

УДК 577.218; 57.085.23

ПОДАВЛЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА CCR5-РЕЦЕПТОРА ЧЕЛОВЕКА С ПОМОЩЬЮ ИСКУССТВЕННЫХ микроРНК

© 2013 г. Д. В. Глазкова^{1*}, А. С. Ветчинова¹, Е. В. Богословская¹, Ю. А. Жогина¹,
М. Л. Маркелов², Г. А. Шипулин¹

¹Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, 111123

²Институт медицины труда Российской академии медицинских наук, Москва, 105275

Поступила в редакцию 21.11.2012 г.

Принята в печать 27.12.2012 г.

Хемокиновый рецептор CCR5 — один из двух корецепторов, с которыми вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) взаимодействует при проникновении в клетку. В настоящее время перспективным подходом в лечении ВИЧ-инфекции считается разработка методов, в том числе и генотерапевтических, позволяющих блокировать этот рецептор. Одна из таких технологий — РНК-интерференция, которую можно применить для “выключения” гена CCR5. Нами созданы три искусственные микроРНК (amiРНК), направленные против гена рецептора CCR5 человека, и их активность изучена на модели индикаторных клеток, созданных на основе клеточной линии HT 1080. Показано, что объединение двух и более amiРНК в один транскрипт приводит к усилению ингибирования экспрессии гена CCR5. Наиболее эффективная из полученных генетических конструкций вызывала снижение уровня экспрессии CCR5 на 95%.

Ключевые слова: CCR5 рецептор человека, микроРНК, РНК-интерференция, ВИЧ-инфекция, лентивирусные векторы, HT1080, индикаторные клетки.

DOWNREGULATION OF HUMAN CCR5 RECEPTOR GENE EXPRESSION USING ARTIFICIAL microRNAs, by D. V. Glazkova^{1*}, A. S. Vetchinova¹, E. V. Bogoslovskaya¹, Y. A. Zhogina¹, M. L. Markelov², G. A. Shipulin¹ (¹Central Research Institute for Epidemiology (CRIE), Moscow, 111123 Russia, *e-mail glazkova@pcr.ru; ²Institute of Occupational Health, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia 105275). Chemokine receptor CCR5 is essential for human immunodeficiency virus (HIV) entry into the sensitive cells. The CCR5 inactivation is believed to be one of the promising approaches in HIV therapy, including gene therapy. A powerful mechanism that enables to regulate gene expression is RNA interference which could be exploited to knockdown CCR5 gene. Here, three artificial microRNAs directed against the human CCR5 receptor gene were generated and their silencing activity in indicator cells developed on the basis of the HT1080 cell line was evaluated. Multiplexing of two or more artificial microRNAs in one transcript has been demonstrated to enhance the gene silencing. A 95% reduction of the CCR5 expression has been achieved using the most efficient microRNA combination.

Keywords: human CCR5 receptor, microRNA, RNA interference, HIV infection, lentiviral vectors, HT1080, indicator cells.

DOI: 10.7868/S002689841303004X

ВВЕДЕНИЕ

Хемокиновый рецептор CCR5 служит одним из двух корецепторов, которые вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) использует для проникновения в клетку. В популяции европейцев обнаружены носители делетированного варианта гена CCR5 Δ 32, продукт которого — нефункциональный белок [1, 2], и показано, что гомозиготы по

CCR5 Δ 32 устойчивы к заражению R5-тропным вирусом, а наличие этого варианта гена в гетерозиготном состоянии у ВИЧ-инфицированных коррелирует с замедленным прогрессированием заболевания [1, 3–5]; при этом каких-либо патологий, ассоциированных с такой мутацией корецептора, у его носителей не выявлено. Эти данные легли в основу разработки препаратов, на-

Принятые сокращения: ВИЧ — вирус иммунодефицита человека; amiРНК (artificial microRNA) — искусственная микроРНК; miРНК — микроРНК; shRNA (short hairpin RNA) — короткая шпилечная РНК; siРНК (short interfering RNA) — короткая интерферирующая РНК.

*Эл. почта: glazkova@pcr.ru

правленных на блокирование рецептора CCR5, в том числе и с помощью генной терапии.

Эффективность и безопасность “выключения” гена рецептора CCR5 подтверждена при трансплантации костного мозга от донора-носителя CCR5 Δ 32/ Δ 32 ВИЧ-инфицированному пациенту. В течение более 3.5 лет, которые прошли после проведения трансплантации и отмены высокоактивной антиретровирусной терапии, у пациента отсутствовали клинические и вирусологические признаки ВИЧ-инфекции [6]. Это был первый документально подтвержденный случай излечения заболевания [6], который и дал новый импульс поискам способов борьбы с ВИЧ, базирующихся на “выключении” гена хемокинового рецептора CCR5.

За последние годы предложены различные подходы, позволяющие заблокировать экспрессию рецептора CCR5 на различных этапах пути “от гена к белку”. К таким технологиям относятся: РНК-интерференция, расщепление мРНК рибозимами, нейтрализация рецептора внутриклеточными антителами, инактивация гена за счет внесения делеций в ДНК с использованием сайт-специфических нуклеаз [7]. Использование коротких интерферирующих РНК (short interfering RNA, siРНК) признано наиболее эффективным способом подавления экспрессии гена. Стабильный синтез siРНК в клетках может быть достигнут за счет встраивания в хромосому и последующей экспрессии коротких шпилечных РНК (short hairpin, shРНК), процессирование которых приводит к образованию siРНК. Показано, что экспрессия направленных против CCR5 shРНК может приводить к значительному снижению количества корцептора на клеточной поверхности и обеспечивать устойчивость клеток к ВИЧ [8–11].

“Выключение” гена требует высокого уровня экспрессии shРНК, что достигается использованием промоторов РНК-полимеразы III. Однако избыточное количество siРНК или их предшественников токсично для клетки. Одной из причин такой цитотоксичности может быть насыщение белковых комплексов, вовлеченных в РНК-интерференцию, и конкуренция shРНК с эндогенными miРНК, что приводит к нарушению регуляции генов [12, 13]. Один из способов уменьшения токсичности – снижение уровня экспрессии shРНК, например, за счет использования слабого промотора, хотя при этом эффективность ингибирования также заметно снижается [10].

Альтернативным подходом для снижения цитотоксичности может быть использование так называемых искусственных miРНК (artificial microRNA, amiРНК). Это молекулы РНК, структура которых напоминает первичные транскрипты эндогенных miРНК (primary microRNA, pri-miRNA), а область шпильки заменена на последователь-

ность siРНК, направленную против целевого гена. Процессирование первичного транскрипта amiРНК, также как и клеточных miРНК, начинается в ядре с участием эндонуклеазы Drosha, что приводит к образованию шпильки. Затем шпилька переносится в цитоплазму, подвергается действию фермента Dicer и включается в состав белкового комплекса RISC (RNA-induced silencing complex) [14–16]. В случае shРНК этап расщепления эндонуклеазой Drosha отсутствует, что и обуславливает основные отличия между shРНК и amiРНК. Еще одно важное отличие – низкая, а иногда вообще не детектируемая, токсичность при внутриклеточной экспрессии amiРНК, что продемонстрировано во многих экспериментах, в том числе и *in vivo* [17, 18]. Отсутствие токсичности связывают с тем, что эндонуклеаза Drosha может, с одной стороны, лимитировать количество образующихся шпилечных РНК и таким образом предотвращать конкуренцию amiРНК с эндогенными miРНК за транспорт из ядра, а, с другой стороны, увеличивать эффективность процесса [13].

Как и в случае с эндогенными miРНК, экспрессия amiРНК может регулироваться промоторами РНК-полимеразы II, что позволяет использовать тканеспецифичные или регулируемые промоторы и таким образом дополнительно обеспечивать безопасность конструкций [19, 20]. Несколько amiРНК можно расположить последовательно под контролем одного промотора – такие полицистронные amiРНК напоминают кластеры miРНК, часто встречающиеся в геноме человека. Показано, что объединение amiРНК в одном транскрипте приводит к увеличению их функциональности [21, 22].

Цель данной работы – конструирование amiРНК, направленных против гена CCR5, и сравнение их эффективности с ранее описанными shРНК на модели перевиваемой клеточной линии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Конструирование плазмид. Для получения ДНК-последовательности, кодирующей shРНК, олигонуклеотиды:

TTTCAGATCTGTGTCAAGTCCAATCTATGACATCAATTATATGTGAATTGATGTCAT и CAACAAGCTTCTAGAAAAAAGTGTCAAGTCCAATCTATGACATCAATTCCACATATA – отжигали друг на друга и достраивали концы с помощью Taq ДНК-полимеразы (“Fermentas”, Литва). Конечный продукт клонировали в вектор pGEM-T (“Promega”, США). Затем ДНК-фрагмент, кодирующий shРНК, вырезали из вектора по сайтам BglII/HindIII и субклонировали в плазмиды pRNA-U6.1/Neo и pRNA-H1/Neo (“Genscreen”,

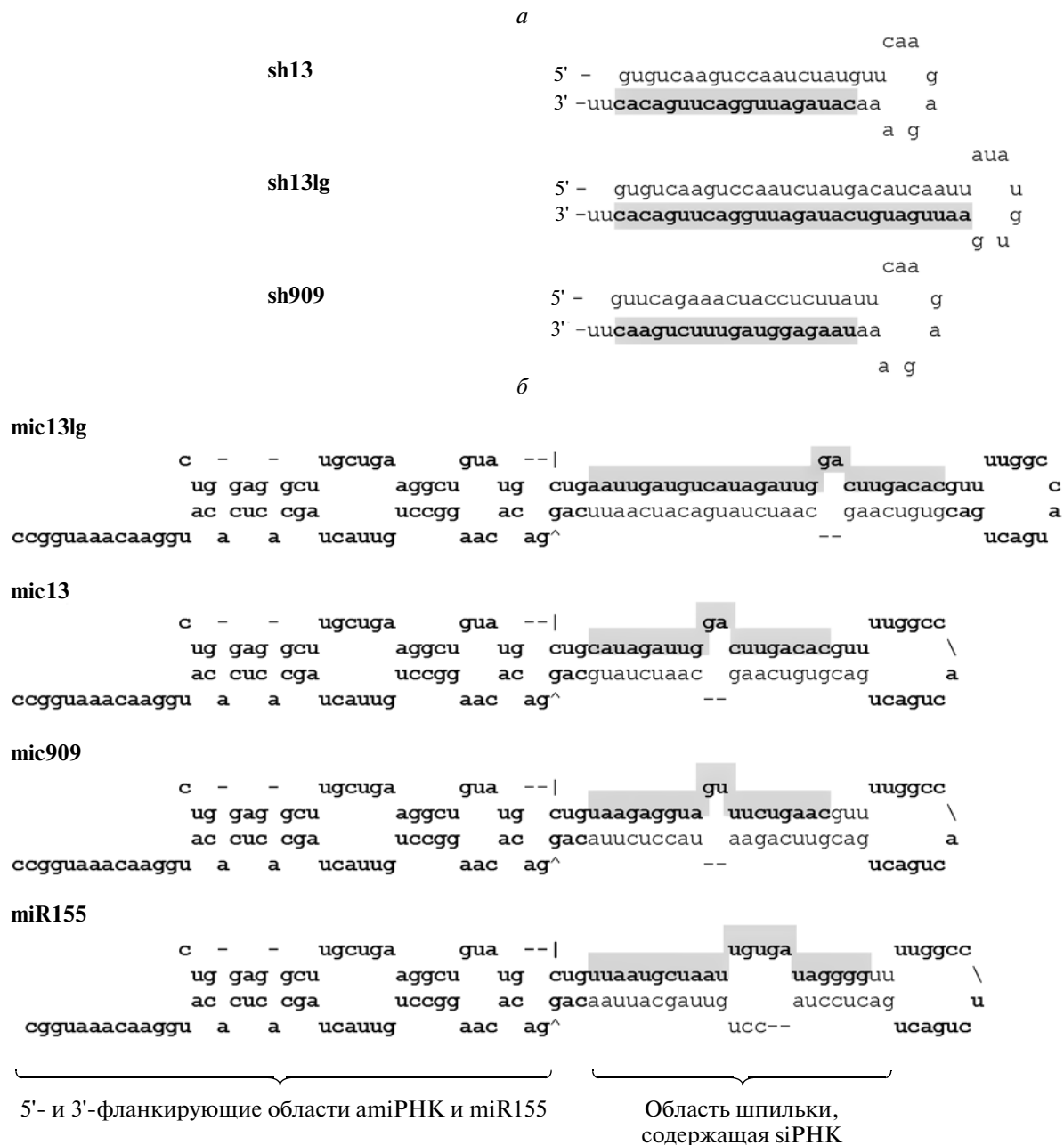


Рис. 1. Структура и последовательности shРНК и miРНК. *a* – Последовательности shРНК, послужившие прототипами для создания amiРНК [11]. Серым цветом выделена цепь siРНК, комплементарная последовательности гена *CCR5*. *б* – Структура и последовательности сконструированных amiРНК и исходной miR155 мыши. Серым цветом выделены последовательности, комплементарные генам-мишеням.

Австралия). Из полученных плазмид pU6-CCR5 shРНК и pН1-CCR5 shРНК по сайтам *EcoRI/XbaI* вырезали фрагменты, содержащие промотор и ген shРНК, встраивали их в лентивирусный вектор pLVX-Puro (“Clontech”, США). Таким образом созданы векторы U6-sh13lg и H1-sh13lg, содержащие экспрессионные кассеты в прямой ориентации. С целью получения векторов U6-sh13lg rev и H1-sh13lg rev, которые содержат кассеты в обратной ориентации, фрагменты, включающие про-

мотор и ген shРНК, вырезали по сайтам *XbaI/BglII* и клонировали в pLVX-Puro по сайтам *BamHI/ClaI*.

Конструкции, кодирующие amiРНК, созданы с использованием набора BLOCK-iT polIII miR RNAi (“Invitrogen”). Дизайн олигонуклеотидов проведен в соответствии с приведенными на рисунке 1 (рис. 1) последовательностями amiРНК и рекомендациями производителя. Для получения

mic13, mic13lg и mic909 (рис. 1) олигонуклеотиды отжигали попарно друг на друга. Полученные двухцепочечные фрагменты ДНК клонировали в вектор pсDNATM6.2-GW/miR (“Invitrogen”). Для последовательного соединения нескольких miРНК ДНК-фрагменты, кодирующие единичные amiРНК, вырезали из вектора по сайтам BglII/SalI и лигировали с плазмидой pсDNA 6.2-GW/miR+micX, обработанной рестриктазами BamHI+SalI, которая уже содержала последовательность micX, кодирующую одну или несколько amiРНК. При воспроизведении этой методики получены плазмиды, экспрессирующие различные сочетания из двух, трех или четырех amiРНК (рис. 2). Для переноса конструкций в лентивирусный вектор полученные плазмиды обрабатывали рестриктазами BglII/SalI, и фрагменты, кодирующие единичные и множественные amiРНК, лигировали с лентивирусным вектором pLVX-Puro, предварительно разрезанным по сайтам BamHI/XhoI. В результате получены следующие плазмиды: mic13, mic13lg, mic909, mic13×2, mic13lg×2, mic13lg×3, mic13+909, mic(13+909)×2 (рис. 2). Во всех экспериментах в качестве контроля использовали исходный вектор pLVX-Puro без вставки.

Для получения плазмид, экспрессирующих ген *CCR5* или рекомбинантный ген *CCR5-EGFP*, последовательность *CCR5* гена амплифицировали с использованием праймеров:

5'-GAACAAGATGGATTATCAAGTGTCAAGTCC-3' и

5'-CACTTGAGTCCGTGTCAACAAGCCC-3' – и ДНК человека в качестве матрицы.

После реамплификации с праймерами:

5'-TTTTAAGCTTCGCCACCATGGATTATCAAGTGTCAAGTC-3' и

5'-ATATGCGGCCGCCGTGTCAACAAGCCCAAG-3' или

5'-TTTTAAGCTTCGCCACCATGGATTATCAAGTGTCAAGTC-3' и

5'-ATATGGATCCAAGCCCACAGATATTTCC-3' – ПЦР-продукты встраивали по сайтам HindIII/BamHI или HindIII/NotI в плазмиду pEGFP-N1 (“Clontech”).

Сконструированные плазмиды обозначены соответственно как pCMV-CCR5-EGFP или pCMV-CCR5. Синонимичные замены нуклеотидов в область последовательности-мишени для двух amiРНК: mic13 и mic13lg – вводили с помощью мутаций по позициям 21 (Т → С) и 24 (А → G) в кодирующей части гена *CCR5* в плазмиде pCMV-CCR5 (рис. 3). Полученная плазида обозначена pCMV-CCR5mut. Мутации введены с использованием набора QuickChange II XL (“Stratagene”) в соответствии с рекомендациями производителя.

Соответствие всех сконструированных последовательностей планируемому проверено секве-

нированием. Плазмиды, предназначенные для трансфекции клеток, выделяли с помощью набора QIAGEN Plasmid Maxi Kit.

Клеточные линии. Клетки HT1080 (клетки фибросаркомы человека) выращивали на среде MEM с 10% фетальной бычьей сыворотки (FBS), 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Клетки HEK 293T (клетки почки эмбриона человека) культивировали в среде DMEM с 10% FBS, 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина и 1% заменимых аминокислот (“Invitrogen”).

Конструирование индикаторных клеточных линий, экспрессирующих *CCR5* или *CCR5-EGFP*. Клетки HT1080 трансфицировали плазмидами pCMV-CCR5-EGFP, pCMV-CCR5 или pCMV-CCR5mut с использованием реагента LentiphosTMHT (“Clontech”). Все плазмиды были линейаризованы перед трансфекцией. Клетки, стабильно экспрессирующие *CCR5*, отбирали на среде, содержащей антибиотик G418 (400 мкг/мл).

Получение лентивирусных частиц. Лентивирусные частицы получали в клетках HEK 293T. Клетки рассевали на культуральные флаконы площадью 75 см². Для трансфекции клеток использовали 4.5 мкг лентивирусного вектора и 22 мкл упаковочной смеси Lenti-X HT (“Clontech”), а также реагент для трансфекции Turbofect (“Fermentas”). Во время и после трансфекции клетки культивировали на среде OptiMEM (“Invitrogen”) без добавления сыворотки. На следующий день после трансфекции среду заменяли на свежую. Клеточную среду, содержащую частицы, собирали через 60 ч после трансфекции и центрифугировали 15 мин при 3000 × g для удаления клеточного дебриса. Супернатант фильтровали через мембрану с диаметром пор 0.45 мкм и замораживали при –70°С. Титр вирусных частиц определяли посредством трансдукции клеток HT1080 лентивирусными частицами в 10-кратных разведениях и оценкой числа колоний-образующих единиц (КОЕ) в каждом разведении после селекции на антибиотике.

Трансдукция клеток лентивирусными частицами. Клетки HT 1080, экспрессирующие pCMV-CCR5-EGFP, pCMV-CCR5 или pCMV-CCR5mut, высевали на 24-луночную плашку за сутки до трансдукции. В день трансдукции (первый день) в каждую лунку добавляли лентивирусные частицы в количестве, соответствующем множественности заражения 10⁻¹ частиц на клетку. Клетки культивировали совместно с лентивирусными векторами в течение ночи в присутствии полибрена. На вторые сутки культуральную среду заменяли на свежую, на третьи – в среду добавляли пурамицин (1.5 мкг/мл). Через 14 сут селекции в клетках измеряли количество химерного белка CCR5-EGFP с помощью проточной цитометрии, а также уровень

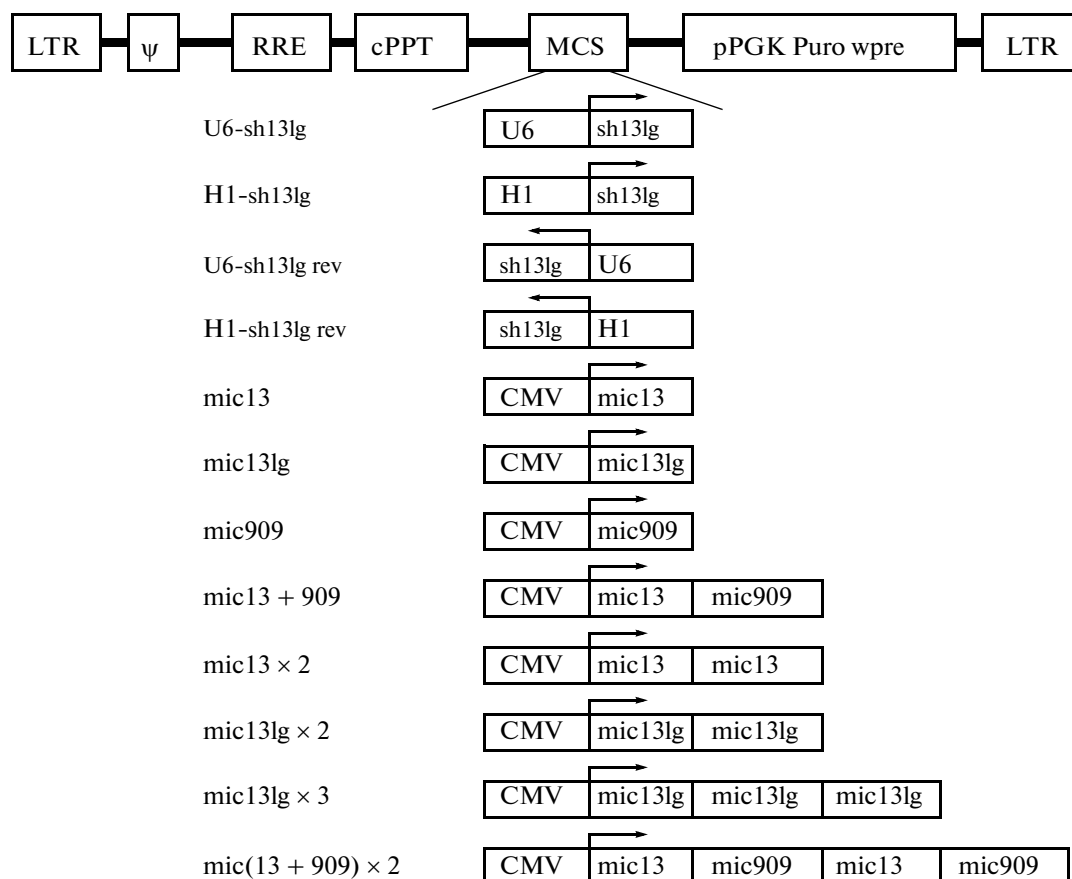


Рис. 2. Схема лентивирусных векторов, экспрессирующих amiРНК и shРНК. Кассету, состоящую из U6- или H1-промотора полимеразы III и sh13lg, помещали в прямой или обратной (rev) ориентации в лентивирусный вектор pLVX-Puro. Сконструировано три вектора с единичными amiРНК и пять векторов, экспрессирующих комбинации amiРНК.

мРНК CCR5-EGFP, CCR5mut или CCR5 с помощью количественной ОТ-ПЦР. Исследования проведены в двух–трех повторах (как указано в подписях к рисункам).

Проточная цитометрия. Клетки промывали дважды фосфатно-солевым буфером и фиксировали 2%-ным формамидом. Среднее значение интенсивности флуоресценции (mean fluorescence intensity, MFI) белка CCR5-EGFP в клетках определяли с помощью проточного цитометра Coulter EPICSXL-MCL (“Beckman Coulter”). Далее в тексте для обозначения среднего значения интенсивности флуоресценции используется термин “интенсивность флуоресценции”.

Количественная ОТ-ПЦР. Для определения уровня мРНК гена CCR5 в клетках нуклеиновые кислоты экстрагировали из клеточной суспензии в соответствии с методикой выделения, описанной Р. Бумом (Boom) и соавт. [23]. Полученный экстракт обрабатывали ДНКазой (“Fermentas”), после чего проводили в один этап реакцию обратной транскрипции и ПЦР в режиме реального времени с использованием прибора RotorGene 3000 (“Corbett Research”, Австралия). Ген бета-

глобулиногена использовали в качестве внутреннего контроля и для нормализации количественных результатов.

Статистический анализ данных. Все эксперименты проводили не менее двух 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 $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Конструирование векторов, кодирующих shРНК или amiРНК

Известно несколько работ, в которых предложены последовательности siРНК, ингибирующие экспрессию гена CCR5 [8, 9, 11, 24]. Некоторые из этих последовательностей сконструированы в виде генов shРНК, экспрессия которых приводит к образованию соответствующих siРНК внутри клетки. Проанализировав имеющиеся литературные данные, мы выбрали для дальнейшей работы

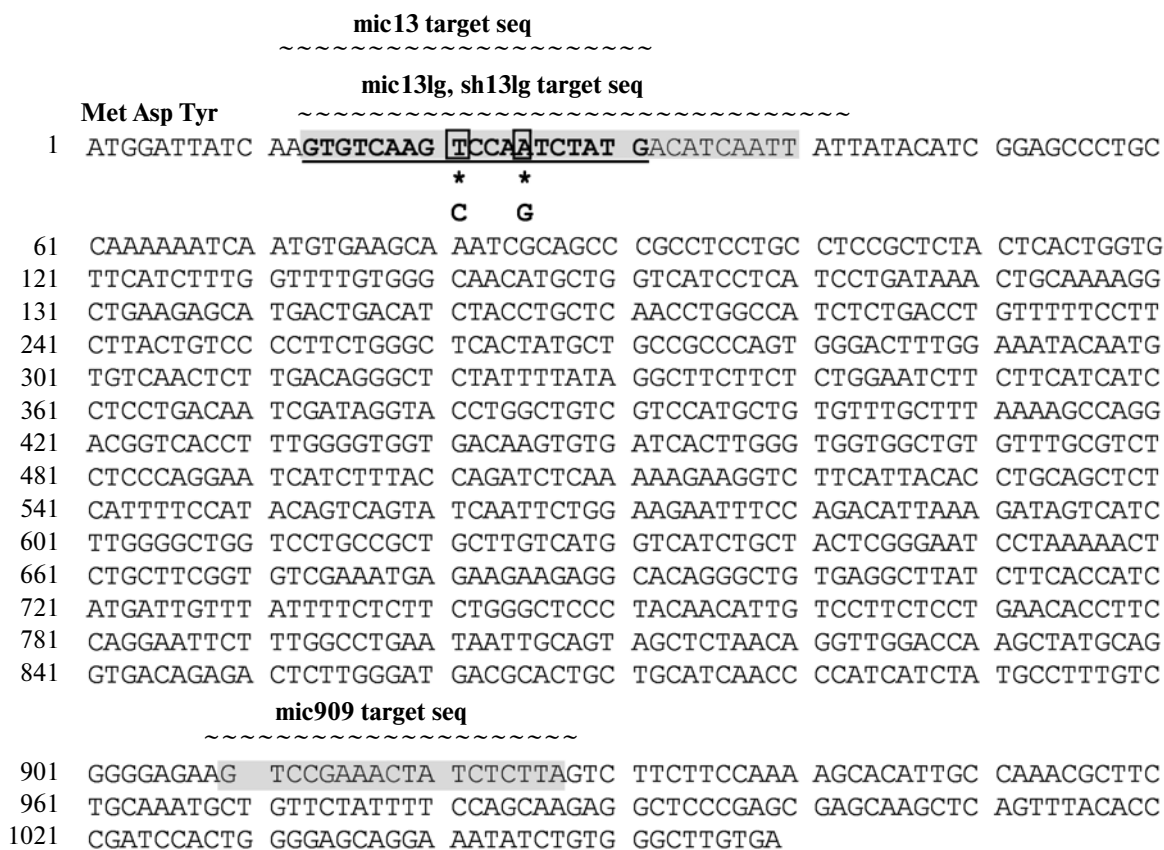


Рис. 3. Кодированная последовательность гена *CCR5* человека и расположение мишеней для shПНК и amiПНК. Отмечены первые три кодона гена *CCR5* и соответствующие им аминокислоты. Последовательности-мишени (target seq) для mic13lg и mic909 выделены серым цветом. Мишень для mic13 обозначена полужирным шрифтом и подчеркнута. Два нуклеотида, которые заменены в гене *CCR5mut*, обведены, а новые нуклеотиды приведены внизу.

следующие три siПНК (для них показана эффективность действия как в виде siПНК, так и в виде генов shПНК): CAUAGAUUGGACUUGACAC, AAUUGAUGUCAUAGAUUGGACUUGACAC и UAAGAGGUAGUUUCUGAAC [11]. Затем мы спроектировали amiПНК, направленные против тех же участков гена, что и исходные siПНК. В качестве основы для их создания использована последовательность эндогенной miПНК мыши MiR155 (номер NR_029565.1 в базе GenBank). В результате получены ДНК-последовательности, кодирующие три amiПНК, 5'- и 3'-области которых, а также область петли совпадают с MiR155, а область шпильки заменена на выбранную siПНК и комплементарную ей последовательность (рис. 1). В комплементарную последовательность ввели делецию в два нуклеотида, что позволило получить шпильку со вторичной структурой, напоминающей структуру MiR155. Созданные amiПНК обозначены как mic13, mic13lg и mic909 – в соответствии с нумерацией комплементарных нуклеотидов в кодирующей последовательности гена *CCR5* (рис. 3). Две из них, mic13 и mic13lg, направлены против одного и того же участка гена и отличаются длиной (22 и 29 п.н.) (рис. 1 и рис. 3). Использо-

вание короткой и длинной amiПНК позволило исследовать влияние длины шпильки на эффективность “выключения” гена. Все полученные последовательности, кодирующие amiПНК, клонировали в лентивирусный вектор pLVX-Puro (“Clontech”) под контроль CMV-промотора.

В качестве положительного контроля мы использовали shПНК (sh13lg), ранее описанную Д. Андерсоном и Р. Аккиной (Anderson & Akkina) [11]. Эта shПНК направлена на ту же область *CCR5*, что и mic13lg. Получены экспрессирующие кассеты U6-sh13lg и H1-sh13lg, где последовательность, кодирующая shПНК, находилась под контролем соответственно U6- и H1-промоторов РНК-полимеразы III человека. Эти кассеты клонировали в прямой и обратной ориентации в лентивирусный вектор pLVX-Puro, из которого предварительно удалили CMV-промотор (рис. 2).

Создание индикаторных клеточных линий

С целью исследовать влияние shПНК и amiПНК на экспрессию гена *CCR5* мы сконструировали индикаторную клеточную линию HT1080-

CCR5-EGFP, экспрессирующую химерный белок CCR5-EGFP. Клетки HT1080 трансфицировали плазмидой, содержащей последовательность гена *CCR5-EGFP* и ген устойчивости к антибиотику G418. После двух недель селекции выделяли единичные клоны клеток, стабильно экспрессирующих химерный белок. Уровень экспрессии *CCR5-EGFP* в каждом клоне оценивали с помощью количественной ОТ-ПЦР и проточной цитометрии. Клоны с наибольшим уровнем экспрессии генов были отобраны для последующих экспериментов.

Работа с перевиваемой клеточной линией (вместо первичных культур мононуклеарных клеток периферической крови) позволила упростить эксперименты по оценке активности разработанных конструкций. Кроме того, уровень экспрессии гена *CCR5* оценивали путем измерения интенсивности флуоресценции белка EGFP, сцепленного с рецептором CCR5, что позволило избежать использования дорогостоящих флуоресцентно-меченых антител.

Сравнение активности shРНК и единичных amiРНК

Индикаторные клетки HT1080-CCR5-EGFP трансдуцировали полученными лентивирусными частицами, кодирующими shРНК или amiРНК. Клетки, содержащие интегрированный вектор, отбирали путем селекции на антибиотике. При проведении трансдукции использовали низкую множественность заражения, равную 10^{-1} частиц на клетку (multiplicity of infection, MOI = 0.1), что дало возможность после отбора получить клетки, содержащие одну копию вектора на клетку. Таким образом, во всех случаях РНК-интерференция в клетке обеспечивалась одной копией вектора, что позволяло корректно сравнивать конструкции. Ингибирующий эффект оценивали посредством измерения уровней мРНК CCR5-EGFP и интенсивности флуоресценции белка CCR5-EGFP. В качестве отрицательного контроля использовали клетки, трансдуцированные контрольным вектором без вставки.

Как и ожидалось, введение в клетки генетических конструкций, кодирующих sh13lg, приводило к ярко выраженному ингибированию экспрессии *CCR5-EGFP* (рис. 4а, б). Векторы, содержащие касету U6-sh13lg, подавляли экспрессию химерного гена в большей степени, чем векторы, содержащие H1-sh13lg, что обусловлено более высокой активностью U6-промотора [10, 25]. Прослеживалась тенденция увеличения активности касеты H1-sh13lg, встроенной в лентивирусный вектор в обратной ориентации (H1-sh13lg rev), по сравнению с той же касетой в прямой ориентации (H1-sh13lg), хотя статистически значимого отличия не выявлено.

Искусственные miРНК, mic13 и mic13lg, ингибировали экспрессию *CCR5* в меньшей степени, чем sh13lg (рис. 4а, б). Более протяженная amiРНК, mic13lg, оказалась более эффективной, чем ее короткий аналог mic13 (уровень ингибирования соответствовал 80 и 50%). Mic909 не подавляла экспрессию гена *CCR5*, что противоречит ранее опубликованным данным о высокой эффективности аналогичной shРНК. Наблюдаемые расхождения, возможно, обусловлены неэффективным или некорректным процессингом этой amiРНК. Другое объяснение касается отличий мРНК CCR5-EGFP от мРНК CCR5. Гипотетически, вторичные структуры двух мРНК могут различаться таким образом, что последовательность-мишень становится недоступной для РНК-интерференции в химерной мРНК. Однако это предположение опровергнуто в эксперименте, описанном далее.

В наших исследованиях интенсивность флуоресценции отражает количество химерного белка в клетках. Можно заметить, что введение amiРНК приводит к значительно большему изменению количества белка CCR5-EGFP в клетке, чем соответствующей мРНК, что говорит о дополнительном ингибировании экспрессии на посттранскрипционном уровне. Поскольку в сконструированных amiРНК ведущая цепь siРНК полностью комплементарна мРНК мишени, мы предполагали, что основным механизмом ингибирования экспрессии *CCR5* будет деградация мРНК, а не репрессия ее трансляции (как в случае частичной комплементарности). Полученные результаты могут свидетельствовать о том, что экспрессия *CCR5* подавляется как на уровне транскрипции, так и на уровне трансляции.

Изучение активности комбинаций из нескольких amiРНК

Один из способов повышения ингибирующей активности miРНК — объединение нескольких miРНК в одном транскрипте. Ранее показано, что комбинация, состоящая из нескольких одинаковых amiРНК, или amiРНК, направленных против разных участков одного гена, позволяет увеличить эффективность “выключения” этого гена [26–28]. Мы сконструировали разные комбинации искусственных miRNA, описанных выше, и сравнили их способность подавлять экспрессию *CCR5* как между собой, так и с единичными amiРНК и shРНК.

Обнаружено, что совместная экспрессия двух mic13 или двух mic13lg в одном транскрипте увеличивает ингибирующую активность в 2.5–3 раза по сравнению с единичными конструкциями (рис. 4в, г). Добавление третьей mic13lg дополнительно усиливало эффект РНК-интерференции, однако разница между двойной и тройной кон-

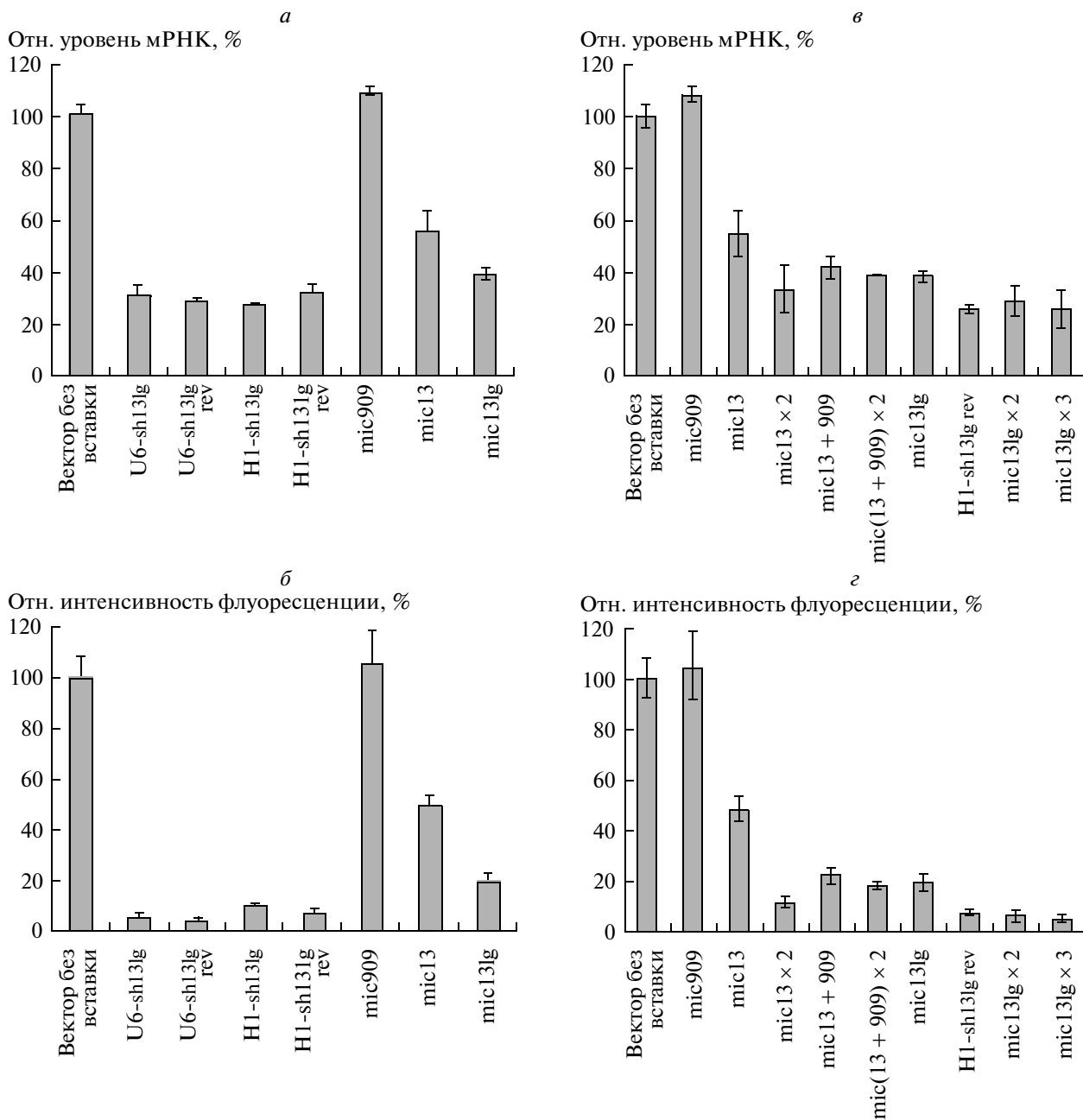


Рис. 4. Сравнение активности единичных amiРНК и их комбинаций. Индикаторные клетки HT1080-CCR5-EGFP трансдуцировали лентивирусными частицами, содержащими последовательности, кодирующие shРНК или amiРНК, отбирали модифицированные клетки и измеряли в них уровни мРНК CCR5-EGFP и интенсивность флуоресценции химерного белка. На гистограммах представлены обобщенные результаты трех независимых экспериментов. *а, в* – Уровень мРНК CCR5-EGFP в клетках, содержащих векторы с обозначенными конструкциями, относительно уровня мРНК в клетках с вектором без вставки. *б, г* – Значение интенсивности флуоресценции в клетках, содержащих обозначенные конструкции, нормализованное на значение интенсивности флуоресценции в клетках, с вектором без вставки.

струкцией была статистически недостоверна. Тем не менее, в трех независимых опытах уровень подавления экспрессии CCR5, полученный с использованием тройной конструкции (74% по мРНК, 95% по белку), оказался сопоставим с уровнем подавления, вызываемым sh13lg, контролируемой U6-промотором (71% по мРНК, 95% по белку).

Интересные результаты получены при изучении комбинаций, включающих mic909. Хотя единичная mic909 не влияла на экспрессию CCR5, добавление этой amiРНК к mic13 достоверно увеличивало ингибирующий эффект (для mic13 – 51% по белку, для mic13 + 909 – 78%). Эффективность комбинации из четырех сцепленных amiРНК – mic(13 + 909) × 2 –

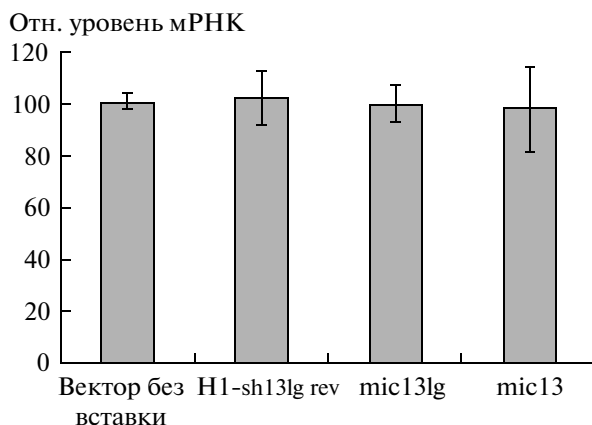


Рис. 5. Отсутствие влияния amiРНК и shРНК на экспрессию мутантного гена *CCR5mut*. Клетки HT1080, экспрессирующие ген *CCR5* с синонимичными заменами (*CCR5mut*), инфицировали различными лентивирусными частицами, кодирующими shРНК или amiРНК. После селекции на антибиотике уровень мРНК *CCR5mut* в клетках измеряли с помощью количественной ОТ-ПЦР. Данные представлены относительно экспрессии того же гена в клетках, содержащих контрольный вектор без вставки. Представлены средние значения величин, полученных в двух независимых экспериментах.

оказалась немного выше, чем эффективность *mic13 + mic909*, однако ниже чем $mic13 \times 2$. Эти данные указывают на то, что расположение amiРНК в полицистроне может влиять на ингибирующие свойства получаемой кассеты.

Во всех проанализированных комбинациях интеграция двух amiРНК в один транскрипт существенно увеличивала их активность. Скорее всего, этот факт объясняется более стабильной вторичной структурой двойной amiРНК, в состав которой входят две РНК-шпильки, и более эффективным процессингом такого тандемного транскрипта [26–28]. Добавление третьей и четвертой miРНК значимо не усиливало активности конструкции. Схожий эффект ранее описан Д. Саном (Sun) и соавт. [27] при изучении amiРНК, созданных на базе miR-30. Две объединенные шпильки проявляли большую активность по сравнению с единичной amiРНК, но добавление третьей шпильки незначительно усиливало ингибирующий эффект. В то же время К. Чанг (Chung) и соавт. [26] сообщали о том, что они наблюдали возрастание ингибирующего действия РНК-интерференции против репортерного гена люциферазы при последовательном присоединении до 8 одинаковых amiРНК. В одной из работ [29] показано, что эффективность единичной amiРНК выше, чем эффективность тандема из двух таких же шпилек. Таким образом, в различных модельных системах влияние мультиплексности amiРНК на их способность блокировать экспрессию целевого гена может не совпадать, что связано с различиями, во-первых, в структуре самих amiРНК и, во-вторых, в системных факторах, которые пока изучены недостаточно.

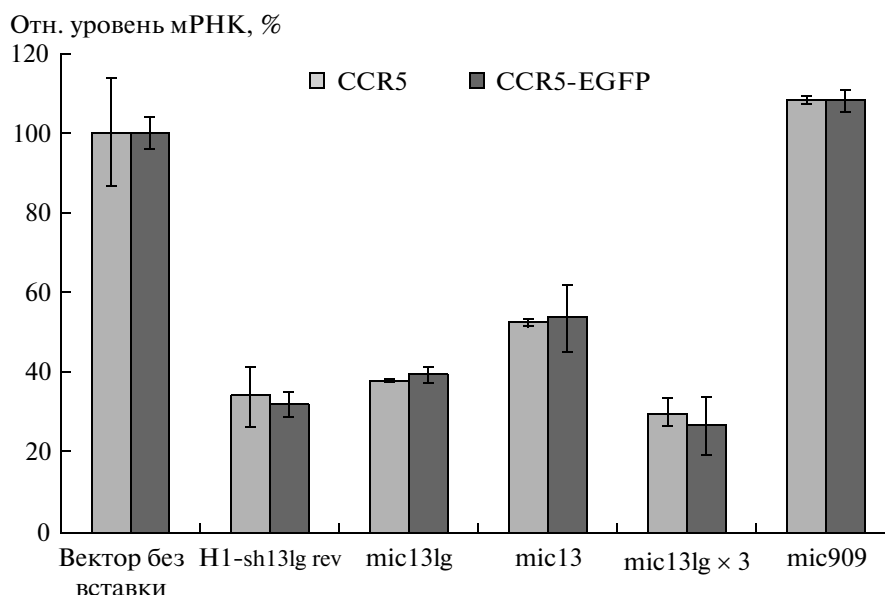


Рис. 6. Наличие последовательности *EGFP* в рекомбинантном гене *CCR5-EGFP* не влияет на эффективность подавления экспрессии *CCR5* с помощью разработанных amiРНК. Клетки HT1080-CCR5-EGFP и клетки HT1080-CCR5 инфицировали лентивирусными частицами, содержащими shРНК, единичные amiРНК или комбинации amiРНК. После селекции на пуромидине в клетках измеряли уровень мРНК *CCR5* или *CCR5-EGFP* с помощью количественной ОТ-ПЦР. Данные представлены относительно экспрессии того же гена в клетках, трансдуцированных контрольным вектором без вставки. Представлены средние значения величин, полученных в двух независимых экспериментах.

В проведенном нами исследовании комбинирование *ami*РНК позволило значительно повысить эффективность РНК-интерференции, направленной на снижение экспрессии гена *CCR5*. И это может иметь решающее значение для получения клеток, невосприимчивых к ВИЧ.

Изучение специфичности механизма РНК-интерференции

Точное совпадение нуклеотидной последовательности *si*РНК с участком ее связывания — это необходимое условие “срабатывания” механизма РНК-интерференции. С целью проверить тот факт, что ингибирование обусловлено РНК-интерференцией, мы сконструировали клетки НТ1080-*CCR5mut*, экспрессирующие ген *CCR5mut*, несущий синонимичную замену двух нуклеотидов в области целевой последовательности (рис. 2).

Чтобы оценить влияние *ami*РНК и *sh*РНК на измененный ген *CCR5mut*, клетки НТ1080-*CCR5mut* инфицировали лентивирусными частицами, кодирующими Н1-*sh13lg rev*, *mic13* или *mic13lg*. На рис. 5 представлены экспериментальные данные, демонстрирующие тот факт, что *ami*РНК и *sh*РНК не оказывают влияния на экспрессию мутированного гена *CCR5mut*. Таким образом, выявленное нами подавление экспрессии *CCR5* обусловлено взаимодействием РНК-интерферирующих агентов непосредственно с мРНК *CCR5*, а не с другими компонентами клетки.

Влияние amiРНК и shРНК на экспрессию гена CCR5 и рекомбинантного гена CCR5-EGFP

Возможность использования в работе рекомбинантного гена *CCR5-EGFP*, за продуктом экспрессии которого можно следить по флуоресцентной метке, вместо гена *CCR5* дикого типа значительно упрощает постановку эксперимента и снижает его себестоимость. С целью исключить возможное влияние различий, связанных с изменением структуры мРНК химеры *CCR5-EGFP* по сравнению с мРНК рецептора *CCR5*, на эффективность их взаимодействия с *ami*РНК и *sh*РНК, мы провели следующий эксперимент. Помимо клеток НТ1080-*CCR5-EGFP* получены клетки НТ1080-*CCR5*, устойчиво экспрессирующие немодифицированный ген рецептора *CCR5* человека. В обе линии клеток параллельно вводили конструкции Н1-*sh13lg*, *mic13*, *mic13lg*, *mic909*, комбинацию из трех *mic13lg* или контрольный вектор и измеряли количество мРНК *CCR5*. Степень подавления уровня мРНК в этих клеточных линиях для одноименных конструкций (рис. 6) была одинаковой. Этот эксперимент позволяет сделать вывод о том, что результаты, полученные с использованием индикаторных клеток

НТ1080-*CCR5-EGFP*, адекватно отражают влияние исследованных *ami*РНК и *sh*РНК на экспрессию гена *CCR5*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нам удалось создать генетические конструкции на основе *mi*РНК, позволяющие “выключать” ген рецептора человека *CCR5*. Наиболее эффективными оказались комбинации из нескольких *ami*РНК, которые в модельной системе (индикаторная клеточная линия) продемонстрировали эффективность, сходную с ранее опубликованными конструкциями на основе *sh*РНК. В процессе работы получены индикаторные клеточные линии, которые зарекомендовали себя как удобная и адекватная модель для быстрой оценки регуляции уровня экспрессии гена *CCR5*.

В дальнейших экспериментах мы планируем оценить цитотоксичность созданных *ami*РНК, а также изучить их влияние на устойчивость клеток к инфицированию ВИЧ. Результаты этих исследований позволят оценить возможность применения комбинаций *mi*РНК в качестве генотерапевтических препаратов для лечения ВИЧ-инфекции.

Мы выражаем благодарность Л.В. Серебровской за помощь в проведении проточной цитометрии и Г.М. Цыгановой за помощь в проведении ОТ-ПЦР.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Samson M., Libert F., Doranz B.J., Rucker J., Liesnard C., Farber C.M., Saragosti S., Lapoumeroulie C., Cognaux J., Forceille C., Muyltermans G., Verhofstede C., Burtonboy G., Georges M., Imai T., Rana S., Yi Y., Smyth R.J., Collman R.G., Doms R.W., Vassart G., Parmentier M. 1996. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the *CCR5*-5 chemokine receptor gene. *Nature*. **382**, 722–725.
2. Lucotte G. 2002. Frequencies of 32 base pair deletion of the (Delta 32) allele of the *CCR5* HIV-1 co-receptor gene in Caucasians: a comparative analysis. *Infect. Genet. Evol.* **1**, 201–205.
3. Biti R., Ffrench R., Young J., Bennetts B., Stewart G., Liang T. 1997. HIV-1 infection in an individual homozygous for the *CCR5* deletion allele. *Nature Medicine*. **3**, 252–253.
4. O'Brien S.J., Moore J.P. 2000. The effect of genetic variation in chemokines and their receptors on HIV transmission and progression to AIDS. *Immunol. Rev.* **177**, 99–111.
5. Zimmerman P.A., Buckler-White A., Alkhatib G., Spalding T., Kubofcik J., Combadiere C., Weissman D., Cohen O., Rubbert A., Lam G., Vaccarezza M., Kennedy P.E., Kumaraswami V., Giorgi J.V., Detels R., Hunter J., Chopek M., Berger E.A., Fauci A.S., Nutman T.B., Murphy P.M. 1997. Inherited resistance to HIV-1 conferred by an inactivating mutation in *CC*

- chemokine receptor 5: studies in populations with contrasting clinical phenotypes, defined racial background, and quantified risk. *Mol. Med.* **3**, 23–36.
6. Allers K., Hütter G., Hofmann J., Loddenkemper C., Rieger K., Thiel E., Schneider T. 2011. Evidence for the cure of HIV infection by CCR5 Δ 32/ Δ 32 stem cell transplantation. *Blood*. **117**, 2791–2799.
 7. Cannon P., June C. 2011. Chemokine receptor 5 knockout strategies. *Curr. Opin. HIV AIDS*. **6**, 74–79.
 8. Buttica C., Ciuffi A., Muñoz M., Thomas J., Bridge A., Pebernard S., Iggo R., Meylan P., Telenti A. 2003. Protection from HIV-1 infection of primary CD4 T cells by CCR5 silencing is effective for the full spectrum of CCR5 expression. *Antivir. Ther.* **8**, 373–377.
 9. Shimizu S., Hong P., Arumugam B., Pokomo L., Boyer J., Koizumi N., Kittipongdaja P., Chen A., Bristol G., Galic Z., Zack J.A., Yang O., Chen I.S., Lee B., An D.S. 2010. A highly efficient short hairpin RNA potently down-regulates CCR5 expression in systemic lymphoid organs in the hu-BLT mouse model. *Blood*. **115**, 1534–1544.
 10. An D.S., Qin F.X., Auyeung V.C., Mao S.H., Kung S.K. 2006. Optimization and functional effects of stable short hairpin RNA expression in primary human lymphocytes via lentiviral vectors. *Mol. Ther.* **14**, 494–504.
 11. Anderson J., Akkina R. 2007. Complete knockdown of CCR5 by lentiviral vector-expressed siRNAs and protection of transgenic macrophages against HIV-1 infection. *Gene Ther.* **14**, 1287–1297.
 12. Grimm D., Streetz K.L., Jopling C.L., Storm T.A., Pandey K., Davis C.R., Marion P., Salazar F., Kay M.A. 2006. Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature*. **441**, 537–541.
 13. Castanotto D., Sakurai K., Lingeman R., Li H., Shively L., Aagaard L., Soifer H., Gagnon A., Riggs A., Rossi J. 2007. Combinatorial delivery of small interfering RNAs reduces RNAi efficacy by selective incorporation into RISC. *Nucl. Acids Res.* **35**, 5154–5164.
 14. Scherr M., Eder M. 2007. Gene silencing by small regulatory RNAs in mammalian cells. *Cell Cycle*. **6**, 444–449.
 15. Макарова Ю.А., Крамеров Д.А. 2007. Некодирующие РНК. *Биохимия*. **72**(11), 1427–1448
 16. Sibley C.R., Seow Y., Wood M.J. 2010. Novel RNA-based strategies for therapeutic gene silencing. *Mol. Ther.* **18**, 466–476.
 17. McBride J., Boudreau R.L., Harper S.Q., Staber S.Q., Monteys A.M., Martins I., Gilmore B.L., Burstein H., Peluso R.W., Polisky B., Carter B., Davidson B.L. 2008. Artificial miRNAs mitigate shRNA-mediated toxicity in the brain: implications for the therapeutic development of RNAi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **105**, 5868–5873.
 18. Boudreau R.L., Martins I., Davidson B.L. 2009. Artificial microRNAs as siRNA shuttles: improved safety as compared to shRNAs *in vitro* and *in vivo*. *Mol. Ther.* **17**(1), 169–175.
 19. Nielsen T.T., Marion I., Hasholt L., Lundberg C. 2009. Neuron-specific RNA interference using lentiviral vectors. *J. Gene Med.* **11**, 559–569.
 20. Shin K.J., Wall E.A., Zavzavadjian J.R., Santat L.A., Liu J., Hwang J., Rebres R., Roach T., Seaman W., Simon M., Fraser I. 2006. A single lentiviral vector platform for microRNA-based conditional RNA interference and coordinated transgene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **103**, 13759–13864.
 21. Liu Y.P., Haasnoot J., ter Brake O., Berkhout B., Konstantinova P. 2008. Inhibition of HIV-1 by multiple siRNAs expressed from a single microRNA polycistron. *Nucl. Acids Res.* **36**, 2811–2824.
 22. Aagaard L.A., Zhang J., von Eije K. J., Li H., Sætrom P., Amarzguioui M., Rossi J. 2008. Engineering and optimization of the miR-106b cluster for ectopic expression of multiplexed anti-HIV RNAs. *Gene Ther.* **15**, 1536–1549.
 23. Boom R., Sol C.J., Salimans M.M., Jansen C.L., Wertheim-van Dillen P.M. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 495–503.
 24. Kim S.S., Peer D., Kumar P., Subramanya S., Wu H., Asthana D., Habiro K., Yang C., Manjunath N., Shimaoka M., Shankar P. 2010. RNAi-mediated CCR5 silencing by LFA-1-targeted nanoparticles prevents HIV infection in BLT mice. *Mol. Ther.* **18**, 370–376
 25. Mäkinen P.I., Koponen J.I., Kärkkäinen A.M., Malm T.M., Pulkkinen K.H., Koistinaho J., Turunen M.P., Ylä-Herttua S. 2006. Stable RNA interference: comparison of U6 and H1 promoters in endothelial cells and in mouse brain. *J. Gene Med.* **8**, 433–441.
 26. Chung K.H., Hart C.C., Al-Bassam S., Avery A., Taylor J., Patel P. D., Vojtek A.B., Turner D.L. 2006. Polycistronic RNA polymerase II expression vectors for RNA interference based on BIC/miR-155. *Nucl. Acids Res.* **34**(7), e53.
 27. Sun D., Melegari M., Sridhar S., Rogler C.E., Zhu L. 2006. Multi-miRNA hairpin method that improves gene knockdown efficiency and provides linked multi-gene knockdown. *Biotechniques*. **41**, 59–63.
 28. McLaughlin J., Cheng D., Singer O., Lukacs R.U., Radu C.G., Verma I.M., Witte O.N. 2007. Sustained suppression of Bcr-Abl-driven lymphoid leukemia by microRNA mimics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **104**, 20501–20506.
 29. Zhou H., Xia X.G., Xu Z. 2005. An RNA polymerase II construct synthesizes short-hairpin RNA with a quantitative indicator and mediates highly efficient RNAi. *Nucl. Acids Res.* **33**(6), e62.