетки задерживаются в миокарде в большем количестве и на более долгий срок, чем интактные [101].

**Генная терапия заболеваний нервной системы.** Помимо уже перечисленных заболеваний, связь которых с гипоксией очевидна, вызывать временную гипоксию могут также травмы центральной нервной системы, например, повреждения спинного мозга [102]. Предпринимались попытки использования нейрональных стволовых клеток с целью терапии этих заболеваний [103]. Эти попытки были, в основном, не слишком удачными, преимущественно из-за высокой гибели трансплантированных клеток. Существенно улучшить ситуацию мог бы синтез в нейрональных стволовых клетках какого-либо фактора, повышающего выживаемость трансплантированных клеток [103, 104]. Зависимость уровня синтеза этого фактора от концентрации кислорода сделала бы такой подход более безопасным. В качестве такого фактора был выбран гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), который является не только ростовым фактором кроветворных клеток, но и стимулирует пролиферацию предшественников нервных клеток, а также выживание дофаминергических нейронов. Плазмидой, в которой ген *GM-CSF* находится под контролем промотора SV40 и энхансера гена эритропоэтина, трансфицировали нейрональные стволовые клетки, а затем трансплантировали эти клетки в зону повреждения спинного мозга. Такая модификация привела к росту выживаемости трансплантированных клеток и улучшению двигательных функций у подопытных животных [105].

#### **Системы, регулируемые уровнем глюкозы, — генная терапия сахарного диабета**

Первые попытки генной терапии сахарного диабета выполнены на экспериментальных моделях. В фибробласты вводили нерегулируемые конструкции, продуцирующие природный проинсулин, а затем модифицированные фибробласты вводили животным перитонеально. Эффективность этой стратегии была, однако, низкой, так как превращение препроинсулина в функциональный гормон происходит при участии ферментов конвертаз PC1/3 и PC2, которые присутствуют в  $\beta$ -клетках, но не в фибробластах и в большинстве других типов клеток [106]. Для решения этой проблемы в дальнейшем использовали модифицированный генноинженерный инсулин (hIns-M3), в котором сайты расщепления конвертазами PC1/3 и PC2 заменили на сайт фуриновой протеазы, присутствующей в клетках разного типа, что сде-

лало возможным секрецию зрелой формы инсулина в фибробластах и других клетках [107, 108]. Результаты этих начальных исследований, в том числе экспрессии гена модифицированного инсулина в составе аденовирусных векторов в клетках печени [109], показали, что конститутивная продукция инсулина в различных тканях позволяет уменьшить метаболические нарушения при сахарном диабете, а также обеспечить нормальный уровень глюкозы в ответ на прием пищи или голодание. Показано также, что продукцию инсулина, определяемую генными конструкциями, необходимо регулировать, чтобы поддерживать нормальный уровень глюкозы в разных физиологических состояниях, поскольку инсулин высвобождается из клеток в кровотоки не постоянно, а в ответ на поступление глюкозы.

В качестве одной из таких регулируемых систем использовали описанную выше рапамицин-зависимую систему экспрессии гена генноинженерного инсулина hIns-M3. Оказалось, что введение рапамицина вызывает обратимое и дозозависимое повышение уровня инсулина и понижение уровня глюкозы в сыворотке крови. Снижение уровня глюкозы становилось заметным через 12 ч после введения рапамицина и продолжалось в течение 2–3 сут, тогда как уровень инсулина достигал максимума через 15 ч после введения рапамицина и поддерживался в течение примерно 40 ч [110].

В дальнейшем, однако, опробовали различные варианты продуцирующих инсулин конструкций, которые регулировались уровнем глюкозы в крови. Поскольку глюкозный контроль инсулинового и других промоторов в  $\beta$ -клетках осуществляется с помощью нескольких, не универсальных для всех клеток механизмов, эффективность и точность работы регулируемых глюкозой конструкций зависит от ткани или органа, выбранных для введения терапевтических конструкций. Одним из наиболее подходящих органов считается печень, поскольку в ней экспрессируются ключевые компоненты системы глюкозного контроля  $\beta$ -клеток, а именно, глюкозный транспортер GLUT2 и глюкокиназа.

На основе промотора гена *IGFBP1*, репрессируемого инсулином, в сочетании с мультимерами реагирующего на глюкозу элемента (GIRE) гена печеночной пируваткиназы получена ауторегулируемая конструкция [111]. Подобные конструкции, введенные в гепатоциты крысы, были способны в 2–3 раза увеличивать секрецию инсулина в среду при добавлении глюкозы.

С помощью аденовирусных векторов терапевтические конструкции доставляли в печень больных сахарным диабетом крыс линии DP-BB/Wor, имевших врожденную предрасположенность к этому заболеванию. Оказалось, что нормальный уровень глюкозы у них мог восстанавливаться



уже через 2 ч после введения глюкозы. Тем не менее, уровень глюкозагона и свободных жирных кислот у этих крыс был выше, чем в контроле (здоровые животные) [112].

Принцип ауторегуляции использовали также в работе [113], в которой действие активируемого глюкозой и ингибируемого инсулином промотора гена глюкозо-6-фосфатазы, проявляющего низкую транскрипционную активность в клетках печени, усиливали добавлением двух копий энхансера гена альдолазы. В составе аденовирусного вектора активность такой конструкции в системе *in vitro* возрастала не менее чем в 10 раз при добавлении глюкозы и существенно снижалась при добавлении инсулина. У крыс с индуцированным стрептозотоцином сахарным диабетом после введения конструкций в печень наблюдали увеличение уровня инсулина после еды и значительное снижение гипергликемии. Содержание глюкозы приходило в норму через 4 ч, тогда как гипогликемия не возникала даже после продолжительного голодания [113]. Ген инсулина экспрессировали также под контролем промотора гена *GLP-1*, чувствительного к уровню глюкозы, в L-клетках кишечника, которые обладают глюкозо-чувствительным секреторным аппаратом, сходным с этим аппаратом в  $\beta$ -клетках, и поэтому должны быстрее и более адекватно реагировать на изменения уровня глюкозы [114].

Предложена весьма интересная и перспективная стратегия создания искусственных промоторов, предназначенных для терапии сахарного диабета [115]. На основе базального промотора гена печеночной пируваткиназы и трехэлементных модулей, сочетающихся в разном порядке элементов, реагирующих на глюкозу, и участки связывания гепатоцитарных факторов транскрипции HNF-1 и C/EBP, создана библиотека синтетических промоторов. После анализа уровней экспрессии и индукции глюкозой полученных сочетаний к этим конструкциям итеративно добавляли еще два трехэлементных модуля. Активность некоторых вариантов промоторов составила более 40% от активности CMV-промотора. При системном введении аденовирусов, экспрессирующих ген инсулина под контролем наиболее эффективного промотора, продукцию инсулина обнаруживали только в печени. Введение регулируемых конструкций животным с сахарным диабетом обеспечивало поддержание нормального уровня глюкозы в крови, однако для этого им требовалось в 2 раза больше времени, чем здоровым животным [115].

Обнадеживающие результаты получены с использованием в качестве модели крупных животных. Свиньям с иммуносупрессией удаляли поджелудочную железу и в печень через портальную вену трансплантировали обратимо иммортализованные гепатоциты человека, синтезирующие инсулин под контролем чувствительного к глюкозе промотора

печеночной пируваткиназы. Однако, несмотря на частичную реверсию гипергликемии, гибель таких животных удалось лишь замедлить [116].

Более удовлетворительными были результаты, полученные на свиньях со стрептозотоциновым диабетом [117]. В изолированные гепатоциты этих животных методом электропорации вводили плазмидные конструкции, содержащие металло-тионеиновый промотор в сочетании с GIRE-элементом гена печеночной пируваткиназы, а затем гепатоциты реимплантировали в печень. После такой процедуры около 70% модифицированных гепатоцитов прижились в печени и продуцировали инсулин более 10 мес, что выразилось в коррекции гипергликемии и дислипидемии, а также других метаболических нарушений, связанных с недостатком инсулина, причем гипогликемия не развивалась даже в периоды относительного голодания животных [117].

Определенный недостаток описанных систем регулируемой глюкозой продукции инсулина — их опора исключительно на транскрипционную регуляцию, что приводит к относительно медленной реакции на изменения уровня глюкозы, в то время как  $\beta$ -клетки могут делать это весьма быстро за счет активации или торможения секреции накопленного в секреторных гранулах инсулина. По-видимому, в будущем для более физиологичной регуляции продукции инсулина необходимо разработать системы, использующие подобного рода механизмы.

Следует упомянуть, что, кроме регулируемой продукции инсулина в гепатоцитах или клетках другого типа, предложена и другая стратегия, направленная на пролиферацию или повышение выживаемости  $\beta$ -клеток при сахарном диабете. В рамках этой стратегии в островках Лангерганса поджелудочной железы человека синтезировали активируемый аналогом рапамицина AP20187 вариант рецептора эритропоетина, способный запускать пролиферацию  $\beta$ -клеток. В результате пролиферация  $\beta$ -клеток повышалась в 2.5 раза по сравнению с контролем. После трансплантации 500 модифицированных островков под капсулу почки мышам NOD-SCID с иммунодефицитом и стрептозотоциновым диабетом концентрация глюкозы в крови животных быстро восстанавливалась и поддерживалась на нормальном уровне на протяжении 3 мес, если димеризующий аналог рапамицина вводили каждые 2 сут; в то же время при введении интактных островков коррекции диабета у мышей не наблюдали. Таким образом, удалось разработать методику пролиферации островковых клеток *ex vivo* и добиться длительного снижения уровня глюкозы после аллогенной трансплантации у мышей с индуцированным сахарным диабетом [118]. Другие варианты упомянутой стратегии реализуются с использованием подходов (на данный момент, правда, в нерегулируемых вариантах), направленных на продукцию

глюкагоноподобного пептида-1, который стимулирует пролиферацию и дифференцировку  $\beta$ -клеток и усиливают глюкозозависимую секрецию инсулина [119]. В наиболее продвинутом варианте этой стратегии использовали сочетание продукции глюкагоноподобного пептида-1 и стимуляторов пролиферации  $\beta$ -клеток – циклина D2 и протеинкиназы CDK4 [120].

### СИСТЕМЫ РЕГУЛЯЦИИ, ОСНОВАННЫЕ НА ФИЗИЧЕСКИХ ПРИНЦИПАХ

Это направление, получившее заметное развитие лишь в последние годы, предполагает радикальную смену принципов регуляции и заслуживает внимания хотя бы поэтому. Некоторые варианты могут иметь вполне серьезную клиническую перспективу. Одно из этих направлений связано с использованием промоторов, индуцируемых рентгеновским или  $\gamma$ -излучением [121]. Параметры работы таких промоторов в последние годы постоянно улучшались. Создана библиотека синтетических промоторов, активность лучшего из которых усиливалась более чем в 20 раз при рентгеновском облучении [122]. Эту стратегию ограничивает возможность повреждения клеток и развитие мутагенных эффектов, что делает ее приемлемой в основном лишь при онкологических заболеваниях.

Создана оптогенетическая система, позволяющая с помощью видимого света индуцировать транскрипцию нужных генов. Используя подкожную трансплантацию инкапсулированных клеток, продуцирующих глюкагоноподобный пептид-1 под контролем этой системы, удалось повысить уровень инсулина в крови после облучения и снизить гипергликемию [123]. Важный недостаток этого метода – неспособность видимого света проникать в глубоко лежащие слои тканей.

Недавно предложили, по-видимому, наиболее перспективный подход. Созданы модифицированные варианты температурочувствительного кальциевого канала TRPV1, способные связывать добавленные извне наночастицы, содержащие оксид железа. Оказалось, что возможно даже генетически модифицировать клетки таким образом, чтобы ферритиновые наночастицы синтезировались внутри клеток. Облучение радиоволнами клеток в культуре или тканей *in vivo*, содержащих конструкции, которые продуцируют модифицированные каналы TRPV1 и инсулин под контролем кальций-зависимого промотора, приводило к локальному нагреванию клеток с поступлением в них ионов кальция, что вызывало быструю индукцию синтеза и секреции инсулина [124]. Принципиальное преимущество предложенного подхода состоит в способности радиоволн проникать глубоко в ткани, что делает возможным проведение

регулируемой радиоволнами генной терапии внутренних органов.

### СИСТЕМЫ, ОСНОВАННЫЕ НА РЕГУЛЯТОРНЫХ РНК

В последней части обзора нам хотелось бы рассмотреть новую, еще малоизученную, но перспективную стратегию регуляции экспрессии генов, лишенную многих недостатков подходов, перечисленных выше. Речь пойдет о методе, основанном на использовании регуляторных РНК: аптамеров и рибозимов. Нуклеиновые аптамеры представляют собой олигонуклеотиды, способные специфически связываться с определенными молекулами. В природе, чаще всего у бактерий, аптамеры входят в состав так называемых РНК-переключателей – структур, способных запускать или прекращать экспрессию гена в ответ на связывание лиганда. При связывании лиганда аптамером, входящим в состав РНК-переключателя, изменяется вторичная структура всего комплекса. Рибозимы представляют собой молекулы РНК, обладающие каталитическими свойствами. Некоторые из них, например молотообразный (hammerhead) рибозим, способны к саморазрезанию без участия каких бы то ни было других молекул.

В природе существует широкий спектр РНК-переключателей, отличающихся механизмом действия и лигандами. Кроме того, современные методы селекции позволяют довольно эффективно подбирать пары лиганд-аптамер [125, 126]. По механизмам регуляции можно выделить РНК-переключатели, действующие на стадии транскрипции, сплайсинга и трансляции.

У прокариот существует механизм терминации транскрипции, при котором транскрипция прекращается из-за диссоциации молекул ДНК и РНК. К диссоциации приводит образование в только что синтезированной РНК терминатора – особой структуры стебель-петля, за которой следует поли(U)-цепочка [127, 128]. У *Bacillus subtilis* обнаружено несколько механизмов регуляции экспрессии генов, основанных на этом принципе. В 5'-нетранслируемой области ряда генов найдены участки, способные формировать терминатор в присутствии лиганда. Так, например, в регуляторных областях 17 генов, кодирующих белки, вовлеченные в метаболизм пуринов, находится регуляторный элемент, формирующий терминатор при связывании гуанина [129]. В опероне *ribDEAHT* также найден аналогичный элемент, связывающий флавиномононуклеотид [130]. Описанные механизмы позволяют “выключать” экспрессию с помощью молекул-лигандов, однако у той же *B. subtilis* есть и противоположный механизм, основанный на связывании аденина. При связывании аденина структура терминатора изменяется, он превращается в антитерминатор, и синтезируется функциональная мРНК [131].

Локализация аптамера возле 3'- или 5'-сайта сплайсинга может влиять на эффективность сплайсинга эукариотической РНК. Подобный механизм регуляции обнаружен у мицелиального гриба *Neurospora crassa* возле 5'-сайта сплайсинга гена белка, вовлеченного в метаболизм тиаминпирофосфата. Этот принцип применили для регуляции пре-мРНК у дрожжей, поместив сайт сплайсинга внутрь тетрациклинового аптамера. При этом в присутствии лиганда сайт сплайсинга оказывался недоступным для сплайсосомы. Используя одновременно несколько аптамеров, удалось добиться 32-кратного изменения уровня экспрессии репортерного гена [132].

В качестве примера трансляционной регуляции экспрессии генов можно привести механизм, обнаруженный в клетках *E. coli*, в котором используется аптамер, подавляющий трансляцию РНК при связывании с лигандом. Регуляторная аптамерная последовательность располагается в 5'-нетранслируемой области генов, кодирующих белки, вовлеченные в биосинтез витамина В<sub>1</sub>. Связывание лиганда — тиаминпирофосфата — приводит к изменению конформации аптамерной последовательности таким образом, что сайт связывания рибосомы становится недоступным для рибосомы, и РНК не транслируется [133].

Предпринимались попытки создать искусственные РНК-переключатели (аптазимы), объединив аптамер с саморазрезающимся рибозимом. Присоединяя случайными последовательностями аптамеры, связывающие различные лиганды, ко второму стволу саморазрезающегося рибозима, удалось получить теофиллин-, АТР- и флавинонуклеотид-зависимые рибозимы. При этом в одних случаях связывание лиганда приводило к увеличению активности рибозима, а в других — к уменьшению [134, 135]. В дальнейшем путем подбора оптимальной последовательности, связывающей рибозим и аптамер, получены улучшенные варианты этих аптазимов [136]. Добавление менее консервативных участков к минимально возможной последовательности рибозима позволило увеличить скорость реакции саморазрезания [137]. Хотя такой принцип регуляции экспрессии генов и представляется перспективным для применения в генной терапии, при переходе к эукариотическим моделям возникли существенные трудности, связанные в значительной степени со сложностью скрининга экспериментальных конструкций в эукариотических клетках. Только относительно недавно получен модифицированный теофиллин-зависимый аптазим, обеспечивший заметную индукцию экспрессии репортерного гена в нескольких линиях эукариотических клеток [138]. При помощи описанного выше бактериального гуанинового аптамера создан еще один аптазим, индуцирующий экспрессию трансгена в клетках млекопитающих [139]. Разработан высокоэффективный метод скрининга потенциальных аптазимов, с

помощью которого протестировали 10<sup>6</sup> соединений и обнаружили одно, усилившее экспрессию трансгена в 10 раз. Этот аптазим состоит из рибозима вируса кольцевой мозаики табака и аптамера, способного связывать теофиллин [140].

Однако упомянутые системы пока еще довольно далеки не только от клинических испытаний, но и от экспериментов *in vivo*. Нам известна всего одна работа, в которой рибозимы использовали для регуляции экспрессии репортерного гена в организме животных [141]. Связывание рибозима с определенной малой молекулой может подавлять его саморазрезание. Если такой рибозим окажется между кеп-структурой и стартовым кодоном, то в отсутствие ингибитора кеп окажется отрезанным от мРНК, и белок не будет синтезироваться. Создана система регуляции, основанная на этом принципе [141]. Тестирование большого количества потенциальных рибозимов и лигандов-ингибиторов позволило отобрать модифицированный вариант рибозима Sm1 трематоды *Schistosoma mansoni* и лиганд тойокамицин. Конструкция, содержащая два рибозима подряд, обеспечивала 2000-кратную индукцию экспрессии репортерного гена при общем высоком уровне экспрессии по сравнению с конструкцией без рибозима. В опытах на животных конструкция обеспечивала 200-кратную индукцию экспрессии гена люциферазы [141].

Как представляется, системы регуляции экспрессии генов, основанные на рибозимах и аптамерах, имеют значительные перспективы при применении генной терапии в клинической практике. Главное их преимущество перед другими системами заключается в отсутствии иммунного ответа на регуляторные компоненты, в том числе и чужеродные. Хотя на сегодняшний день такие системы еще далеки от практического применения, однако, многообразие встречающихся в природе механизмов и развитие технологий скрининга синтетических аналогов позволят, вероятно, в недалеком будущем разработать эффективные и безопасные стратегии регуляции экспрессии генов в организме млекопитающих.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В связи с обширностью темы и недостатком места нами рассмотрены только наиболее перспективные системы контроля экспрессии терапевтических генов при генной терапии. Среди систем, регулируемых *in vivo*, наиболее хорошо разработана система тетрациклиновой регуляции, которая отличается высокими техническими характеристиками, однако возможности ее клинического применения неясны, поскольку использование бактериального белка для регуляции транскрипции несет реальную опасность развития иммунного ответа, ограничение времени применения или необходимость применения только в иммунопривилегированных областях

организма. Наиболее перспективной, учитывая длительность работы и отсутствие иммунного ответа, считается система контроля экспрессии за счет димеризации под действием рапамициновых производных. Не исключено, впрочем, что стратегии, направленные на индукцию иммунологической толерантности к тетрациклиновому репрессору и другим чужеродным регуляторам, смогут серьезно изменить клинические перспективы соответствующих систем.

Свои преимущества и недостатки имеют как системы, основанные на применении внешних индукторов, так и ауторегулируемые системы. Ауторегулируемые системы, построенные на заимствовании или имитации физиологических регуляторных механизмов, обеспечивают высокую гибкость реагирования, близкую к физиологической, и позволяют в перспективе минимизировать медицинское обслуживание больного. В то же время, к принципиальным недостаткам таких систем относится невозможность, при необходимости, коррекции уровня экспрессии. При нарушении их работы, в том числе при изменении внутренних параметров физиологических реакций, возможности коррекции сводятся практически только к повторному введению терапевтических векторов.

Мы предполагаем, что идеальным вариантом для многих применений генной терапии могут стать ауторегулируемые системы, дополненные элементами систем, регулируемых извне. В этом случае при не вполне правильно выбранных параметрах регулируемой системы или возникающих осложнениях станет возможным скорректировать ее работу в нужную сторону. Необходимо, конечно, разрабатывать варианты сочетания двух различных стратегий. Представляется, что вариант, в котором система, регулируемая извне, интегрально входит в состав ауторегулируемой (например, позволяет регулировать уровни или активность главных физиологических регуляторов), а не является простым сочетанием двух независимых систем, будет почти идеально объединять преимущества двух стратегий регуляции экспрессии при генной терапии. Также вероятно, что в будущем заметно большее, нежели сейчас, распространение получат системы, в которых происходит не индукция, а подавление экспрессии нужного гена за счет использования микроРНК или коротких шпилечных РНК.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (ГК № 16.512.11.2051), а также Программы фундаментальных исследований Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология” (грант А.В. Белявскому).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ott G.M., Schmidt M., Schwarzwaelder K., Stein S., Siler U., Koehl U., Glimm H., Kühlecke K., Schilz A., Kunkel H., Naundorf S., Brinkmann A., Deichmann A., Fischer M., Ball C., Pilz I., Dunbar C., Du Y., Jenkins N.A., Copeland N.G., Lüthi U., Hassan M., Thrasher A.J., Hoelzer D., von Kalle C., Seger R., Grez M. 2006. Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EVI1, PRDM16 or SETBP1. *Nat. Medicine*. **12**, 401–409.
- Otsu M., Candotti F. 2002. Gene therapy in infants with severe combined immunodeficiency. *Biodrugs*. **16**, 229–239.
- Maguire A.M., Simonelli F., Pierce E.A., Pugh E.N., Jr, Mingozzi F., Bennicelli J., Banfi S., Marshall K.A., Testa F., Surace E.M., Rossi S., Lyubarsky A., Arruda V.R., Konkle B., Stone E., Sun J., Jacobs J., Dell’Osso L., Hertle R., Ma J., Redmond M., Zhu X., Hauck B., Zelenia O., Shindler K.S., Maguire M.G., Wright J.F., Volpe N.J., McDonnell J.W., Auricchio A., High K.A., Bennett J. 2008. Safety and efficacy of gene transfer for Leber’s congenital amaurosis. *N. Eng. J. Med.* **358**, 2240–2248.
- Dvorak H.F. 2003. Rous–Whipple award lecture. How tumors make bad blood vessels and stroma. *Am. J. Pathol.* **162**, 1747–1757.
- Lee R.J., Springer M.L., Blanco-Bose W.E., Shaw R., Ursell P.C., Blau H.M. 2000. *VEGF* gene delivery to myocardium: deleterious effects of unregulated expression. *Circulation*. **102**, 898–901.
- Tafuro S., Ayuso E., Zacchigna S., Zentilin L., Moimas S., Dore F., Giacca M. 2009. Inducible adeno-associated virus vectors promote functional angiogenesis in adult organisms via regulated vascular endothelial growth factor expression. *Cardiovascular Res.* **83**, 663–671.
- Postle K., Nguyen T.T., Bertrand K.P. 1984. Nucleotide sequence of the repressor gene of the TNJO tetracycline resistance determinant. *Nucl. Acids Res.* **12**, 4849–4863.
- Gossen M., Bujard H. 1992. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **89**, 5547–5551.
- Gossen M., Freundlieb S., Bender G., Müller G., Hillen W., Bujard H. 1995. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science*. **268**, 1766–1769.
- Urlinger S., Baron U., Thellmann M., Hasan M.T., Bujard H., Hillen W. 2000. Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **9**, 7963–7968.
- Baron U., Gossen M., Bujard H. 1997. Tetracycline-controlled transcription in eukaryotes: novel transactivators with graded transactivation potential. *Nucl. Acids Res.* **25**, 2723–2729.
- Bellefroid E.J., Poncelet D.A., Lecocq P.J., Revelant O., Martial J.A. 1991. The evolutionarily conserved Kruppel-associated box domain defines a subfamily of eukaryotic

- multifingered proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **88**, 3608–3612.
13. Witzgall R., O'Leary E., Leaf A., Onaldi D., Bonventre J.V. 1994. The Kruppel-associated box-A (KRAB-A) domain of zinc finger proteins mediates transcriptional repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **91**, 4514–4518.
  14. Deuschle U., Meyer W.K., Thiesen H.J. 1995. Tetracycline-reversible silencing of eukaryotic promoters. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 1907–1914.
  15. Freundlieb S., Schirra-Müller C., Bujard H. 1999. A tetracycline controlled activation/repression system with increased potential for gene transfer into mammalian cells. *Gene Med.* **1**, 4–12.
  16. Barde I., Zanta-Boussif M.A., Paisant S., Leboeuf M., Rameau P., Delenda C., Danos O. 2006. Efficient control of gene expression in the hematopoietic system using a single Tet-on inducible lentiviral vector. *Mol. Therapy*. **13**, 382–390.
  17. Haberman R.P., McCown T.J., Samulski R.J. 1998. Inducible long-term gene expression in brain with adeno-associated virus gene transfer. *Gene Therapy*. **5**, 1604–1611.
  18. Furth P.A., St-Onge L., Boger H., Gruss P., Gossen M., Kistner A., Bujard H., Hennighausen L. 1994. Temporal control of gene expression in transgenic mice by a tetracycline-responsive promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **91**, 9302–9306.
  19. Mayford M., Bach M.E., Huang Y.Y., Wang L., Hawkins R.D., Kandel E.R. 1996. Control of memory formation through regulated expression of a CaMKII transgene. *Science*. **274**, 1678–1683.
  20. Tremblay P., Meiner Z., Galou M., Heinrich C., Petromilli C., Lisse T., Cayetano J., Torchia M., Mobley W., Bujard H., DeArmond S.J., Prusiner S.B. 1998. Doxycycline control of prion protein transgene expression modulates prion disease in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**, 12580–12585.
  21. Yamamoto A., Lucas J.J., Hen R. 2000. Reversal of neuropathology and motor dysfunction in a conditional model of Huntington's disease. *Cell*. **101**, 57–66.
  22. Bohl D., Salvetti A., Moullier P., Heard J.M. 1998. Control of erythropoietin delivery by doxycycline in mice after intramuscular injection of adeno-associated virus. *Blood*. **92**, 1512–1517.
  23. Bohl D., Naffakh N., Heard J.M. 1997. Long-term control of erythropoietin secretion by doxycycline in mice transplanted with engineered primary myoblasts. *Nat. Med.* **3**, 299–305.
  24. Favre D., Blouin V., Provost N., Spisek R., Porrot F., Bohl D., Marme F., Cherel Y., Salvetti A., Hurtrel B., Heard J.M., Riviere Y., Moullier P. 2002. Lack of an immune response against the tetracycline-dependent transactivator correlates with long-term doxycycline-regulated transgene expression in nonhuman primates after intramuscular injection of recombinant adeno-associated virus. *J. Virol.* **76**, 11605–11611.
  25. Favre D., Provost N., Blouin V., Blanche G., Cherel Y., Salvetti A., Moullier P. 2001. Immediate and long-term safety of recombinant adeno-associated virus injection into the nonhuman primate muscle. *Mol. Ther.* **4**, 559–566.
  26. Stieger K., Mendes-Madeira A., Meur G.L., Weber M., Deschamps J.Y., Nivard D., Provost N., Moullier P., Rolling F. 2007. Oral administration of doxycycline allows tight control of transgene expression: a key step towards gene therapy of retinal diseases. *Gene Ther.* **14**, 1668–1673.
  27. Apparailly F., Millet V., Noel D., Jacquet C., Sany J., Jorgensen C. 2002. Tetracycline-inducible interleukin-10 gene transfer mediated by an adeno-associated virus: application to experimental arthritis. *Hum. Gene Ther.* **13**, 1179–1188.
  28. Perez N., Plence P., Millet V., Greuet D., Minot C., Noel D., Danos O., Jorgensen C., Apparailly F. 2002. Tetracycline transcriptional silencer tightly controls transgene expression after in vivo intramuscular electrotransfer: application to interleukin 10 therapy in experimental arthritis. *Hum. Gene Ther.* **13**, 2161–2172.
  29. Smith J.R., Verwaerde C., Rolling F., Naud M.C., Delanoye A., Thillaye-Goldenberg B., Apparailly F., De Kozak Y. 2005. Tetracycline-inducible viral interleukin-10 intraocular gene transfer, using adeno-associated virus in experimental autoimmune uveoretinitis. *Hum. Gene Ther.* **16**, 1037–1046.
  30. Thomas P.B., Samant D.M., Selvam S., Wei R.H., Wang Y., Stevenson D., Schechter J.E., Apparailly F., Mircheff A.K., Trousdale M.D. 2010 Adeno-associated virus-mediated il-10 gene transfer suppresses lacrimal gland immunopathology in a rabbit model of autoimmune dacryoadenitis. *IOVS*. **51**, 5137–5144.
  31. Blesch A., Conner J., Pfeifer A., Gasmi M., Ramirez A., Britton W., Alfa R., Verma I., Tuszynski M.H. 2005. Regulated lentiviral *NGF* gene transfer controls rescue of medial septal cholinergic neurons. *Mol. Ther.* **11**, 916–925.
  32. Georgievska B., Jakobsson J., Persson E., Ericson C., Kirik D., Lundberg C. 2004. Regulated delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor into rat striatum, using a tetracycline-dependent lentiviral vector. *Hum. Gene Ther.* **15**, 934–944.
  33. Chtarto A., Yang X., Bockstael O., Melas C., Blum D., Lehtonen E., Abeloos L., Jaspard J.M., Levivier M., Brotchi J., Velu T., Tenenbaum L. 2007. Controlled delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor by a single tetracycline-inducible AAV vector. *Exp. Neurol.* **204**, 387–399.
  34. Blesch A., Tuszynski M.H. 2007. Transient growth factor delivery sustains regenerated axons after spinal cord injury. *J. Neurosci.* **27**, 10535–10545.
  35. Chen M., Song K., Rao N., Huang M., Huang Z., Cao Y. 2011. Roles of exogenously regulated bFGF expression in angiogenesis and bone regeneration in rat calvarial defects. *Intern. J. Mol. Med.* **27**, 545–553.
  36. Dewey R.A., Morrissey G., Cowsill C.M., Stone D., Bolognani F., Dodd N.J., Southgate T.D., Klatzmann D., Lassmann H., Castro M.G., Lowenstein P.R. 1999. Chronic brain inflammation and persistent herpes simplex virus 1 thymidine kinase expression in survivors of syngeneic glioma treated by adenovirus-mediated gene therapy: implications for clinical trials. *Nat. Med.* **5**, 1256–1263.
  37. Candolfi M., Pluhar G.E., Kroeger K., Puntel M., Curtin J., Barcia C., Muhammad A.K., Xiong W., Liu C., Mondkar S., Kuoy W., Kang T., McNeil E.A.,

- Freese A.B., Ohlfest J.R., Moore P., Palmer D., Ng P., Young J.D., Lowenstein P.R., Castro M.G. 2007. Optimization of adenoviral vector-mediated transgene expression in the canine brain *in vivo*, and in canine glioma cells *in vitro*. *Neuro Oncol.* **9**, 245–258.
38. Zeng Z.J., Li Z.B., Luo S.Q., Hu W.X. 2006. Retrovirus-mediated tk gene therapy of implanted human breast cancer in nude mice under the regulation of Tet-On. *Cancer Gene Ther.* **13**, 290–297.
39. Li Z.B., Zeng Z.J., Chen Q., Luo S.Q., Hu W.X. 2006. Recombinant AAV-mediated HSVtk gene transfer with direct intratumoral injections and Tet-On regulation for implanted human breast cancer. *BMC Cancer.* **6**, 66.
40. Gu J., Zhang L., Huang X., Lin T., Yin M., Xu K., Ji L., Roth J.A., Fang B. 2002. A novel single tetracycline-regulative adenoviral vector for tumor-specific *Bax* gene expression and cell killing *in vitro* and *in vivo*. *Oncogene.* **21**, 4757–4764.
41. Vanrell L., Di Scala M., Blanco L., Otano I., Gil-Farina I., Baldim V., Paneda A., Berraondo P., Beattie S.G., Chtarto A., Tenenbaum L., Prieto J., Gonzalez-Aseguinolaza G. 2011. Development of a liver-specific Tet-On inducible system for AAV vectors and its application in the treatment of liver cancer. *Mol. Therapy.* **19**, 1245–1253.
42. Pomerantz J.L., Sharp P.A., Pabo C.O. 1995. Structure-based design of transcription factors. *Science.* **267**, 93–96.
43. Rivera V.M., Clackson T., Natesan S., Pollock R., Amara J.F., Keenan T., Magari S.R., Phillips T., Courage N.L., Cerasoli F., Jr, Holt D.A., Gilman M. 1996. A humanized system for pharmacologic control of gene expression. *Nat. Medicine.* **2**, 1028–1032.
44. Yang W., Rozamus L.W., Narula S., Rollins C.T., Yuan R., Andrade L.J., Ram M.K., Phillips T.B., van Schravendijk M.R., Dalgarno D., Clackson T., Holt D.A. 2000. Investigating protein-ligand interactions with a mutant FKBP possessing a designed specificity pocket. *J. Med. Chem.* **6**, 1135–1142.
45. Yang W., Keenan T.P., Rozamus L.W., Wang X., Rivera V.M., Rollins C.T., Clackson T., Holt D.A. 2003. Regulation of gene expression by synthetic dimerizers with novel specificity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19**, 3181–3184.
46. Ye X., Rivera V.M., Zoltick P., Cerasoli F., Jr, Schnell M.A., Gao G., Hughes J.V., Gilman M., Wilson J.M. 1999. Regulated delivery of therapeutic proteins after *in vivo* somatic cell gene transfer. *Science.* **283**, 88–91.
47. Rivera V.M., Gao G., Grant R.L., Schnell M.A., Zoltick P.W., Rozamus L.W., Clackson T., Wilson J.M. 2005. Long-term pharmacologically regulated expression of erythropoietin in primates following AAV-mediated gene transfer. *Blood.* **105**, 1424–1430.
48. Auricchio A., Rivera V.M., Clackson T., O'Connor E.E., Maguire A.M., Tolentino M.J., Bennet J., Wilson J.M. 2002. Pharmacological regulation of protein expression from adeno-associated viral vectors in the eye. *Mol. Therapy.* **6**, 238–242.
49. Chong H., Ruchatz A., Clackson T., Rivera V.M., Vile R.G.A. 2002. System for small-molecule control of conditionally replication-competent adenoviral vectors. *Mol. Therapy.* **5**, 195–203.
50. Nguyen M., Huan-Tu G., Gonzalez-Edick M., Rivera V.M., Clackson T., Jooss K.U., Harding T.C. 2007. Rapamycin-regulated control of antiangiogenic tumor therapy following rAAV-mediated gene transfer. *Mol. Therapy.* **5**, 912–920.
51. Holash J., Davis S., Papadopoulos N., Croll S.D., Ho L., Russell M., Boland P., Leidich R., Hylton D., Burova E., Ioffe E., Huang T., Radziejewski C., Bailey K., Fandl J.P., Daly T., Wiegand S.J., Yancopoulos G.D., Rudge J.S. 2002. VEGF-Trap: a VEGF blocker with potent antitumor effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**, 11393–11398.
52. Harding T.C., Lalani A.S., Roberts B.N., Yendluri S., Luan B., Koprivnikar K.E., Gonzalez-Edick M., Huan-Tu G., Musterer R., VanRoey M.J., Ozawa T., LeCouter R.A., Deen D., Dickinson P.J., Jooss K. 2006. AAV serotype 8-mediated gene delivery of a soluble VEGF receptor to the CNS for the treatment of glioblastoma. *Mol. Therapy.* **13**, 956–966.
53. Bankiewicz K.S., Eberling J.L., Kohutnicka M., Jagust W., Pivrotto P., Bringas J., Cunningham J., Budinger T.F., Harvey-White J. 2000. Convection-enhanced delivery of AAV vector in parkinsonian monkeys; *in vivo* detection of gene expression and restoration of dopaminergic function using pro-drug approach. *Exp. Neurol.* **164**, 2–14.
54. Sanftner L.M., Rivera V.M., Suzuki B.M., Feng L., Berk L., Zhou S., Forsayeth J.R., Clackson T., Cunningham J. 2006. Dimerizer regulation of AADC expression and behavioral response in AAV-transduced 6-OHDA lesioned rats. *Mol. Therapy.* **13**, 167–174.
55. Beato M. 1989. Gene regulation by steroid hormones. *Cell.* **56**, 335–344.
56. Burcin M.M., O'Malley B.W., Tsai S.Y. 1998. A regulatory system for target gene expression. *Front. Biosci.* **3**, c1–c7.
57. Vegeto E., Allan G.F., Schrader W.T., Tsai M.J., McDonnell D.P., O'Malley B.W. 1992. The mechanism of RU486 antagonism is dependent on the conformation of the carboxy-terminal tail of the human progesterone receptor. *Cell.* **69**, 703–713.
58. Danielian P.S., White R., Hoare S.A., Fawell S.E., Parker M.G. 1993. Identification of residues in the estrogen receptor that confer differential sensitivity to estrogen and hydroxytamoxifen. *Mol. Endocrinol.* **7**, 232–240.
59. Wang Y., O'Malley B.W., Jr, Tsai S.Y., O'Malley B.W. 1994. A regulatory system for use in gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 8180–8184.
60. Kumar M.B., Fujimoto T., Potter D.W., Deng Q., Palli S.R. 2002. A single point mutation in ecdysone receptor leads to increased ligand specificity: Implications for gene switch applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**, 14710–14715.
61. Yao T., Segraves W.A., Oro A.E., McKeown M., Evans R.M. 1992. *Drosophila* ultraspiracle modulates ecdysone receptor function via heterodimer formation. *Cell.* **71**, 63–72.

62. No D., Yao T., Evans R.M. 1996. Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **93**, 3346–3351.
63. Karns L.R., Kisielewski A., Gulding K.M., Seraj J.M., Theodorescu D. 2001. Manipulation of gene expression by an ecdysone-inducible gene switch in tumor xenografts. *BMC Biotechnol.* **1**, 11.
64. Schwimmer L.J., Gonzalez B., Barbas C.F., III. 2012. Benzoate X receptor zinc-finger gene switches for drug-inducible regulation of transcription. *Gene Therapy*. **19**, 458–462.
65. Sipo I., Wang X., Hurtado Pico A., Suckau L., Weger S., Poller W., Fechner H. 2006. Tamoxifen-regulated adenoviral E1A chimeras for the control of tumor selective oncolytic adenovirus replication *in vitro* and *in vivo*. *Gene Therapy*. **13**, 173–186.
66. Vaupel P., Kallinowski F., Okunieff P. 1989. Blood flow, oxygen and nutrient supply and metabolic microenvironment of human tumors: A review. *Cancer Res.* **49**, 6449–6465.
67. Vaupel P. 1992. Physiological properties of malignant tumours. *NMR Biomed.* **5**, 220–225.
68. Semenza G.L., Roth P.H., Fang H.M., Wang G.L. 1994. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* **269**, 23757–23763.
69. Firth J.D., Ebert B.L., Pugh C.W., Ratcliffe P.J. 1994. Oxygen-regulated control elements in the phosphoglycerate kinase 1 and lactate dehydrogenase A genes: similarities with the erythropoietin 3' enhancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **91**, 6496–6500.
70. Semenza G.L., Nejfelt M.K., Chi S.M., Antonarakis S.E. 1991. Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **88**, 5680–5684.
71. Semenza G.L., Wang G.L. 1992. A nuclear factor induced by hypoxia via *de novo* protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol. Cell Biol.* **12**, 5447–5454.
72. Chun Y.S., Kim M.S., Park J.W. 2002. Oxygen-dependent and -independent regulation of HIF-1 $\alpha$ . *J. Korean Med. Sci.* **17**, 581–588.
73. Bonicalzi M.E., Groulx I., de Paulsen N., Lee S. 2001. Role of exon 2-encoded beta-domain of the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J. Biol. Chem.* **276**, 1407–1416.
74. Ivan M., Kondo K., Yang H., Kim W., Valiando J., Ohh M., Salic A., Asara J.M., Lane W.S., Kaelin W.G., Jr. 2001. HIF1 $\alpha$  targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O<sub>2</sub> sensing. *Science*. **292**, 464–468.
75. Metzén E., Berchner-Pfannschmidt U., Stengel P., Marxsen J.H., Stolze I., Klinger M., Huang W.Q., Wotzlaw C., Hellwig-Burgel T., Jelkmann W., Acker H., Fandrey J. 2003. Intracellular localization of human HIF-1 $\alpha$  hydroxylases: implications for oxygen sensing. *J. Cell Sci.* **116**, 1319–1326.
76. Dachs G.U., Patterson A.V., Firth J.D., Ratcliffe P.J., Townsend K.M., Stratford I.J., Harris A.L. 1997. Targeting gene expression to hypoxic tumor cells. *Nat. Med.* **5**, 515–520.
77. Harada H., Hiraoka M., Kizaka-Kondoh S. 2002. Antitumor Effect of TAT-Oxygen-dependent Degradation-Caspase-3 Fusion Protein Specifically Stabilized and Activated in Hypoxic Tumor Cells. *Cancer Res.* **62**, 2013–2018.
78. Czyzyk-Krzeska M.F., Dominska Z., Kolek R., Millhorn D. 1994. Hypoxia stimulates binding of a cytoplasmic protein to a pyrimidine-rich sequence in the 3' untranslated region of rat tyrosine hydroxylase mRNA. *J. Biol. Chem.* **269**, 9940–9945.
79. Levy A., Levy N., Goldberg M. 1996. Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia. *J. Biol. Chem.* **271**, 2746–2753.
80. Shibata T., Giaccia A., Brown J. 2000. Development of a hypoxia-responsive vector for tumor-specific gene therapy. *Gene Therapy*. **7**, 493–498.
81. Lee M., Choi D., Choi M.J., Jeong J.H., Kim W.J., Oh S., Kim Y.H., Bull D., Kim S. 2006. Hypoxia-inducible gene expression system using the erythropoietin enhancer and 3'-untranslated region of the *VEGF* gene therapy. *J. Control. Release*. **115**, 113–119.
82. Choi B.H., Ha Y., Ahn C.H., Huang X., Kim J.M., Park S.R., Park H., Park H.C., Kim S.W., Lee M. 2007. A hypoxia-inducible gene expression system using erythropoietin 3'-untranslated region for the gene therapy of rat spinal cord injury. *Neurosci. Lett.* **412**, 118–122.
83. Harvey T.J., Hennig I.M., Shnyder S.D., Cooper P.A., Ingram N., Hall G.D., Selby P.J., Chester J.D. 2011. Adenovirus-mediated hypoxia-targeted gene therapy using HSV thymidine kinase and bacterial nitroreductase prodrug-activating genes *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Gene Therapy*. **18**, 773–784.
84. Boast K., Binley K., Iqbal S., Price T., Spearman H., Kingsman S., Kingsman A., Naylor S. 1999. Characterization of physiologically regulated vectors for the treatment of ischemic disease. *Hum. Gene Therapy*. **10**, 2197–2208.
85. Binley K., Askham Z., Martin L., Spearman H., Day D., Kingsman S., Naylor S. 2003. Hypoxia-mediated tumor targeting. *Gene Therapy*. **10**, 540–549.
86. Kan O., Day D., Iqbal S., Burke F., Grimshaw M., Naylor S., Binley K. 2011. Genetically modified macrophages expressing hypoxia regulated cytochrome P450 and P450 reductase for the treatment of cancer. *Int. J. Mol. Med.* **27**, 173–180.
87. Post D.E., Van Meir E.G. 2001. Generation of bidirectional hypoxia/HIF-responsive expression vectors to target gene expression to hypoxic cells. *Gene Therapy*. **8**, 1801–1807.
88. Post D.E., Van Meir E.G. 2003. A novel hypoxia-inducible factor (HIF) activated oncolytic adenovirus for cancer therapy. *Oncogene*. **22**, 2065–2072.
89. Post D.E., Devi N.S., Li Z., Brat D.J., Kaur B., Nicholson A., Olson J.J., Zhang Z., Van Meir E.G. 2004. Cancer therapy with a replicating oncolytic adenovirus targeting the hypoxic microenvironment of tumors. *Clin. Cancer Res.* **10**, 8603–8612.
90. Post D.E., Sandberg E.M., Kyle M.M., Devi N.S., Brat D.J., Xu Z., Tighiouart M., Van Meir E.G. 2007.

- Targeted cancer gene therapy using a hypoxia inducible factor dependent oncolytic adenovirus armed with interleukin-4. *Cancer Res.* **67**, 8422–8423.
91. Cherry T., Longo S., Tovar-Spinoza Z., Post D. 2010. Second-generation HIF-activated oncolytic adenoviruses with improved replication, oncolytic, and anti-tumor efficacy. *Gene Ther.* **17**, 1430–1441.
  92. Su H., Arakawa-Hoyt J., Kan Y.W. 2002. Adeno-associated viral vector-mediated hypoxia response element-regulated gene expression in mouse ischemic heart model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**, 9480–9485.
  93. Phillips M.I., Tang Y., Schmidt-Ott K., Qian K., Kagiya S. 2002. Vigilant vector: heart-specific promoter in an adeno-associated virus vector for cardio-protection. *Hypertension.* **39**, 651–655.
  94. Su H., Joho S., Huang Y., Barcena A., Arakawa-Hoyt J., Grossman W., Kan Y.W. 2004. Adeno-associated viral vector delivers cardiac-specific and hypoxia-inducible VEGF expression in ischemic mouse hearts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**, 16280–16285.
  95. Shoshani T., Faerman A., Mett I., Zelin E., Tenne T., Gorodin S., Moshel Y., Elbaz S., Budanov A., Chajut A., Kalinski H., Kamer I., Rozen A., Mor O., Keshet E., Leshkowitz D., Einat P., Skaliter R., Feinstein E. 2002. Identification of a novel hypoxia-inducible factor 1-responsive gene, RTP801, involved in apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 2283–2293.
  96. Lee M., Bikram M., Oh S., Bull D., Kim S.W. 2004. Sp1-dependent regulation of the RTP801 promoter and its application to hypoxia-inducible VEGF plasmid for ischemic disease. *Pharm. Res.* **21**, 736–741.
  97. Choi D., Lee M., Bull D., Reiss R., Chang C.W., Christensen L., Kim S.W. 2004. Hypoxia-inducible VEGF gene therapy using the RTP801 promoter. *Mol. Therapy.* **9**, S74–S75.
  98. Tang Y., Jackson M., Qian K., Phillips M. 2004. Hypoxia inducible double plasmid system for myocardial ischemia gene therapy. *Hypertension.* **39**, 695–698.
  99. Tang Y.L., Tang Y., Zhang Y.C., Qian K., Shen L., Phillips M. 2004. Protection from ischemic heart injury by a vigilant heme oxygenase-1 plasmid system. *Hypertension.* **43**, 746–751.
  100. Fomicheva E., Turner I., Edwards T., Hoff J., Arden E., D'Alecy L., Metzger J. 2008. Double oxygen-sensing vector system for robust hypoxia/ischemia-regulated gene induction in cardiac muscle *in vitro* and *in vivo*. *Mol. Therapy.* **16**, 1594–1601.
  101. Kim S.H., Moon H.H., Kim H.A., Hwang K.C., Lee M., Choi D. 2011. Hypoxia-inducible vascular endothelial growth factor-engineered mesenchymal stem cells prevent myocardial ischemic injury. *Mol. Therapy.* **19**, 741–750.
  102. Tator C.H. 1972. Acute spinal cord injury: a review of recent studies of treatment and pathophysiology. *C.M.A. Journal.* **107**, 143–150.
  103. Naegele J.R., Maisano X., Yang J., Royston S., Ribeiro E. 2010. Recent Advancements in Stem Cell and Gene Therapies For Neurological Disorders and Intractable Epilepsy. *Neuropharmacology.* **58**, 855–864.
  104. Rao M.S., Hattiangady B., Rai K.S., Shetty A.K. 2007. Strategies for promoting anti-seizure effects of hippocampal fetal cells grafted into the hippocampus of rats exhibiting chronic temporal lobe epilepsy. *Neurobiol. Dis.* **27**, 117–132.
  105. Kim H.J., Oh J.S., An S.S., Pennant W.A., Gwak S.-J., Kim A.N., Han P.K., Yoon D.H., Kim K.N., Ha Y. 2012. Hypoxia-specific GM-CSF-overexpressing neural stem cells improve graft survival and functional recovery in spinal cord injury. *Gene Therapy.* **19**, 513–521.
  106. Selden R.F., Skoskiewicz M.J., Howie K.B., Russell P.S., Goodman H.M. 1987. Implantation of genetically engineered fibroblasts into mice: implications for gene therapy. *Science.* **236**, 714–718.
  107. Groskreutz D.J., Sliwkowski M.X., Gorman C.M. 1996. Genetically engineered proinsulin constitutively processed and secreted as mature, active insulin. *J. Biol. Chem.* **269**, 6241–6245.
  108. Simonson G.D., Groskreutz D.J., Gorman C.M., MacDonald M.J. 1996. Synthesis and processing of genetically modified human proinsulin by rat myoblast primary cultures. *Hum. Gene Therapy.* **7**, 71–78.
  109. Shifrin A., Auricchio A., Yu Q.C., Wilson J., Raper S.E. 2001. Adenoviral vector-mediated insulin gene transfer in the mouse pancreas corrects streptozotocin-induced hyperglycemia. *Gene Therapy.* **8**, 1480–1489.
  110. Auricchio A., Gao G.P., Yu Q.C., Raper S., Rivera V.M., Clackson T., Wilson J.M. 2002. Constitutive and regulated expression of processed insulin following *in vivo* hepatic gene transfer. *Gene Therapy.* **9**, 963–971.
  111. Thule P.M., Liu J., Phillips L.S. 2000. Glucose regulated production of human insulin in rat hepatocytes. *Gene Therapy.* **7**, 205–214.
  112. Olson D.E., Paveglio S.A., Huey P.U., Porter M.H., Thulé P.M. 2003. Glucose responsive hepatic insulin gene therapy of spontaneously diabetic BB/Wor rats. *Hum. Gene Therapy.* **14**, 1401–1413.
  113. Chen R., Meseck M., Woo S. 2001. Auto-regulated hepatic insulin gene expression in type 1 diabetic rats. *Mol. Therapy.* **3**, 584–590.
  114. Rasouli M., Ahmad Z., Omar A.R., Allaudin Z.N. 2011. Engineering an L-cell line that expresses insulin under the control of the glucagon-like peptide-1 promoter for diabetes treatment. *BMC Biotechnol.* **11**, 99.
  115. Han J., McLane B., Kim E.H., Yoon J.W., Jun H.S. 2011. Remission of diabetes by insulin gene therapy using a hepatocyte-specific and glucose-responsive synthetic promoter. *Mol. Therapy.* **19**, 470–478.
  116. Okitsu T., Kobayashi N., Jun H.S., Shin S., Kim S.J., Han J., Kwon H., Sakaguchi M., Totsugawa T., Kohara M., Westerman K.A., Tanaka N., Leboulch P., Yoon J.W. 2004. Transplantation of reversibly immortalized insulin-secreting human hepatocytes controls diabetes in pancreatctomized pigs. *Diabetes.* **53**, 105–112.
  117. Chen N.K., Wong J.S., Kee I.H., Lai S.H., Thng C.H., Ng W.H., Ng R.T., Tan S.Y., Lee S.Y., Tan M.E., Sivalingam J., Chow P.K., Kon O.L. 2008. Nonvirally modified autologous primary hepatocytes correct diabetes and prevent target organ injury in a large preclinical model. *PLoS One.* **3**, e1734.
  118. Kobinger G.P., Deng S., Louboutin J.-P., Vátamaniuk M., Rivera V. Lian M.-M., Markmann J.F., Clack-



- son T., Raper S.E., Matschinsky F., Wilson J.M. 2005. Pharmacologically regulated regeneration of functional human pancreatic islets. *Mol. Therapy*. **11**, 105–111.
119. Rowzee A.M., Cawley N.X., Chiorini J.A., Di Pasquale G. 2011. Glucagon-like peptide-1 gene therapy. *Exp. Diabetes Res.* 601047 epub.
120. Chen S., Shimoda M., Chen J., Matsumoto S., Grayburn P.A. 2012. Transient overexpression of cyclin D2/CDK4/GLP1 genes induces proliferation and differentiation of adult pancreatic progenitors and mediates islet regeneration. *Cell Cycle*. **11**, 695–705.
121. Coulter J.A., McCarthy H.O., Worthington J., Robson T., Scott S., Hirst D.G. 2008. The radiation-inducible pE9 promoter driving inducible nitric oxide synthase radiosensitizes hypoxic tumour cells to radiation. *Gene Therapy*. **15**, 495–503.
122. Ogawa R., Morii A., Watanabe A., Cui Z.G., Kagiya G., Fukuda S., Kume K., Hasegawa T., Hatashita M., Izumi H., Ishimoto T., Feril L.B. 2012. Development of a therapeutically important radiation induced promoter. *Bioengineering*. **4** [Epub ahead of print].
123. Ye H., Daoud-El Baba M., Peng R.W., Fussenegger M. 2011. A synthetic optogenetic transcription device enhances blood-glucose homeostasis in mice. *Science*. **332**, 1565–1568.
124. Stanley S.A., Gagner J., Damanpour S., Yoshida M., Dordick J.S., Friedman J.M. 2012. Radio-wave heating of iron oxide nanoparticles can regulate plasma glucose in mice. *Science*. **336**, 604–608.
125. Tuerk C., Gold L. 1990. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*. **249**, 505–510.
126. Lee J.F., Hesselberth J.R., Meyers L.A., Ellington A.D. 2004. Aptamer database. *Nucl. Acids Res.* **32**, D95–D100.
127. Yarnell W.S., Roberts J.W. 1999. Mechanism of intrinsic transcription termination and antitermination. *Science*. **284**, 611–615.
128. Gusarov I., Nudler E. 1999. The mechanism of intrinsic transcription termination. *Mol. Cell*. **3**, 495–504.
129. Mandal M., Boese B., Barrick J.E., Winkler W.C., Breaker R.R. 2003. Riboswitches control fundamental biochemical pathways in bacillus subtilis and other bacteria. *Cell*. **113**, 577–586.
130. Winkler W.C., Cohen-Chalamish S., Breaker R.R. 2002. An mRNA structure that controls gene expression by binding FMN. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **99**, 15908–15913.
131. Mandal M., Breaker R.R. 2003. Adenine riboswitches and gene activation by disruption of a transcription terminator. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 29–35.
132. Weigand J.E., Sues B. 2007. Tetracycline aptamer-controlled regulation of pre-mRNA splicing in yeast. *Nucl. Acids Res.* **35**, 4179–4185.
133. Rentmeister A., Mayer G., Kuhn K., Famulok M. 2007. Conformational changes in the expression domain of the *Escherichia coli* thiM riboswitch. *Nucl. Acids Res.* **35**, 3713–3722.
134. Tang J., Breaker R.R. 1997. Rational design of allosteric ribozymes. *Chem. Biol.* **4**, 453–459.
135. Tang J., Breaker R.R. 1997. Mechanism for allosteric inhibition of an ATP-sensitive ribozyme. *Nucl. Acids Res.* **26**, 4214–4221.
136. Soukup B.A., Breaker R.R. 1999. Engineering precision RNA molecular switches. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **96**, 3584–3589.
137. Khvorova A., Lescoute A., Westhof E., Jayasena S.D. 2003. Sequence elements outside the hammerhead ribozyme catalytic core enable intracellular activity. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 708–713.
138. Auslander S., Ketzer P., Hartig J.S. 2010. A ligand-dependent hammerhead ribozyme switch for controlling mammalian gene expression. *Mol. BioSyst.* **6**, 807–814.
139. Nomura Y., Kumar D., Yokobayashi Y. 2012. Synthetic mammalian riboswitches based on guanine aptazymes. *Chem. Commun.* **48**, 7215–7217.
140. Liang J.C., Chang A.L., Kennedy A.B., Smolke C.D. 2012. A high-throughput, quantitative cell-based screen for efficient tailoring of RNA device activity. *Nucl. Acids Res.* **40**, e154.
141. Yen L., Svendsen J., Lee J.S., Gray J.T., Magnier M., Baba T., D'Amato R.J., Mulligan R.C. 2004. Exogenous control of mammalian gene expression through modulation of RNA self-cleavage. *Nature*. **43**, 471–476.