

**Естественные
и
Технические
науки[®]**

№ 3(65) 2013 г.

ISSN 1684-2626

Биотехнология

Грибова И.Ю., младший научный сотрудник

Тухватулин А.И., кандидат биологических наук, старший научный сотрудник

Гарас М.Н., аспирант, младший научный сотрудник

Есмагамбетов И.Б., аспирант, младший научный сотрудник

Бурмистрова Д.А., аспирант, младший научный сотрудник

Должикова И.В., аспирант, младший научный сотрудник

Кашиго Т.В., научный сотрудник

Тутыхина И.Л., кандидат биологических наук, старший научный сотрудник («Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации)

ПОЛУЧЕНИЕ E1-КОМПЛЕМЕНТИРУЮЩЕЙ КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ ДЛЯ ПРОИЗВОДСТВА РЕКОМБИНАНТНЫХ АДЕНОВИРУСОВ, СВОБОДНЫХ ОТ РЕПЛИКАТИВНО-КОМПЕТЕНТНЫХ ЧАСТИЦ, С ПОМОЩЬЮ ЛЕНТИВИРУСНОЙ ТРАНСДУКЦИИ

С помощью лентивирусной трансдукции получена клеточная линия, несущая E1A и E1B последовательности генома аденовируса. Полученная клеточная линия способна комплементировать функции E1 области аденовируса и обеспечивает размножение рекомбинантных репликативно-дефектных аденовирусных векторов без образования репликативно-компетентных аденовирусных частиц.

Ключевые слова: клеточная линия, аденовирус, лентивирусная трансдукция, репликативно-компетентные частицы.

LENTIVIRAL MEDIATED GENERATION OF E1-COMPLEMENTARY CELL LINE FOR PRODUCTION OF RECOMBINANT ADENOVIRAL VECTORS FREE OF REPLICATIVE-COMPETENT ADENOVIRAL PARTICLES

Cell subline that contains DNA sequence of E1A and E1B regions of human adenovirus genome was obtained using lentiviral transduction. Obtained cell subline is able to complement the deletion of E1 region of adenovirus genome and provides replication of recombinant E1-deleted adenovirus without generation of replicative-competent adenoviral particles.

Keywords: cell line, adenovirus, lentiviral transduction, replication competent particles.

Более 20 лет вирусы благодаря своим природным свойствам используются в качестве векторов для переноса чужеродной генетической информации в эукариотические клетки. Одним из самых распространенных типов векторов являются рекомбинантные аденовирусы. Это обусловлено достаточно большой пакующей емкостью аденовирусов (до 7500 пар оснований чужеродной ДНК), способностью трансдуцировать как делящиеся, так и постмитоти-

ческие клетки и давать высокие титры при культивировании (более 10^{11} бляшкообразующих единиц в мл (БОЕ/мл)[1].

Основная информация о свойствах и возможностях применения данного типа векторов получена для аденовируса человека 5 серотипа (Ад5). На его основе сконструировано огромное количество рекомбинантных аденовирусов, большинство из которых исследовалось с целью применения в качестве вакцин и генно-терапевтических агентов. В результате многочисленных исследований, в том числе предклинических и клинических, было доказано, что рекомбинантные Ад5 безопасны и эффективны как для животных, так и для человека.

Безопасность рекомбинантных Ад5 обеспечивается в основном полным ограничением их способности к размножению в клетках млекопитающих. Такие репликативно-дефектные вирусы содержат делецию E1 области, и для их накопления в препаративных количествах наиболее часто используется специальная клеточная линия HEK293 (эмбрионального почечного эпителия человека), комплементирующая функции E1 области [2].

Однако в процессе пассирования рекомбинантных Ад5 на данной линии клеток происходит образование ревертантов (репликативно-компетентных аденовирусов – РКА), за счет гомологичной рекомбинации между участками, фланкирующими делецию E1 области в составе генома репликативно-дефектного вируса и E1 областью аденовируса, присутствующей в геноме клеток линии HEK 293. Это приводит к постепенному вытеснению рекомбинантных Ад5 ревертантами и, как следствие, к невоспроизводимости результатов лабораторных исследований. В условиях же крупномасштабных фармацевтических производств содержание ревертантов в конечном препарате рекомбинантного Ад5 определяется нормами FDA и международных фармакопей, и превышение этих значений делает невозможным использование продукта в клинической практике [3].

Для устранения данного недостатка была создана клеточная линия Per.C6, которая, также как и HEK293, способна комплементировать функцию E1A и E1B белков, но без образования репликативно-компетентных Ад5. Однако клетки данной линии характеризуются низкой способностью адаптации к росту в бессывороточных средах. Это является существенным ограничением для крупно-масштабных фармацевтических производств, так как содержание в среде компонентов человеческого или животного происхождения ведет к риску контаминации продукта (рекомбинантного Ад5) различными инфекционными агентами. Использование же данной линии в условиях научных лабораторий не всегда бывает доступно, так как клеточная линия Per.C6 запатентована и использование ее лицензировано.

Руководствуясь этим, была поставлена цель создания клеточной линии, которая была бы способна комплементировать функцию белков E1 области вирусного генома без образования репликативно-компетентных Ад5 и пригодная для получения препаратов рекомбинантных аденовирусов как в лабораторных условиях, так и в условиях GMP-производств.

Новые клеточные линии обычно создают либо на основе первичных культур клеток, либо путем модификаций уже существующих перевиваемых культур. Так, собственно линия HEK293 была получена с помощью трансфекции первичной культуры клеток фрагментированным геномом аденовируса [4]. Линия Per.C6 также получена из первичной культуры клеток – ретинобластов эмбриона человека. Из перевиваемых культур для получения клеточной линии, обеспечивающей размножение репликативно-дефектных Ад5, были использованы клетки линии HELA (линии GH329, HeLa-E1, UR) и A549 (линия pTG6559). Однако ни одна из этих линий в настоящее время не используются, так как HELA и ее производные обладают высокой туморогенной активностью, а pTG6559 - низким уровнем продукции рекомбинантных Ад5 из-за отсутствия экспрессии гена E1B-55kDa.

Для введения фрагментов генома аденовируса в клетки с целью получения новых линий часто использовались плазмидные конструкции [5]. В результате этого получают относительно малое количество трансформированных клонов клеток, что затрудняет последующую

стадию селекции, что в целом снижает вероятность получения линии клеток с заданными свойствами.

Как указывалось выше, наиболее эффективным способом доставки чужеродной генетической информации в клетки являются вирусные векторы. Для создания клеточных линий в настоящее время применяются векторы на основе ретровирусов. Это обусловлено их способностью интегрироваться в геном клетки и существовать в таком состоянии достаточно долго, что и используется для создания стабильных клеточных линий. В настоящее время созданы и используются векторы как на основе онкоретровирусов, так и на основе лентивирусов. Однако применение онкоретровирусов ограничено их неспособностью трансдуцировать неделящиеся клетки. [6]. Также для онкоретровирусных векторов характерна низкая эффективность трансдукции редко делящихся клеток и несинхронизированных культур, в которых клетки находятся на разных стадиях клеточного цикла. Поскольку лентивирусы в сравнении с онкоретровирусами имеют более сложную организацию генома, они способны трансдуцировать как делящиеся, так и неделящиеся клетки. Способность лентивирусов эффективно трансдуцировать неделящиеся клетки обусловлена несколькими дополнительными вирусными белками: интегразы [7], матриксного белка - продукта гена Gag [8], вспомогательного протеина Vpr [9]

Кроме того геном лентивирусов содержит относительно меньшее количество CpG динуклеотидов, чем геном онкоретровирусов, что делает их более устойчивыми к клеточным механизмам подавления экспрессии, поэтому доставка генов с помощью лентивирусов больше подходит для случаев, когда необходима длительная экспрессия трансгена. [10]

Целью нашей работы было получение модифицированной клеточной линии на основе клеток аденокарциномы легкого человека A549 с помощью трансдукции рекомбинантными лентивирусными векторами, несущими гены E1A, E1B-19кДа и E1B-55кДа.

Материалы

Клеточные линии

Клеточные линии 293 (эмбриональной почки человека), 293T, A549 (карцинома легкого человека), HCT116 (карцинома толстой кишки человека), HCT116/wafConAGal (карцинома толстой кишки человека, несущая ген β -галактозидазы под контролем p53 зависимого промотора) культивировали на среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной сыворотки крови телят. **Бактериальные штаммы**

В работе использован лабораторный штамм *Escherichia coli* DH5 α . Трансформацию клеток лабораторных штаммов *E.coli* DH5 α проводили кальциевым методом [11].

Плазмидную ДНК в аналитических количествах выделяли из клеток *E.coli* штамма DH5 α методом кипячения [12].

Плазмидную ДНК в препаративных количествах выделяли из штамма *E.coli* DH5 α набором JETSTAR 2.0 Plasmid Midiprep Kit (Genomed).

Плазмидные конструкции

Использовали стандартные плазмидные векторы pGEM-T Easy ("Promega" США), pLRV 6.9, pLV-CMV-Neo, pCMV Δ 8.2, pVSV-G (Clontech, США).

Вирусы

В работе использован аденовирус человека 5 серотипа «дикого типа» - Ad5-wt, рекомбинантный аденовирус человека, несущий ген бета-галактозидазы - Ad5-LacZ. Аденовирусы человека накапливали в культуре клеток линии 293 по методике Green [13]. Очистку и концентрирование аденовирусов проводили ультрацентрифугированием в градиенте плотности CsCl [13]. Титрование аденовирусов проводили методом бляшкообразования [14].

ДНК аденовирусов выделяли из очищенных вирионов по модифицированному методу van der Eb [15].

Ферменты и другие реактивы

В работе использовались коммерческие препараты специфических эндонуклеаз рестрикции и других ферментов фирм "Fermentas MBI" (Литва), "Promega" (США) и NE BioLabs (США).

Для приготовления буферных и других растворов использовали соли и другие реактивы фирм "Serva" (Германия), "Pharmacia" (Швеция), "Sigma" (США), "Merck" (Германия) а также соли производства "Реахим" (Россия) маркировки х.ч. и о.с.ч.

Синтез праймеров был выполнен в ООО «Синтол».

Методы

Получение лентивирусного препарата

Трансфекцию клеточной линии 293Т проводили стандартным методом кальциево-фосфатной преципитации [16] на чашках Петри с диаметром 6см 10 мкг смеси трех плазмид: pVSVG (кодирует поверхностный гликопротеин) pCMVΔR8.2 (пакующая плаزمид), pLV-Neo-E1A, взятых в соотношении 1:3:3. В качестве контроля условий и эффективности трансфекции в смесь ДНК добавляли 0,5 мкг плазмидной ДНК pCMV-EGFP, кодирующей зеленый флуоресцирующий белок.

Культуральную среду трансфицированных клеток, содержащую рекомбинантный лентивирусный вектор LV-Neo-E1A, собирали через 48 часов после трансфекции и фильтровали через нейлоновый фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Аналогично получали лентивирусный вектор LRV-E1B.

Получение модифицированной линии клеток

Клеточные линии HCT116/wafConAGal и A549 рассевали на 6 луночный планшет в количестве 5×10^5 клеток на лунку. Через 24 часа к полученному клеточному монослою добавляли лентивирусный вектор LV-Neo-E1A или LRV-E1B, инкубировали 24 часа. Контрольные клетки оставляли интактными. Трансдуцированные клеточные сублинии и контрольные клетки культивировали в среде DMEM в присутствии G418 (500 мкг/мл) или бластицидина (10 мкг/мл). Пересев клеточных культур проводился раз в 3 дня с кратностью разведения 1:3 до полной гибели клеток в лунках с контрольными клетками. Полученные клеточные сублинии проверяли на наличие последовательности трансгена в геномной ДНК методом ПЦР.

ONPG тест.

Анализ проводили в лунках 96 луночного планшета.

Клетки промывали фосфатно-солевым буфером и лизировали при комнатной температуре в 20 минут в 50 мкл буфера, содержащего 20 mM HEPES, pH 7.9, 0.1% NP-40 и 5 mM ЭДТА. Затем добавляли 100 мкл ONPG-содержащего буфера (72 mM Na₂PO₄, pH 7.5, 1 мг/мл ONPG, 12 mM MgCl₂, и 180 mM 2-меркаптоэтанола) и инкубировали при комнатной температуре.

После появления характерной желтой окраски раствора реакцию останавливали добавлением 100 мкл 1 M Na₂CO₃ и проводили измерение оптической плотности на планшетном спектрофотометре при длине волны 414 нм (Multiskan MS; Thermo Fisher Scientific).

Определение экспрессии β-галактозидазы in vitro с помощью окрашивания X-gal

Культуры клеток, зараженную аденовирусом Ad5-LacZ фиксировали (в 10% формалине, растворенном фосфатно-солевом буфере, pH7,4) 4 часа при температуре 4°C и окрашивали раствором, содержащем: 5мМ K₄Fe(CN)₆, 5мМ K₃Fe(CN)₆, 2мМ MgCl₂ и 200мкг/мл X-gal [17].

Результаты и их обсуждение

Получение плазмидных конструкций

Клонирование E1A и E1B областей генома Ad5 в плазмидный вектор pGEM-T-Easy проводили методом ПЦР, используя праймеры, фланкирующие эти области: E1A-forw 5'-gcc-agc-gag-tag-agt-ttt-ctc-c, E1A-rev 5'-ctc-att-cag-caa-aca-aag-gcg, E1B-forw 5'-ctg-ctg-tgc-gta-act-tgc-tgg, E1B-rev 5'-ctc-aca-atg-ctt-cca-tca-aac.

Плазмида pLV-Neo-E1A была получена путем субклонирования фрагмента генома аденовируса размером 1069 п.о. (509-1578 п.о.) из плазмиды pGEM-T-E1A в плазмиду pLV-NEO по сайту эндодезоксирибонуклеазы рестрикции EcoRI.

Плазмида pLRV-E1B была получена путем субклонирования фрагмента генома аденовируса размером 1888 п.о. (1748-3636 п.о.) из плазмиды pGEM-T-E1B в плазмиду pLRV-6.9 по сайту эндодезоксирибонуклеазы рестрикции EcoRI. Наличие вставки и ее правильная ориентация проверялась ПЦР и рестрикционным картированием.

Получение лентивирусных векторов

Лентивирусный вектор LV-Neo-E1A был получен путем котрансфекции клеток линии 293T тремя плазмидами (pLV-Neo-E1A, pCMV Δ 8.2, pVSV-G), обеспечивающими правильную сборку вирионов лентивируса, методом кальциево-фосфатной преципитации по Graham.

Аналогично получали лентивирусный вектор LRV-E1B.

Получение клеточных сублиний, стабильно экспрессирующих E1A и E1B белки генома Ad5

Для получения клеточных сублиний HCT116-E1B, HCT116-E1A, A549-E1B и A549-E1A использовали препараты соответствующих рекомбинантных лентивирусов, которые добавляли в культуральную среду клеток линий HCT116/wafConAGal и A549. Селекцию инфицированных клеток проводили по устойчивости к антибиотикам бластицидину и G418, последовательности генов которых кодируют плазмидные вектора pLRV-6.9 и pLV-NEO. Наличие последовательностей E1A и E1B белки генома Ad5 в геноме полученных сублиний определяли методом ПЦР, используя пары праймеров, фланкирующих участки 300 п.о. внутри E1A и E1B областей. Генетическую стабильность полученных сублиний оценивали в течение по крайней мере 20 пассажей.

Оценка функциональной активности белков E1A области генома аденовируса человека 5 серотипа в составе полученных сублиний

Функциональную активность белков E1A области определяли по способности белков E1A области облегчать репликацию аденовируса в зараженных им клетках. Для этого клетки линии 293, A549, а также полученные сублинии A549-E1A и A549-E1B заражали аденовирусом Ad5-LacZ несущим ген β -галактозидазы с множественностью инфекции 0,5. Зараженные клетки собирали через 24, 48, 72, 96 и 120 часов после инфекции, трижды перемораживали, после чего серийные разведения клеточных лизатов добавляли к клеткам линии 293. Через 24 часа в зараженных клетках определили экспрессию β -галактозидазы с помощью окрашивания X-gal и подсчитали количество трансдуцированных клеток. Титры аденовируса Ad5-LacZ в полученных клеточных лизатах выразили через количество трансдуцирующих единиц в мл (ТЕ/мл).

Из рисунка 1 видно, что степень репликации аденовируса в клеточной линии A549-E1A заметно выше по сравнению с линиями клеток A549-E1B и контрольной A549, но ниже по сравнению с линией 293. Полученный результат показывает функциональную активность полученной генетической конструкции в составе генома сублинии A549-E1A. Низкие титры затравочных препаратов, полученных на сублинии A549-E1A, обусловлены возможной низкой копийностью E1A области в геноме трансдуцированных клеток, что связано с проапоптотической способностью белков E1A области. Проапоптотическая активность белков E1A области ингибируется при коэкспрессии E1A и E1B областей [18 19 .]. Кодированные E1B областью белки молекулярной массы 19 и 55 килодальтон (E1B 19K и E1B 55K) усиливают трансформирующую способность белков E1A области, позволяют избежать программируемой клеточной смерти, индуцируемой белками E1A области, и позволяет достичь максимально эффективной репликации рекомбинантных репликативно-дефектных аденовирусов [20]. Поэтому для получения клеточной линии, способной к более эффективной комплементации E1 области, целесообразно введение функционально активной E1B области в геном полученной сублинии A549-E1A

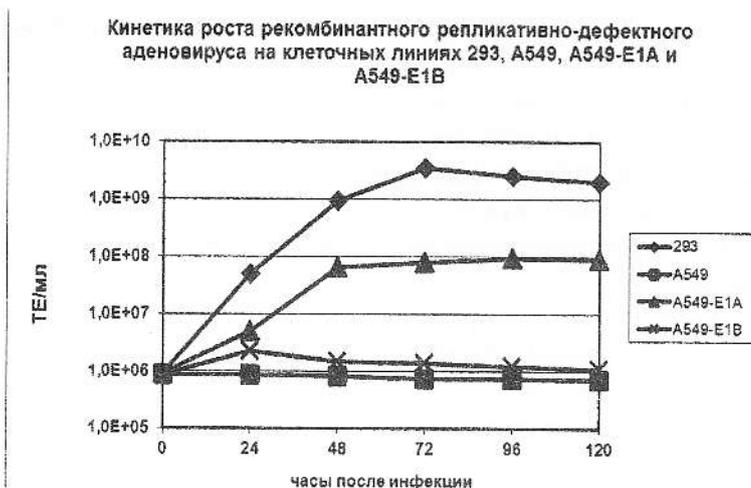


Рис. 1. Кинетика роста рекомбинантного репликативно-дефектного аденовируса на клеточных линиях 293, A549, A549-E1A и A549-E1B

Оценка экспрессии и функциональной активности белков E1B области генома аденовируса 5 серотипа в полученной клеточной сублинии

Функциональную активность белков E1B области определяли по способности белков E1B области проявлять антиапоптотическую активность за счет ингибирования функции белка p53 [21]. Для этого была использована клеточная линия HCT116/wafConAGal, содержащая в своем геноме респонсивный элемент, в котором ген β-галактозидазы находится под контролем p53-зависимого промотора. На ее основе с помощью лентивирусной трансдукции векторами LRV-E1B и LV-Neo-E1A были получены сублинии HCT116-E1B, HCT116-E1A,

Активацию гена p53 вызывали 5-фторурацилом (2,5 мМ), уровень p53-зависимой экспрессии β-галактозидазы определяли по ONPG тесту.

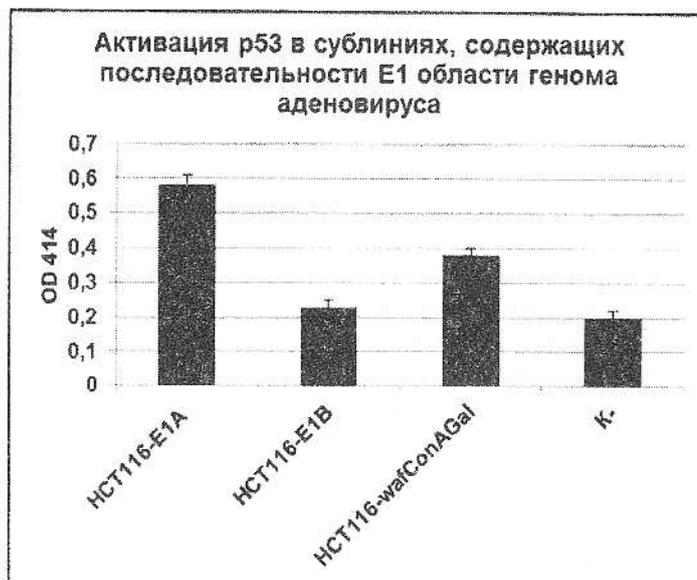


Рис. 2. Уровень p53-зависимой трансактивации в клеточных сублиниях, несущих последовательности E1 области аденовируса.

Введение E1B области генома аденовируса 5 серотипа ингибировать функцию белка p53 в полученной сублинии HCT116-E1B, в то время как в HCT116-E1A, содержащей E1A область, обладающую проапоптотическими свойствами, уровень p53-зависимой трансактива-

нии повышен по сравнению с исходной клеточной линией HCT116/wafConAGal. Таким образом, показано антитапоптотическое влияние E1B области генома аденовируса 5 серотипа на полученную сублинию клеток HCT116-E1B, что доказывает функциональную активность полученной генетической конструкции.

Получение клеточной сублинии, коэкспрессирующей белки E1A и E1B областей генома Ad5, и проверка ее комплементарности способности.

Для получения клеточной сублинии A549-E1AE1B клетки линии A549 трансдуцировали рекомбинантным лентивирусом pLRV-E1B, селекцию инфицированных клеток проводили по устойчивости к антибиотику бластицидину. Наличие последовательностей E1B белки генома Ad5 в геноме полученной сублинии определяли методом ПЦР. Затем полученную сублинию трансдуцировали рекомбинантным лентивирусом pLV-neo-E1A, селекцию инфицированных клеток проводили по устойчивости к G418 бластицидину. Наличие последовательностей E1A белки генома Ad5 в геноме полученной сублинии определяли методом ПЦР. Последовательное введение E1B и E1A областей генома аденовируса с помощью лентивирусных трансдукций обеспечивает наличие последовательности как E1B области, так и E1A области в геноме полученной сублинии и лучшую выживаемость клеточной сублинии.

Полученную сублинию A549-E1AE1B проверяли на способность обеспечивать репликацию репликативно-дефектного аденовируса в зараженных им клетках. Для этого клетки линии 293, A549, а также полученные сублинии A549-E1A и A549-E1AE1B заражали аденовирусом Ad5-LacZ несущим ген β-галактозидазы с множественностью инфекции 0,5. Зараженные клетки собирали через 24, 48, 72, 96 и 120 часов после инфекции, трижды перемораживали, после чего серийные разведения клеточных лизатов добавляли к клеткам линии 293. Через 24 часа в зараженные клетках определили экспрессию β-галактозидазы с помощью окрашивания X-gal и подсчитали количество трансдуцированных клеток. Титры аденовируса Ad5-LacZ в полученных клеточных лизатах выразили через количество трансдуцирующих единиц в мл (ТЕ/мл).

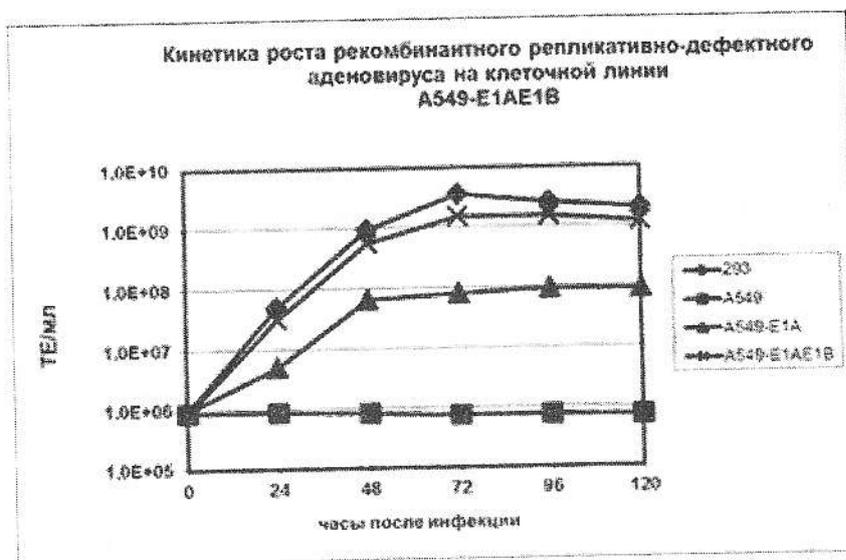


Рис. 3. Кинетика роста рекомбинантного репликативно-дефектного аденовируса на клеточных линиях A549-E1AE1B

Из рисунка 3 видно, что степень репликации аденовируса в клеточной линии A549-E1AE1B заметно выше по сравнению с линиями клеток A549 и A549-E1A и сравнима с линией 293.

Клеточную сублинию A549-E1AE1B проверяли на способность поддерживать бляшкообразование рекомбинантного репликативно-дефектного аденовируса. Для этого в монослой клеток линии 293, A549, а также A549-E1AE1B вносили серийные десятикратные разведения рекомбинантного аденовируса Ad5-LacZ, несущего ген β -галактозидазы. Бляшкообразование детектировали при помощи окрашивания нейтральным красным через 10 суток после инфекции. Количество БОЕ подсчитывали, вычисляли относительную бляшкообразующую способность, приняв титр рекомбинантного аденовируса Ad5-LacZ на клетках линии 293 за 100%.

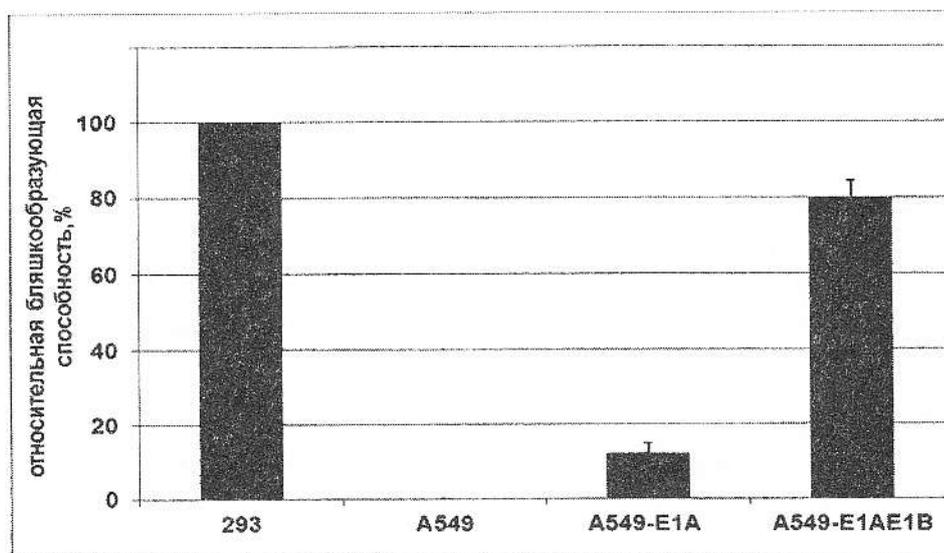


Рис. 4. Относительная бляшкообразующая способность рекомбинантного репликативно-дефектного аденовируса на клеточных линиях 293, A549, A549-E1A, A549-E1AE1B

Из рисунка 4 видно, что степень репликации аденовируса в клеточной линии A549-E1AE1B заметно выше по сравнению с линиями клеток A549-E1A и контрольной A549 и сравнима с линией 293.

Детекция репликативно-компетентных аденовирусных частиц в препаратах, полученных при многократном пассировании рекомбинантного аденовируса на полученной сублинии A549-E1AE1B

Репликативно-дефектный рекомбинантный аденовирус Ad5-LacZ пассировали на культурах клеток 293, A549-E1A, A549-E1AE1B, в течение 20 пассажей. Для первого заражения использовали Ad5-LacZ с множественностью инфекции 50. Исходные клеточные линии, а также клеточный лизат, полученный на 1, 10, 19 пассаже анализировали в помощью ПЦР-РВ на наличие ДНК репликативно-компетентных аденовирусных частиц. ДНК репликативно-компетентных аденовирусных частиц обнаруживалась на 10 пассаже при пассировании на 293 клетках и не обнаруживалась при пассировании на A549-E1AE1B. Титры затравочного препарата, полученного на сублинии A549-E1A не позволяли провести пассирование Ad5-LacZ больше 3 пассажей.

Заключение

В данной работе показана возможность получения E1-комплементирующей клеточной линии для получения препаратов аденовирусов, свободных от РКА, с помощью лентивирусных векторов.

Клеточная сублиния А549-Е1АЕ1В получена с помощью лентивирусной котрансдукции, обеспечивающей изолированную локализацию последовательностей Е1А и Е1В областей генома аденовируса в составе генома трансдуцированной клеточной линии. Полученная сублиния обеспечивает размножение репликативно-дефектного рекомбинантного аденовируса. Сравнительная оценка способности обеспечивать появление РКА при многократном пассировании показывает, что затравочные препараты, полученные на трансдуцированной сублинии А549-Е1АЕ1В не содержат «дикого типа» по крайней мере в течение 20 последовательных пассажей.

Полученные функционально активные рекомбинантные лентивирусные вектора будут использованы для получения трансформированных клеточных линий, способных комплементировать функцию Е1А и Е1В белков без образования РКА, на основе первичных нетуморогенных клеточных линий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Тутыхина И.Л., Безбородова О.А., Верховская Л.В., Шмаров М.М., Логунов Д.Ю., Немцова Е.Р., Народицкий Б.С., Якубовская Р.И., Гинцбург А.Л. Рекомбинантная псевдоаденовирусная наноструктура с геном лактоферрина человека: получение, изучение экспрессии и свойств лактоферрина при ее применении *in vivo*. // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2009. № 1. С. 27-31
2. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. // Journal of General Virology. 1977. V. 36(1). p. 59-74.
3. Marzio G, Kerkvliet E, Bogaards JA, Koelewijn S, De Groot A, Gijsbers L, Weverling GJ, Vogels R, Havenga M, Custers J, Pau MG, Guichoux JY, Lewis J, Goudsmit J. A replication-competent adenovirus assay for E1-deleted Ad35 vectors produced in PER.C6 cells. // Vaccine. 2007 v. 25(12). P. 2228-2237.
4. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5.. // Journal of General Virology. 1977. v. 36(1). P. 59-74.
5. Guangping Gao, James M. Wilson. Cell lines and constructs useful in production of E1-deleted adenoviruses in absence of replication competent adenovirus. // United States Patent 6365394. 2000.
6. Lewis PF, Emerman M. Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. // Journal of Virology. 1994. V. 68. P. 510-516.
7. Briones MS, Chow SA. A new functional role of HIV-1 integrase during uncoating of the viral core. // Immunologic Research. 2010 v. 48(1-3). P. 14-26.
8. Yamashita M, Emerman M. Capsid is a dominant determinant of retrovirus infectivity in nondividing cells. // Journal of Virology. 2004. V. 78(11). P. 5670-5678.
9. Wang J, Reuschel EL, Shackelford JM, Jeang L, Shivers DK, Diehl JA, Yu XF, Finkel TH. HIV-1 Vif promotes the G1- to S-phase cell-cycle transition. // Blood. 2011. V. 117(4). P. 1260-1269.
10. Pfeifer A, Ikawa M, Dayn Y, Verma IM. Transgenesis by lentiviral vectors: lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos. // Proc Natl Acad Sci USA. 2002. V. 99. P. 2140-2145.
11. Hanahan D. Studies of transformation of *Escherichia coli* with plasmids. // Journal of Molecular Biology. 1983. v.166, p. 557-580,
12. Holmes D., Quigley M. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. // Analytical Biochemistry. 1981, v. 114, p. 193.
13. Green M., Wold W.S.M. Human adenoviruses: growth, purification and transfection assay. // Methods Enzymology. 1980, v. 58. p. 425-431
14. Graham F.L. and van der Eb A.J. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. // Virology. 1973. v. 52, p. 456-467.

15. *Van der Eb A.J., van Kesteren J.W., van Bruggen E.F.J.* Structural properties of adenovirus DNAs. // *Biochem. Biophys. Acta*, 1969, v. 182, p. 530-541.
16. *Graham F.L. and Prevec L.* Manipulation of adenovirus vectors. // *Methods in Molecular Biology*. 1994, v. 7, p. 109-127.
17. *Li Z., A. Rakkar, et al.* Efficacy of multiple administration of a recombinant adenovirus expressing wild-type p53 in an immune-competent mouse tumor model. // *Gene Therapy*. 1998. v. 5. p. 605-613.
18. *Houweling, A., van den Elsen, P. J., and van der Eb, A. J.* Partial transformation of primary rat cells by the leftmost 4.5% fragment of adenovirus 5 DNA. // *Virology*. 1980. V. 105. P. 537 – 550.
19. *Gallimore, P. H., Grand, R. J., and Byrd, P. J.* Transformation of human embryo retinoblasts with simian virus 40, adenovirus and ras oncogenes. *Anticancer Research*. 1986. V. 6. P. 499 – 508.
20. *Berk, A. J.* Adenovirus promoters and E1A transactivation. // *Annual Review of Genetics*. 1986. v. 20. P. 45-79.
21. *Querido E, Blanchette P, Yan Q, Kamura T, Morrison M, Boivin D, Kaelin WG, Conaway RC, Conaway JW, Branton PE.* Degradation of p53 by adenovirus E4orf6 and E1B55K proteins occurs via a novel mechanism involving a Cullin-containing complex. // *Genes & Development*. 2001. V. 15(23). P. 3104-3117.