

УДК 577.216.9

ЭФФЕКТИВНЫЙ И СПЕЦИФИЧНЫЙ КОНТРОЛЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *AML1/ETO* В КЛЕТКАХ ОСТРОГО МИЕЛОИДНОГО ЛЕЙКОЗА С ПОМОЩЬЮ РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИИ, ОСНОВАННОЙ НА ЛЕНТИВИРУСНОЙ ТРАНСДУКЦИИ

© 2011 г. В. В. Гринеv^{1*}, Д. В. Посредник¹, О. Heidenreich²

¹Кафедра генетики Биологического факультета Белорусского государственного университета, Минск, 220030, Республика Беларусь

²Northen Institute for Cancer Research at Newcastle University, Newcastle upon Tyne, NE2 4HH, UK

Поступила в редакцию 16.04.2010 г.

Принята к печати 02.09.2010 г.

Нами предложен и успешно апробирован метод контроля экспрессии гибридного гена *aml1/eto* в клетках острого миелоидного лейкоза (ОМЛ), содержащих транслокацию t(8;21)(q22;q22). Разработанный подход основан на использовании методологии РНК-интерференции (РНКи) и лентивирусной трансдукции. Сконструировано и испытано два набора лентивирусных векторов доставки для запуска конститутивной анти-*aml1/eto* РНК-интерференции в лейкозных клетках с помощью (1) искусственных микроРНК (miРНК) и (2) коротких шпилечных РНК (shРНК). Показано, что проведение трансдукции с использованием любого из этих наборов позволяет эффективно модифицировать лейкозные клетки линий Kasumi-1 и SKNO-1; при этом процент модифицированных клеток можно легко контролировать, манипулируя таким показателем как множественность инфекции (МОИ). Так, при МОИ 40 для клеток линии Kasumi-1 и МОИ 20 для линии SKNO-1 содержание модифицированных клеток превышает 90%. При сравнительном анализе уровня нокдауна гена *aml1/eto* с помощью конститутивной РНК-интерференции показано, что эффективность подавления экспрессии целевого гена в клетках Kasumi-1 и SKNO-1 выше при использовании вектора, несущего анти-*aml1/eto* shРНК. Мы надеемся, что предлагаемый нами подход для контроля экспрессии гена *aml1/eto* будет востребован при изучении функциональной значимости этого гена как в системах *in vitro*, так и *in vivo*.

Ключевые слова: ген *aml1/eto*, РНК-интерференция, лентивирусная трансдукция, лейкозные клетки, нокдаун белка AML1/ETO.

EFFECTIVE AND SPECIFIC CONTROL OF *AML1/ETO* GENE EXPRESSION IN ACUTE MYELOID LEUKEMIA CELLS BY LENTIVECTOR-BASED RNA-INTERFERENCE, by V. V. Grinev^{1*}, D. V. Posrednik¹, O. Heidenreich² (¹Department of Genetics, Faculty of Biology, Belarusian State University, Minsk, 220030 Republic of Belarus, *e-mail: grinev_vv@bsu.by; ²Northen Institute for Cancer Research at Newcastle University, Newcastle upon Tyne, NE2 4HH, UK). In presented work, new approach for the control of *aml1/eto* gene expression in t(8;21)(q22;q22)-positive acute myeloid leukemia cells has been developed. The technique is based on using the RNA-interference and lentiviral transduction methodology. Two new lentiviral vector sets for induction of constitutive anti-*aml1/eto* RNA-interference in acute myeloid leukemia cells have been developed and tested. The first set was based on use of artificial microRNAs (miRNAs) and second one was intended for production of short hairpin RNAs (shRNAs). It was shown that Kasumi-1 and SKNO-1 leukemia cells can be efficiency transduced by each new lentiviral vector. Moreover, the percent of modified leukemia cells that may be easily evaluated in multiplicity of infection (MOI) test achieved more than 90% for Kasumi-1 and SKNO-1 cells at MOI 40 and 20, respectively. Comparative study elucidated that the anti-*aml1/eto* shRNA-based approach induced a stronger knock-down of *aml1/eto* gene in Kasumi-1 and SKNO-1 cells than the miRNA-based method did. We hope that the proposed approach may become useful instrument for controlling the *aml1/eto* gene expression *in vitro* as well as *in vivo* investigations of function and biological role of the gene.

Keywords: *aml1/eto* gene, RNA-interference, lentiviral transduction, leukemia cells, AML1/ETO protein knockdown.

Принятые сокращения: DsRed1 (Discosoma red fluorescent protein 1) – красный флуоресцирующий белок; EGFP (enhanced green fluorescent protein) – усиленный зеленый флуоресцирующий белок; MOI (multiplicity of infection) – множественность инфекции; miРНК (microRNA) – микроРНК; shРНК (small hairpin RNA) – короткие шпилечные РНК; siРНК (small interfering RNA) – короткие интерферирующие РНК; ОМЛ – острый миелоидный лейкоз; РНКи – РНК-интерференция.

* Эл. почта: grinev_vv@bsu.by

ВВЕДЕНИЕ

Транслокация t(8;21)(q22;q22) между хромосомами 8 и 21 относится к наиболее распространенным генетическим нарушениям при остром миелоидном лейкозе (ОМЛ) [1]. В результате транслокации происходит объединение гена *eto*, который локализован на хромосоме 8, с находящимся на 21-й хромосоме геном *aml1* в единый гибридный ген *aml1/eto* на хромосоме 8 [2]. Этот ген кодирует гибридный белок AML1/ETO, который, по-видимому, и играет ключевую роль в инициации t(8;21)(q22;q22)-положительной формы ОМЛ, блокируя нормальный ход гемопоэтической дифференцировки. Однако играет ли ген *aml1/eto* какую-то роль в поддержании уже сформировавшегося ОМЛ, остается неизвестным. Эта неопределенность не позволяет рассматривать ген *aml1/eto*, а также продукты его экспрессии (РНК или белок) как потенциальную мишень для разработки новых селективных ингибиторов в лечении ОМЛ.

В исследованиях, проведенных нами ранее, показано, что для изучения функциональной активности гена *aml1/eto* можно с успехом использовать РНК-интерференцию (РНКи) с помощью синтетических коротких интерферирующих РНК (siРНК), нацеленных на мРНК гена *aml1/eto* [3, 4]. Однако при такой стратегии не удается добиться полной элиминации белка AML1/ETO из лейкозных клеток; кроме того, подавление экспрессии гена *aml1/eto* носит кратковременный характер и, значит, неприемлемо при проведении длительных функциональных исследований этого гена (например, на животных).

Альтернативой вышеизложенной стратегии может стать следующая: использование ретро- или лентивирусных векторов для доставки в лейкозные клетки генов, кодирующих либо искусственные микроРНК (miРНК), либо короткие шпилечные РНК (shРНК). Принципиальная действенность такого подхода продемонстрирована в работе [5] на модели мышинной линии фибробластов SC1 с эктопической экспрессией гена *aml1/eto*. Однако авторы не учли ряд параметров, влияющих на эффективность и специфичность РНКи. Так, для трансгеноза клеток линии SC1 использована кДНК только одного из 100 вариантов РНК гена *aml1/eto*, которые образуются в лейкозных клетках [6, 7]; при этом не учтено соотношение уровня эктопической экспрессии гена *aml1/eto* с уровнем его реальной экспрессии в лейкозных клетках, что может влиять на эффективность РНКи. Кроме того, в представленной работе практически не уделено внимания анализу специфичности анти-*aml1/eto* РНКи. Наконец, при проведении функциональных исследований гена *aml1/eto* на моделях ксенотрансплантата лейкоза более приемлемым вариантом считается не конститутивная, а индуцибельная РНКи с использованием индуцибельных PolIII-промоторов. А в рабо-

те [5] апробирован только вариант лентивирусных векторов, экспрессирующих shРНК под контролем PolIII-промоторов, эффективные индуцибельные версии которых в настоящее время находятся лишь на стадии разработок.

В связи с вышесказанным мы задались целью разработать и апробировать две лентивирусные векторные системы запуска конститутивной анти-*aml1/eto* РНКи в клетках ОМЛ – с использованием miРНК и shРНК. При этом особое внимание уделено оценке не только эффективности, но и специфичности экспериментальной РНКи.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клеточные линии. В работе использованы клетки линии HEK 293T эмбриональной почки человека (DSMZ ACC 635), а также две клеточные линии ОМЛ человека – Kasumi-1 (ATCC CRL-2724TM) и SKNO-1 (NIHS JCRB1170). Все три типа клеток культивировали по стандартной методологии.

Плазмидные и вирусные векторы. Плазмидный вектор оболочки pMD2.G, а также пакующий плазмидный вектор pCMV_dR8.91 предоставлены д-ром Д. Троне (D. Trono) из лаборатории вирусологии и генетики Политехнической школы г. Лозанна (Laboratory of Virology and Genetics, École polytechnique fédérale de Lausanne, Швейцария). Лентивирусные векторы доставки pHR-SINcPPT-SEW и pHR-SINcPPT-SIEW получены из лаборатории д-ра М. Шерр (M. Scherr) отдела гематологии, гемостаза и онкологии Медицинской школы г. Ганновер (Department of Hematology, Hemostasis and Oncology, Medical School of Hannover, Германия). Челночный плазмидный вектор pDsRed1-C1 приобретен у фирмы “Clontech Laboratories Inc.” (США). Новые бицистронные лентивирусные векторы доставки pHR-CMV-DRep и pHR-CMV-DRep-amiAML1/ETO, а также моноцистронный вектор pHR-shAML1/ETO разработаны с использованием стандартных методов молекулярного клонирования. Перед получением вирусов векторы выделяли из бактерий *Escherichia coli* DH5 α с помощью EndoFree[®] Plasmid Maxi Kit фирмы “QIAGEN” (Германия).

Получение рекомбинантных лентивирусов. Лентивирусы получали путем временной котрансфекции клеток линии HEK 293T плазмидным вектором оболочки, пакующим вектором и лентивирусным вектором доставки [8]. Сбор лентивирусов проводили через 72 ч после котрансфекции. Супернатант осветляли, используя методы низкоскоростного центрифугирования и фильтрации, после чего аликвоты замораживали и оставляли на хранение при –85°C. Функциональный EGFP-титр лентивирусов в супернатанте определяли на клетках линии HEK 293T.

Рекомбинантные лентивирусы концентрировали методом ультрацентрифугирования (120000 g, 2 ч

при температуре +4°C; ультрацентрифуга Beckman Optima™ XL-100K, класс S).

Спинокуляция. К растущим в 6- или 12-луночном культуральном планшете (“SARSTEDT”, Германия) клеткам добавляли содержащую лентивирусы среду в таком объеме, который необходим для достижения заданного значения множественности инфекции (MOI), а также Polybrene™ (“Sigma-Aldrich Co.”, США) до конечной концентрации 8 мкг/мл. Планшет центрифугировали при температуре +32°C и ускорении 1500 g в течение 2 ч, после чего оставляли на ночь при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂. На следующий день культуральную среду заменяли на свежую, и далее клетки культивировали в соответствии с задачами эксперимента.

Проточная цитометрия. Проточную цитометрию проводили по стандартной методике на приборе FACScan фирмы “Becton Dickinson” с 15-мВт 488-нм аргон-неоновым лазером. Сравнительные эксперименты проводили на контрольных и модифицированных клетках через 72 ч после завершения процедуры трансдукции. Минимальное количество клеток, анализируемых в одном образце, составляло 30 тыс. Подбор параметров компенсации перекрывающихся сигналов зеленой и красной флуоресценции, соответствующих репортерным белкам EGFP и DsRed1, проводили на клетках, экспрессирующих только один из указанных белков.

Оценка внутриклеточной продукции анти-*aml1/eto* miРНК и shРНК. Из контрольных и генетически модифицированных клеток выделяли тотальную клеточную РНК с помощью реагента TRIzol® в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя (“Invitrogen Corporation”, США). Количество анти-*aml1/eto* miРНК и shРНК в полученных препаратах РНК определяли с помощью набора реагентов NCode™ miRNA First-Strand cDNA Synthesis и qRT-PCR Kit в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя (“Invitrogen Corporation”). Количественным стандартом служил синтетический РНК-олигонуклеотид 5'-UCUCAGUACGAUUUCGAGGUU-3', нуклеотидная последовательность которого соответствовала последовательности искусственной miРНК и рабочей цепи shРНК. В ходе проведения количественной ПЦР использован специфический прямой праймер 5'-TTCTCAGTACGATTTTCGAGG-3' и набор реагентов Maxima™ SYBR® Green qPCR Master Mix фирмы “Fermentas” (Литва) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Регистрацию проводили на оборудовании Chromo4 фирмы “BioRad” (США).

Вестерн-блоттинг. Детекцию белка AML1/ETO проводили методом Вестерн-блоттинга по ранее опубликованному протоколу [3, 4]. В качестве первичных антител использовали козы поликлональные антитела анти-ETO IgG (“Santa Cruz Biotechnologies”, США), распознающие ETO/RUNX1T1 часть гибридного белка, и мышинные анти-GAPDH

моноклональные антитела (“HyTest Ltd.”, США), специфически взаимодействующие с глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой. В качестве вторичных антител использовали меченные пероксидазой хрена соответственно ослиные анти-козы поликлональные IgG (“Santa Cruz Biotechnologies”, США) и козы анти-мышинные поликлональные IgG (“R&D Systems”, США).

Статистический анализ данных. Все эксперименты проводили не менее трех раз. Данные представлены как среднее арифметическое значение плюс/минус стандартная ошибка. Достоверность различий между сравниваемыми значениями оценивали с помощью независимого *t*-теста Стьюдента. Статистически значимыми считались различия при $p < 0.05$. Обработку и статистический анализ данных проводили с помощью программного пакета OriginPro 7.5.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Дизайн векторов, кодирующих анти-aml1/eto miРНК и shРНК

При создании последовательности ДНК, кодирующей предшественник анти-*aml1/eto* miРНК (pre-miРНК), за основу взята последовательность pre-miРНК has-mir-30a, биогенез которой хорошо изучен [9, 10]. В предшественнике последовательность, кодирующую зрелую has-mir-30a miРНК, заменили на последовательность 5'-ТСТСАГТАСГАТТТТСГАГГТТ-3', комплементарную области 2102–2122 мРНК гена *aml1/eto* (№ D13979 в GenBank). Эта последовательность выбрана по нескольким причинам: во-первых, на основании ранее полученных нами данных по эффективности и специфичности набора синтетических siРНК [3, 4], а во-вторых, по результатам компьютерного моделирования, включавшего предсказание сайтов-мишеней для miРНК в мРНК гена *aml1/eto* [11], а также позволившего сравнить возможное неспецифическое, или “нецелевое” (off-target), действие каждой из miРНК [12] и структурно-термодинамические характеристики их предшественников [13]. Та же последовательность использована и при проектировании анти-*aml1/eto* shРНК.

Синтез последовательности ДНК, кодирующей анти-*aml1/eto* pre-miРНК, проводили с помощью Taq ДНК-полимеразы путем удлинения двух комплементарных по 3'-концам олигонуклеотидов. После клонирования синтезированной последовательности в составе вектора pDsRed1-C1 (“голова к хвосту” по отношению к ORF гена белка DsRed1) получили вектор pDsRed1-amiAML1/ETO. Далее в векторе pHR-SINcPPT-SIEW по сайтам рестрикции EcoRI 526-нуклеотидный фрагмент, содержащий промотор P_{SFFV} и полилинкер, заменили на 1452-нуклеотидный фрагмент из вектора pDsRed1-amiAML1/ETO, включающий энхансер/промотор

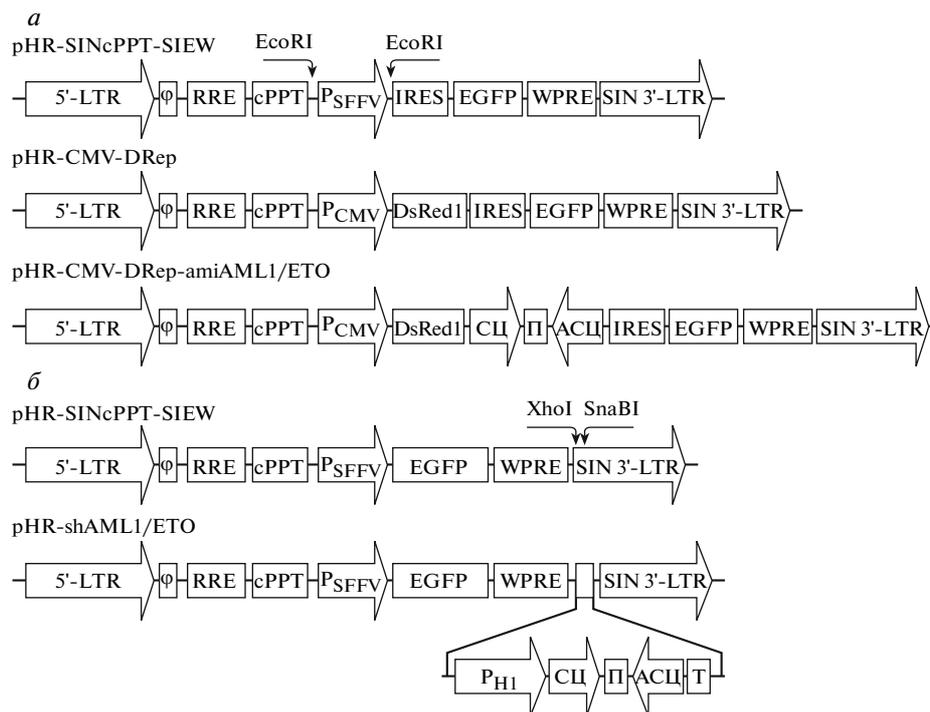


Рис. 1. Структурная организация векторов, использованных в исследовании. На рисунке схематически изображены только вирусные части векторов, фланкированные 5'- и 3'-LTR. *а* – Схема строения векторов, предназначенных для нокдауна гена *aml1/eto* с помощью miРНК. Последовательность, кодирующая предшественник miРНК, сопряжена с открытой рамкой считывания гена белка DsRed1 и схематически представлена тремя элементами: последовательностью СЦ, кодирующей смысловую цепь предшественника miРНК; последовательностью П, кодирующей петлю предшественника miРНК; и последовательностью АСЦ, кодирующей анти-смысловую цепь предшественника miРНК. *б* – Схема строения пары векторов, предназначенных для нокдауна гена *aml1/eto* с помощью shРНК. В структуре экспрессионной кассеты H1-shAML1/ETO условно обозначены следующие элементы: P_{H1} – промотор H1 человека для РНК полимеразы III, СЦ – последовательность, кодирующая смысловую цепь shРНК; П – последовательность, кодирующая петлю shРНК; АСЦ – последовательность, кодирующая анти-смысловую цепь shРНК; и Т – последовательность, кодирующая терминатор для РНК полимеразы III.

P_{CMV} генов раннего ответа цитомегаловируса человека и ORF гена белка DsRed1, совмещенную с последовательностью для анти-*aml1/eto* miРНК (рис. 1а). Созданный таким образом вектор назван pHR-CMV-DRep-amiAML1/ETO. Контрольный вектор, названный pHR-CMV-DRep (см. рис. 1а), разработан по схеме, использованной при создании вектора pHR-CMV-DRep-amiAML1/ETO. Отличие заключалось лишь в том, что 526-нуклеотидный фрагмент вектора pHR-SINcPPT-SIEW заменили на 1296-нуклеотидный фрагмент вектора pDsRed1-C1, включающий энхансер/промотор P_{CMV} и ORF гена белка DsRed1.

Основой для создания вектора, кодирующего анти-*aml1/eto* shРНК, послужил вектор pHR-SINcPPT-SIEW (рис. 1б). В отличие от вектора pHR-SINcPPT-SIEW, этот вектор не содержит последовательность IRES от вируса энцефаломиокардита с сайтом для внутренней посадки рибосомы. Целевой вектор pHR-shAML1/ETO (рис. 1б) сконструирован путем клонирования в векторе pHR-SINcPPT-SIEW

экспрессионной кассеты H1-shAML1/ETO, состоящей из промотора P_{H1} человека, области, кодирующей анти-*aml1/eto* shРНК, и терминатора для РНК-полимеразы III. Клонирование экспрессионной кассеты произведено по уникальным сайтам для рестриктаз XhoI и SnaBI, расположенным в области SIN 3'-LTR вектора. Так как эти сайты фланкируют ΔU3-область 3'-LTR, то во время трансдукции клонированная по ним экспрессионная кассета H1-shAML1/ETO дублируется и в составе провирусной ДНК встраивается в геном инфицированной клетки.

Таким образом, в дальнейших исследованиях могли быть использованы две пары векторов: в первую входит вектор pHR-CMV-DRep-amiAML1/ETO, одновременно кодирующий анти-*aml1/eto* miРНК и два репортерных белка – DsRed1 и EGFP, и контрольный по отношению к нему вектор pHR-CMV-DRep, кодирующий только два репортерных белка; а во вторую – вектор pHR-shAML1/ETO, кодирующий репортерный белок EGFP и анти-*aml1/eto*

Эффективность трансдукции клеток модельных линий с помощью моноцистронных векторов рHR-SINcPPT-SEW и рHR-shAML1/ETO*

Тип клеток	Тип вектора			
	рHR-SINcPPT-SEW		рHR-shAML1/ETO	
	EGFP ⁺ клетки, %	EGFP ⁺ клетки, RFU	EGFP ⁺ клетки, %	EGFP ⁺ клетки, RFU
HEK 293T	99.9 ± 0.1	8409.3 ± 351.0	99.0 ± 0.1	8991.6 ± 135.7
Kasumi-1	98.9 ± 0.1	6796.4 ± 450.0	97.6 ± 0.2	8307 ± 506.5
SKNO-1	98.9 ± 0.1	8887.5 ± 457.5	99.0 ± 0.1	9766.6 ± 40.8

*Данные представлены как среднее значение, полученное на основании результатов трех независимых экспериментов, ± стандартная ошибка по процентному содержанию EGFP-положительных клеток, а также по интенсивности флуоресценции этих клеток, выраженной в условных единицах – RFU (relative fluorescent units).

shPHK, и контрольный по отношению к нему вектор рHR-SINcPPT-SEW.

Эффективность лентивирусной трансдукции лейкозных клеток с помощью векторов, кодирующих *miPHK* и *shPHK*

В предварительной серии экспериментов на клетках линии HEK 293T, инфицированных рHR-CMV-DRep-лентивирусами в диапазоне MOI от 2.5 до 80, установлено, что кинетическая кривая содержания модифицированных клеток выходит на плато (более 90% клеток, положительных по репортерным белкам) при MOI 10. Дальнейшее увеличение MOI сопровождается перераспределением соотношения клеток, положительных только по белкам EGFP (EGFP⁺-клетки) или DsRed1 (DsRed1⁺-клетки) или одновременно положительных по белкам EGFP и DsRed1 (EGFP⁺/DsRed1⁺-клетки), а также приводит к росту интенсивности флуоресценции клеток по репортерным белкам (рис. 2; представлена только часть изученного диапазона MOI – от 10 до 40). Аналогичные результаты получены и при использовании рHR-CMV-DRep-amiAML1/ETO-лентивирусов (данные не представлены).

Сравнительный анализ эффективности трансдукции лейкозных клеток линий Kasumi-1 и SKNO-1 показал, что эти клетки различаются между собой, а также с клетками линии HEK 293T по следующим параметрам. Во-первых, выход на плато кинетической кривой (по содержанию модифицированных клеток) в линии Kasumi-1 происходит при MOI 40, а в SKNO-1 при MOI 20, что, по-видимому, указывает на пониженную чувствительность этих линий клеток к лентивирусной инфекции по сравнению с клетками линии HEK 293T (MOI 10), а также на различную чувствительность двух лейкозных линий (данные не представлены). Во-вторых, при выходе на плато лейкозные клетки представлены практически полностью EGFP⁺-популяцией и не экспрессируют или экспрессируют очень слабо белок

DsRed1. Так, 89.4 ± 1.9% ($n = 3$) клеток линии Kasumi-1, модифицированных вектором рHR-CMV-DRep, при MOI 40 представлены EGFP⁺-пулом и лишь 1.5 ± 0.4% – EGFP⁺/DsRed1⁺, при этом DsRed1⁺ клетки составляют меньше 1% (рис. 3). Частота EGFP⁺/DsRed1⁺ лейкозных клеток достоверно возрастает только при дальнейшем увеличении MOI. В-третьих, внутри одного типа лейкозные клетки более чувствительны к трансдукции вектором рHR-CMV-DRep-amiAML1/ETO, чем вектором рHR-CMV-DRep. Так, при MOI 20 в линии Kasumi-1 вектором рHR-CMV-DRep модифицируются 42.3 ± 6.0% клеток, а вектором рHR-CMV-DRep-amiAML1/ETO 70.5 ± 1.7% ($p = 0.01$; $n = 3$). Таков же характер распределения клеток по EGFP⁺ и EGFP⁺/DsRed1⁺ фракциям после достижения плато. Как видно на рис. 3, частота EGFP⁺/DsRed1⁺ клеток линии SKNO-1, трансдуцированных вектором рHR-CMV-DRep-amiAML1/ETO при MOI 40, выше, чем полученная для рHR-CMV-DRep-трансдуцированных клеток при том же значении MOI (соответственно 23.1 ± 10.4% и 7.2 ± 4.6%). Одновременно с этим наблюдается и перераспределение EGFP⁺ клеток – их содержание соответствует 75.4 ± 10.7% и 90.7 ± 5.0%.

Высокоэффективными оказались и моноцистронные векторы рHR-SINcPPT-SEW и рHR-shAML1/ETO: при MOI 40 модификация клеток линий HEK 293T, Kasumi-1 и SKNO-1 превысила 98% (таблица). Как и в случае с векторами серии рHR-CMV-DRep, два типа использованных лейкозных клеток имели разную чувствительность к лентивирусной трансдукции, обеспечиваемой этими моноцистронными векторами. Так, средняя интенсивность EGFP-флуоресценции клеток линии SKNO-1, трансдуцированных с помощью вектора рHR-shAML1/ETO при MOI 40, достоверно выше, чем для клеток линии Kasumi-1 (соответственно 9766.6 ± 40.8 и 8307.0 ± 506.5; $p < 0.05$, $n = 3$).

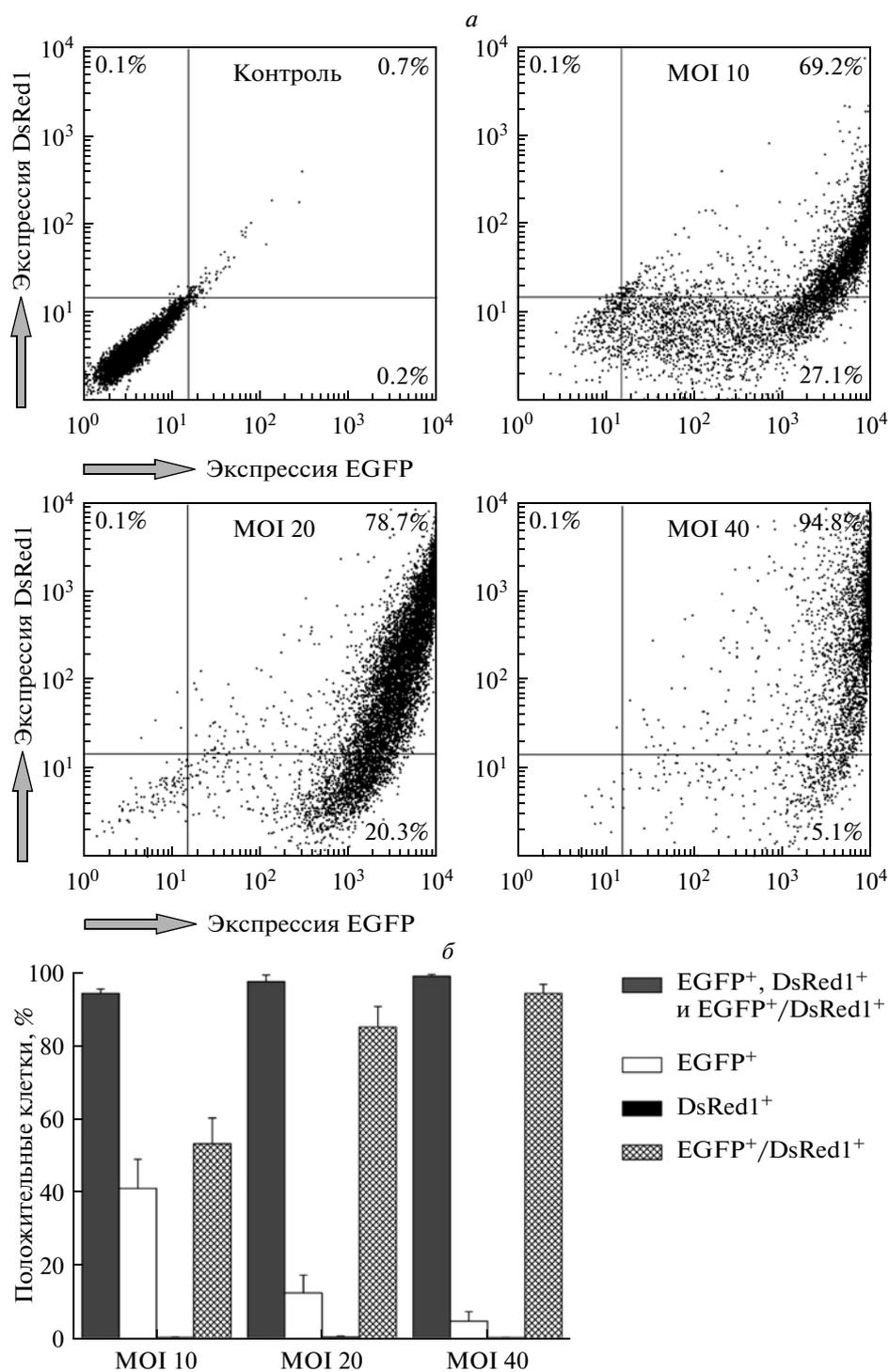


Рис. 2. Эффективность трансдукции клеток линии HEK 293Т с помощью вектора рHR-CMV-DRep. *а* – Репрезентативные точечные графики распределения клеток линии HEK 293Т по показателям флуоресценции белков DsRed1 и EGFP после инфекции клеток-мишеней при MOI 10, 20 и 40 получены на проточном цитофлуориметре. Процент клеток, положительных по тому или иному флуоресцентному белку, указан в соответствующих квадрантах. *б* – Динамика изменения содержания клеток, положительных по тому или иному флуоресцирующему белку, в зависимости от MOI. На гистограмме представлены обобщенные результаты трех независимых экспериментов.

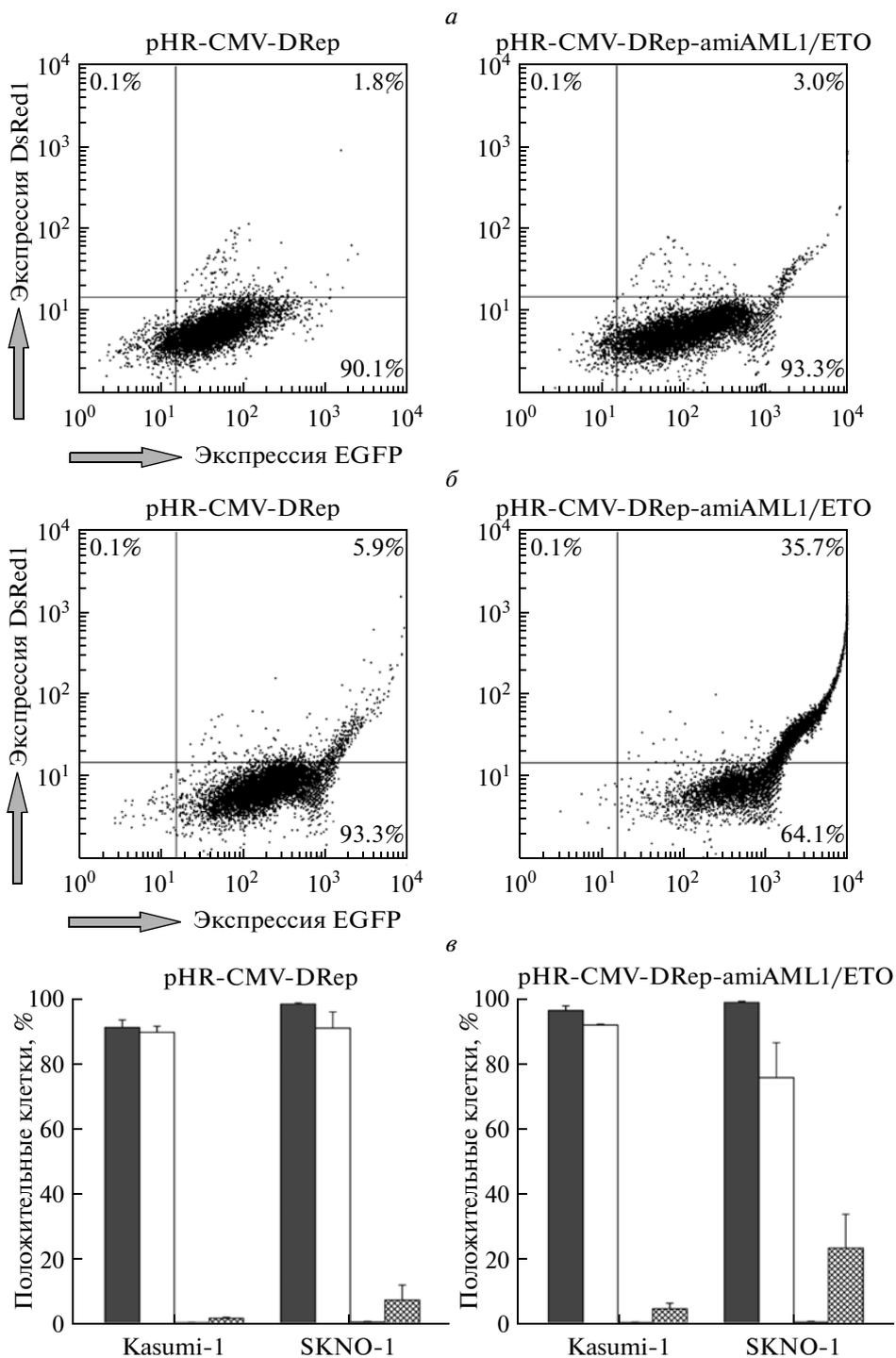


Рис. 3. Эффективность трансдукции клеток лейкозных линий Kasumi-1 (а) и SKNO-1 (б) с помощью векторов pHR-CMV-DRep и pHR-CMV-DRep-amiAHL1/ETO. Представленные репрезентативные точечные графики распределения инфицированных лейкозных клеток по показателям флуоресценции белков DsRed1 и EGFP получены на проточном цитофлуориметре. Процент клеток, положительных по тому или иному флуоресцирующему белку, указан в соответствующих квадрантах. в — Обобщенные результаты трех независимых экспериментов (как арифметическая средняя величина ± стандартная ошибка), отражающие частоту встречаемости положительных по тому или иному флуоресцирующему белку лейкозных клеток, трансдуцированных с помощью векторов pHR-CMV-DRep или pHR-CMV-DRep-amiAHL1/ETO. Обозначения как на рис. 2б.

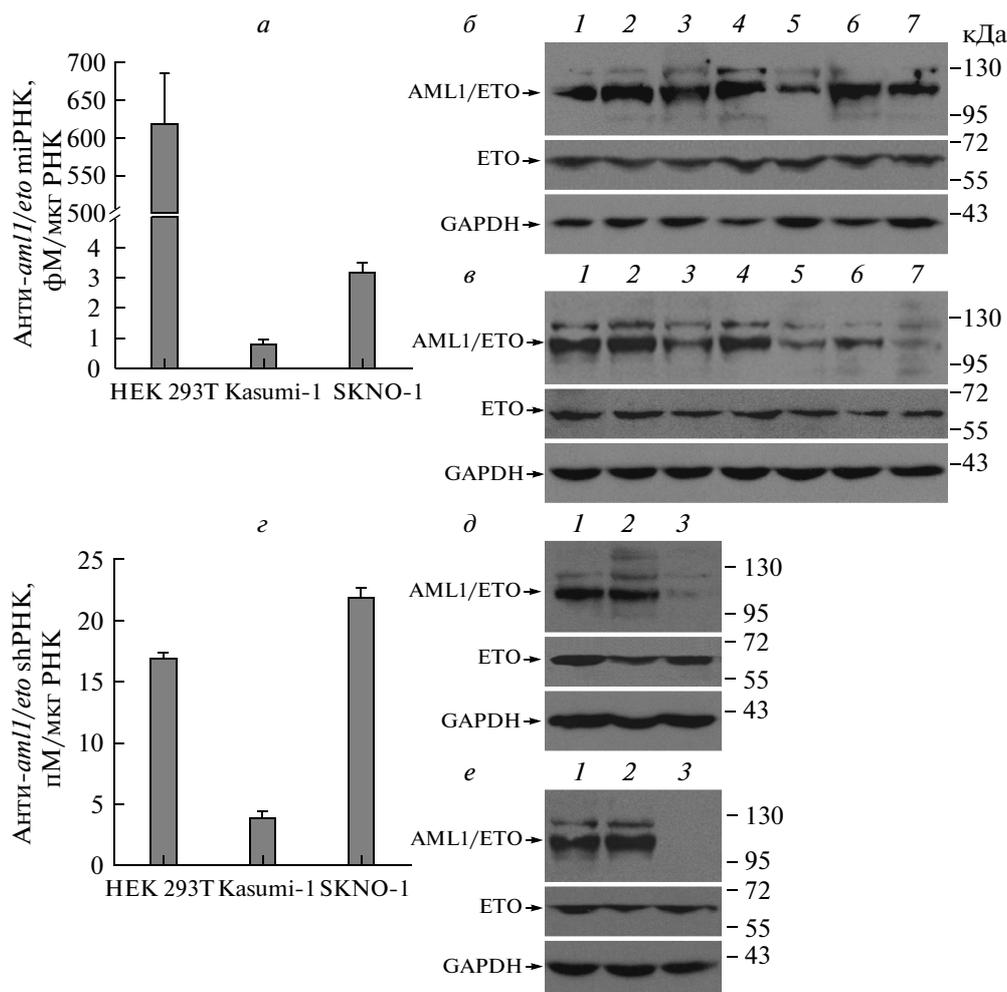


Рис. 4. Контроль экспрессии гена *aml1/eto* с помощью анти-*aml1/eto* miРНК и shРНК. *а* – Продукция анти-*aml1/eto* miРНК в клетках линий HEK 293T, Kasumi-1 и SKNO-1, трансдуцированных с помощью вектора pHR-CMV-DRep-amiAML1/ETO при MOI 40. Приведены Вестерн-блоты белков AML1/ETO и ETO и белка “домашнего хозяйства” GAPDH, выделенных из клеток лейкозных линий Kasumi-1 (*б*) и SKNO-1 (*в*): 1 – контрольные клетки; 2 – клетки, трансдуцированные вектором pHR-CMV-DRep при MOI 40; 3 – клетки, трансдуцированные вектором pHR-CMV-DRep-amiAML1/ETO при MOI 40; 4 – клетки, трансдуцированные вектором pHR-CMV-DRep после 10-кратного концентрирования лентивирусов; 5 – клетки, трансдуцированные вектором pHR-CMV-DRep-amiAML1/ETO после 10-кратного концентрирования лентивирусов; 6 – клетки, трансдуцированные вектором pHR-CMV-DRep путем суперинфекции; 7 – клетки, трансдуцированные вектором pHR-CMV-DRep-amiAML1/ETO путем суперинфекции. Справа показаны маркеры молекулярной массы белков PageRuler™ Prestained Protein Ladder фирмы “Fermentas” (Литва). *г* – Продукция анти-*aml1/eto* shРНК в клетках линий HEK 293T, Kasumi-1 и SKNO-1, трансдуцированных вектором pHR-shAML1/ETO при MOI 40. Приведены Вестерн-блоты белков AML1/ETO и ETO и белка “домашнего хозяйства” GAPDH, выделенных из клеток лейкозных линий Kasumi-1 (*д*) и SKNO-1 (*е*): 1 – контрольные клетки; 2 – клетки, трансдуцированные вектором pHR-SINcPPT-SEW при MOI 40; 3 – клетки, трансдуцированные вектором pHR-shAML1/ETO при MOI 40. Справа показаны маркеры молекулярной массы белков.

Эффективность и специфичность контроля экспрессии гена *aml1/eto* в лейкозных клетках с помощью конститутивной РНКи

Эффективность нокдауна гена *aml1/eto* с помощью анти-*aml1/eto* miРНК оценивали в модельных клеточных линиях, трансдуцированных с помощью векторов pHR-CMV-DRep или pHR-CMV-DRep-amiAML1/ETO при MOI 40. Как видно на рис. 4а, внутриклеточная продукция анти-*aml1/eto* miРНК зависит от типа инфицированных клеток и корре-

лирует с эффективностью переноса бицистронной экспрессионной кассеты в эти клетки. Низкий уровень продукции анти-*aml1/eto* miРНК в лейкозных клетках (особенно линии Kasumi-1) отразился на степени нокдауна целевого белка AML1/ETO: по сравнению с контрольными клетками и клетками, трансдуцированными вектором pHR-CMV-DRep, в клетках линии Kasumi-1, трансдуцированных с помощью вектора pHR-CMV-DRep-amiAML1/ETO, не происходило достоверного снижения уровня це-

левого белка, а в таком же образом трансдуцированных клетках линии SKNO-1 снижение составляло лишь 30% (рис. 4б и 4в, дорожки 1, 2 и 3).

Искусственное увеличение титра полученных лентивирусов путем 10-кратного концентрирования вирус-содержащего супернатанта и, как следствие, повышения MOI при трансдукции, либо использование методики суперинфекции (три последовательных раунда трансдукции при MOI 40) позволили повысить эффективность трансдукции лейкозных клеток и уровень продукции в них анти-*aml1/eto* miРНК (данные не показаны). Как видно на рис. 4б и 4в, из двух предложенных модификаций более эффективной в плане нокдауна белка AML1/ETO оказалась первая (см. дорожки 5 на рисунке). При использовании второго варианта в клетках линии Kasumi-1 произошло лишь незначительное падение уровня целевого белка по сравнению со стандартным вариантом трансдукции при MOI 40, а для клеток линии SKNO-1 наблюдалось неспецифическое снижение уровня гибридного белка при трансдукции вектором pHR-CMV-DRep (см. рис. 4б и в, дорожки 6 и 7).

Наиболее же эффективный способ нокдауна гена *aml1/eto* — использование анти-*aml1/eto* shРНК. С одной стороны, инфекция модельных клеточных линий pHR-shAML1/ETO-лентивирусами при MOI 40 приводит к высокому уровню внутриклеточной продукции анти-*aml1/eto* shРНК (рис. 4г). А с другой стороны, высокий внутриклеточный уровень анти-*aml1/eto* shРНК обеспечивает эффективный нокдаун целевого белка: на 80% в случае клеток линии Kasumi-1 (рис. 4д) и более чем на 90% для линии SKNO-1 (рис. 4е).

Специфичность наблюдаемого нокдауна гена *aml1/eto* оценивали по следующим критериям. Во-первых, неспецифическое влияние самой процедуры лентивирусной трансдукции на экспрессию целевого гена оценивали с помощью контроля-имитации: эти клетки проходили те же этапы и в тех же условиях, что и модифицируемые клетки, — за исключением процедуры трансдукции. Во-вторых, влияние рандомной интеграции лентивирусных векторов в геномную ДНК клеток-мишеней, а также влияние экспрессии репортерных белков на жизнеспособность модифицированных клеток и экспрессию целевого гена оценивали, используя для трансдукции “пустые” лентивирусные векторы pHR-CMV-DRep и pHR-SINcPPT-SEW. В-третьих, отсутствие интерфероновидного ответа [14, 15] в клетках, трансдуцированных с помощью векторов, кодирующих анти-*aml1/eto* miРНК или shРНК, подтверждено косвенными данными: эти клетки не отличаются от контрольных клеток и клеток, модифицированных контрольными (“пустыми”) векторами, по уровню экспрессии репортерных генов (таблица; рис. 3), гена *gapdh* (рис. 4) и гена *eto* (использованные нами анти-ETO антитела выявля-

ют как белок AML1/ETO, так и белок ETO, тем самым позволяя детектировать эти два белка одновременно; см. рис. 4). Наконец, в-четвертых, в качестве дополнительного контроля в работе использованы “неспецифические” shРНК, направленные к GL2-варианту гена, кодирующего люцеферазу светляка *Photinus pyralis*. Группой под руководством Томаса Тушл (Thomas Tuschl) подобрана нуклеотидная последовательность такой miРНК и проведено ее испытание на специфичность и эффективность [16]. На основе последовательности этой miРНК разработан вектор pHR-shGL2, структурно идентичный вектору pHR-shAML1/ETO, но кодирующий анти-*gl2* shРНК (данные не показаны). Полученные нами результаты указывают на то, что неспецифическое влияние таких РНК на экспрессию гена *aml1/eto* (данные не показаны) менее значимо, чем “пустых” векторов типа pHR-CMV-DRep (рис. 4ж).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее как нами, так и другими авторами показана высокая эффективность переноса трансгена в клетки лейкозных линий человека с помощью лентивирусной трансдукции [17, 18]. Эти данные позволили нам остановить свой выбор на лентивирусных векторах как инструментах для доставки сконструированных экспрессионных кассет в лейкозные клетки Kasumi-1 и SKNO-1. Однако следует отметить, что использование этого подхода для генетической модификации первичных лейкозных клеток позволяло нам трансдуцировать не более 30% клеток даже при MOI 100 (данные не представлены). Это указывает на гораздо меньшую чувствительность свежесделанных лейкозных клеток больных к лентивирусной инфекции по сравнению с чувствительностью перевиваемых клеточных линий.

В ходе проведенного нами исследования сконструирована пара новых бицистронных векторов pHR-CMV-DRep и pHR-CMV-DRep-amiAML1/ETO, а также моноцистронный вектор pHR-shAML1/ETO. При дизайне первых двух векторов мы нацеливались на то, чтобы с помощью одного внутреннего промотора осуществить экспрессию двух функционально различающихся продуктов — белка EGFP как маркера эффективности трансдукции и белка DsRed1 как маркера эффективности процессинга первичного транскрипта анти-*aml1/eto* miРНК. Дизайн же моноцистронного вектора pHR-shAML1/ETO основан целиком на идее Д. Троне (D. Trono) и соавторов, которые показали, что при клонировании экспрессионной кассеты, кодирующей shРНК вместо U3-области 3'-LTR, можно добиться высокого уровня экспрессии siРНК [19].

Результаты, полученные нами при оценке эффективности трансдукции лейкозных клеток, позволяют сделать несколько выводов. Во-первых, чувствительность к лентивирусной инфекции зависит от типа клеток-мишеней. Во-вторых, при одном

и том же значении МОИ эффективность трансдукции лейкозных клеток с помощью вектора pHR-shAML1/ETO (или его контрольного варианта pHR-SINcPPT-SEW) выше, чем с помощью бицистронных векторов, что, возможно, обусловлено различиями в механизме контроля трансляции моно- и бицистронной РНК: в первом случае синтез белка EGFP контролируется консенсусом Козака, а во втором — этот консенсус контролирует трансляцию только открытой рамки считывания для белка DsRed1, а синтез белка EGFP контролируется менее эффективной последовательностью IRES [20]. В-третьих, на проточном цитофлуориметре не представляется возможным добиться полной и корректной компенсации перекрывающихся флуоресцирующих сигналов для пары белков EGFP/DsRed1, что искажает результаты косвенной оценки эффективности процессинга первичного транскрипта miРНК по уровню экспрессии белка DsRed1. В-четвертых, взаимосвязь между частотой EGFP⁺/DsRed1⁺-клеток и значением МОИ носит нелинейный характер, что может быть обусловлено несколькими причинами: 1) в зрелой форме белок EGFP является мономером, а белок DsRed1 — тетрамером, а значит требуется четырехкратный избыток полипептидных цепей последнего для достижения эквивалентной флуоресценции с белком EGFP [21]; 2) период созревания белка DsRed1 равен 32 ч, а белка EGFP составляет лишь несколько часов [22], при этом незрелая форма белка DsRed1 имеет близкие по отношению к белку EGFP спектры возбуждения и эмиссии [23]; 3) максимумы возбуждения и эмиссии зрелой формы белка DsRed1 соответствуют длинам волн 558 нм и 583 нм, что позволяет детектировать только около 60% флуоресценции белка DsRed1 на проточном цитофлуориметре типа FAC-Scan, оснащенный 488-нм лазером [23].

Полученные нами результаты указывают на то, что наиболее эффективным, и в тоже время специфичным способом контроля экспрессии гена *aml1/eto* в лейкозных клетках линий Kasumi-1 и SKNO-1 представляется использование векторов типа pHR-shAML1/ETO, позволяющих в модифицированных с их помощью целевых клетках достигать высокого уровня продукции siРНК. Следует отметить, что к настоящему моменту в лейкозных клетках больных с положительной по транслокации t(8;21)(q22;q22) формой ОМЛ, а также в клетках модельных линий обнаружено более 100 альтернативных форм мРНК гена *aml1/eto* [6, 7]. В части таких транскриптов сохраняется правильное расположение ORF и, таким образом, при их трансляции образуется соответствующий белковый продукт. Эти белковые продукты имеют разный молекулярный вес, поэтому на блотах для белка AML1/ETO практически всегда присутствует множество полос (рис. 4). Тем не менее, выбранный нами вариант siРНК позволяет, по-видимому, элиминировать из лейкозных клеток основные варианты РНК-транскриптов ге-

на *aml1/eto*, что является дополнительным объяснением полученного в представленной работе результата — высокого уровня нокдауна белкового продукта этого гена.

Низкий же уровень нокдауна белка AML1/ETO в лейкозных клетках, модифицированных с помощью вектора pHR-CMV-DRep-amiAML1/ETO, хорошо согласуется с низкой внутриклеточной продукцией анти-*aml1/eto* miРНК. Однако в клетках линии НЕК 293Т уровень анти-*aml1/eto* miРНК более чем на два порядка выше, чем в лейкозных клетках, и приближается к таковому для анти-*aml1/eto* shРНК в pHR-shAML1/ETO-модифицированных клетках. Наблюдаемые различия могут быть обусловлены несколькими причинами: 1) эффективность лентивирусной трансдукции различна как для разных типов клеток, так и для разных векторов, что может приводить к различиям по количеству интегрированных в геном целевых клеток копий переносимых конструкций; 2) промотор P_{Н1} работает эффективнее промотора P_{CMV}, что может приводить к различиям по внутриклеточному уровню соответствующих РНК-транскриптов; 3) в лейкозных клетках, возможно, менее активен микропроцессорный комплекс, задействованный в биогенезе miРНК, но не shРНК, на что указывает нелинейный характер взаимосвязи между эффективностью трансдукции клеток линии НЕК 293Т, Kasumi-1 и SKNO-1 и уровнем продукции в этих клетках miРНК.

Авторы выражают благодарность д-рам Д. Троне (D. Trono) и М. Шерр (M. Scherr) за предоставленные векторы.

Представленная работа получила финансовую поддержку со стороны Международной ассоциации по содействию кооперации с учеными из новых независимых стран бывшего Советского Союза (грант ИНТАС № 05-109-4921), а также Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № Б09МС-028).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Andrieu V., Radford-Weiss I., Troussard X., Chane C., Valensi F., Guesnu M. 1996. Molecular detection of t(8;21)/AML1-ETO in AML M1/M2: correlation with cytogenetics, morphology and immunophenotype. *J. Haematol.* **92**, 855–865.
2. Nucifora G., Birn D.J., Erickson P., Gao J., LeBeau M.M., Drabkin H.A. 1993. Detection of DNA rearrangements in the AML1 and ETO loci of an *AML1/ETO* fusion mRNA in patients with t(8;21) acute myeloid leukemia. *Blood.* **81**, 883–888.
3. Heidenreich O., Krauter J., Riehle H., Hadwiger P., John M., Heil G., Vornlocher H.-P., Nordheim A. 2003. AML1/MTG8 oncogene suppression by small interfering RNAs supports myeloid differentiation of t(8;21)-positive leukemic cells. *Blood.* **101**, 3157–3163.
4. Martinez N., Drescher B., Riehle H., Cullmann C., Vornlocher H.-P., Ganser A., Heil G., Nordheim A.,

- Krauter J., Heidenreich O. 2004. The oncogenic fusion protein RUNX1-CBFA2T1 supports proliferation and inhibits senescence in t(8;21)-positive leukemic cells. *BMC Cancer*. **4**, doi:10.1186/1471-2407-4-44.
5. Спирин П.В., Баскаран Д., Орлова Н.Н., Рулина А.В., Никитенко Н.А., Черноловская Е.Л., Зенкова М.А., Власов В.В., Рубцов П.М., Чумаков П.М., Стокинг К., Прасолов В.С. 2010. Подавление экспрессии лейкозных онкогенов AML1/ETO и RUNX1(K83N) с помощью РНК-интерференции. *Молекуляр. биология*. **44**, 876–888.
 6. LaFiura K.M., Edwards H., Taub J.W., Matherly L.H., Fontana J.A., Mohamed A.N., Ravindranath Y., Ge1 Y. 2008. Identification and characterization of novel AML1-ETO fusion transcripts in pediatric t(8;21) acute myeloid leukemia: a report from the children's oncology group. *Oncogene*. **27**, 4933–4942.
 7. Tighe J.E., Calabi F. 1994. Alternative, out-of-frame runt/MTG8 transcripts are encoded by the derivative (8) chromosome in the t(8;21) of acute myeloid leukemia M2. *Blood*. **84**, 2115–2121.
 8. Naldini L., Blömer U., Gallay P., Ory D., Mulligan R., Gage F.H., Verma I.M., Trono D. 1996. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*. **272**, 263–267.
 9. Lee Y., Jeon K., Lee J.-T., Kim S., Kim V.N. 2002. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J*. **21**, 4663–4670.
 10. Zeng Y., Yi R., Cullen B.R. 2005. Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha. *EMBO J*. **24**, 138–148.
 11. Yuan B., Latek R., Hossbach M., Tuschl T., Lewitter F. 2004. siRNA Selection Server: an automated siRNA oligonucleotide prediction server. *Nucl. Acids Res*. **32**, 130–134.
 12. Jackson A.L., Bartz S.R., Schelter J., Kobayashi S.V., Burchard J., Mao M., Li B., Cavet G., Linsley P.S. 2003. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat. Biotechnol*. **21**, 635–637.
 13. Zuker M. 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucl. Acids Res*. **31**, 3406–3415.
 14. Bridge A.J., Pebernard S., Ducraux A., Nicoulaz A.-L., Iggo R. 2003. Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat. Gen.* **34**, 263–264.
 15. Sledz C.A., Holko M., de Veer M.J., Silverman R.H., Williams B.R.G. 2003. Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat. Cell Biol.* **5**, 834–839.
 16. Elbashir S.M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K., Tuschl T. 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. **411**, 494–498.
 17. Гринев В.В., Радишевская А.А., Хейденрайх О. 2008. Эффективный перенос трансгена в лейкозные клетки человека с помощью лентивирусного вектора второго поколения. *Вестник БГУ. Серия 2*. **3**, 82–86.
 18. Ingram W., Chan L., Guven H., Darling D., Kordasti S., Hardwick N., Barber L., Mufti G.J., Farzaneh F. 2009. Human CD80/IL2 lentivirus-transduced acute myeloid leukaemia (AML) cells promote natural killer (NK) cell activation and cytolytic activity: implications for a phase I clinical study. *Br. J. Haematol.* **145**, 749–760.
 19. Wiznerowicz M., Szulc J., Trono D. 2006. Tuning silence: conditional systems for RNA interference. *Nat. Methods*. **3**, 682–688.
 20. Baird S.D., Turcotte M., Korneluk R.G., Holcik M. 2006. Searching for IRES. *RNA*. **12**, 1755–1785.
 21. Shaner N.C., Steinbach P.A., Tsien R.Y. 2005. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat. Methods*. **2**, 905–909.
 22. Bevis B.J., Glick B.S. 2002. Rapidly maturing variants of the *Discosoma* red fluorescent protein (DsRed). *Nat. Biotech.* **20**, 83–87.
 23. Marchant J.S., Stutzmann G.E., Leissring M.A., LaFerla F.M., Parker I. 2001. Multiphoton-evoked color change of DsRed as an optical highlighter for cellular and subcellular labeling. *Nat. Biotech.* **19**, 645–649.