

УДК 577.21

Регуляция репликации аденовирусов человека с помощью РНК-интерференции

Н. А. Никитенко¹, Т. Speiseder², Е. Lam², П. М. Рубцов¹, Х. Д. Тонаева³, С. А. Борзенко³, Т. Dobner², В. С. Прасолов^{1*}

¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32, Россия

²Heinrich Pette Institute – Leibniz Institute for Experimental Virology, Martinistrasse 52 D-20251, Hamburg, Germany

³МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова Минздрава РФ, 127486, Москва, Бескудниковский бул., 59а, Россия

*E-mail: prassolov45@mail.ru

Поступила в редакцию 23.06.2015

РЕФЕРАТ Аденовирусы являются причиной большого числа инфекционных заболеваний человека. Офтальмологические инфекции – аденовирусный конъюнктивит и эпидемический кератоконъюнктивит – вызывают, в основном, аденовирусы человека, относящиеся к группе D. Недостаточная эффективность современных методов лечения аденовирусной инфекции обуславливает необходимость поиска и разработки лекарственных средств, избирательно воздействующих на возбудителей данного заболевания. Потенциальными мишенями для создания терапевтических препаратов служат ранние гены аденовирусов человека, такие, как ген ДНК-полимеразы *E2B* и ген *E1A*, играющие важную роль в репликации вирусной ДНК. В настоящей работе предложен подход к эффективному подавлению репликации аденовирусов группы D человека с помощью РНК-интерференции. Созданы модельные линии клеток, которые позволяют быстро определять эффективность действия интерферирующих РНК, комплементарных различным участкам мРНК гена *E1A*. Нами показано значительное подавление экспрессии *E1A* с помощью интерференции РНК в таких клетках. Также показана высокая эффективность малых шпилечных РНК, специфичных в отношении ранних генов *E1A* и *E2B* аденовирусов группы D человека, при подавлении репликации аденовирусов типа D8 и D37 в первичных клетках лимба роговицы глаза человека. Мы надеемся, что результаты нашего исследования смогут послужить основой для разработки современных лекарственных средств для борьбы с заболеваниями человека, вызываемыми аденовирусами.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА РНК-интерференция, аденовирусы человека, малые интерферирующие РНК, лентивирусные векторы, малые шпилечные РНК.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ siРНК – малая интерферирующая РНК; shРНК – малая шпилечная РНК; HAdV – аденовирус человека.

ВВЕДЕНИЕ

Проблема аденовирусных заболеваний глаз относится к числу наиболее актуальных в современной биомедицине в связи с широким распространением и высокой частотой вспышек аденовирусной инфекции. Аденовирусы вызывают инфекционные заболевания дыхательных путей и желудочно-кишечного тракта человека. К аденовирусной офтальмологической инфекции относятся такие заболевания, как аденовирусный конъюнктивит – воспаление оболочки глаза, и эпидемический кератоконъюнктивит – сочетанное воспаление конъюнктивы и роговицы [1]. В России ежегодно эпидемический кератоконъюнктивит вы-

являют более чем у 300000 человек [2]. Наиболее тяжелые поражения глаз вызывают аденовирусы человека (HAdV), относящиеся к группе D (типы D8, D19, D36 и D37) [3]. HAdV-инфекциям подвержены все возрастные группы [4]. В России по поводу воспалительных заболеваний глаз к офтальмологу обращается примерно 18 млн человек в год, что составляет до 80% случаев временной нетрудоспособности по причине офтальмологических заболеваний и 10–30% случаев снижения остроты зрения и слепоты [5]. Эпидемический характер распространения, большие потери по временной нетрудоспособности, высокая вероятность развития осложнений – вре-

менной или стойкой утраты зрения, многообразии клинических проявлений определяют медико-социальную значимость аденовирусных заболеваний глаз. Аденовирусные инфекции представляют опасность для людей с заболеваниями иммунной системы [6]. Известно, что к развитию ожирения у детей, а также неалкогольной жировой болезни печени у взрослых приводит заражение аденовирусом типа 36 группы D человека (HAdV D36) [7].

Недостаточная эффективность современных методов лечения аденовирусной инфекции [8] обуславливает необходимость поиска и разработки лекарственных средств, избирательно воздействующих на возбудителей данного заболевания.

Потенциальными мишенями для терапевтических препаратов могут быть ранние гены аденовирусов человека, такие, как ген ДНК-полимеразы *E2B* и ген *E1A*, участвующие в репликации вирусной ДНК [9–11].

Продукты гена *E1A* стимулируют переход клеток из фазы G_0 в фазу *S* клеточного цикла. Взаимодействие продуктов гена *E1A* с белком ретинобластомы (pRb) приводит к активации фактора транскрипции E2F1, запускающего экспрессию генов, необходимых для прохождения *S*-фазы клеточного цикла. Это позволяет аденовирусу эффективно использовать аппарат репликации ДНК инфицированной клетки для репликации собственного генома. Одна из функций фактора транскрипции E2F1 – трансаktivация белка p14/ARF, сопровождаемая индукцией p53-зависимого апоптоза. В ходе вирусной инфекции белок E1B 55 кДа инактивирует p53, не давая ему запустить апоптоз в клетке до завершения цикла репликации аденовируса [12, 13].

Использование малых интерферирующих РНК (siРНК) – коротких дуплексов длиной 21–23 п.н. с выступающими 2–3 нуклеотидами на 3'-концах, способных подавлять экспрессию генов на посттранскрипционном уровне, позволяет изучать функциональную активность генов [14, 15]. Показана возможность использования интерферирующих РНК для подавления экспрессии различных генов-мишеней, в том числе вирусных генов [16–18]. Для доставки интерферирующих РНК в клетки используются рекомбинантные лентивирусные векторы, кодирующие малые шпилечные РНК (shРНК) – предшественники малых интерферирующих РНК [19–21].

Мы считаем, что этот подход можно применить для подавления экспрессии ранних генов *E1A* и *E2B* [10, 11] HAdV, которые вызывают поражения глаз и дыхательных путей.

В представленной работе приведены результаты ингибирования экспрессии гена *E1A* аденовирусов типов D8, D19, D36 и D37 группы D человека при по-

мощи siРНК и shРНК, а также репликации HAdV D8 и D37 при сочетанном подавлении экспрессии *E1A* и *E2B* с использованием shРНК.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культуры клеток

В работе использовали перевиваемые клетки эмбриона почки человека HEK293 [22], перевиваемые клетки аденокарциномы легкого человека A549 (DSMZ ACC107; Braunschweig, Germany), перевиваемые клетки немелкоклеточного рака легкого человека H1299 [23], а также первичные клетки лимба человека (Limb) [24, 25]. Клетки линий HEK293, A549 и H1299, а также клетки модельных линий A549 *E1A* и H1299 *E1A* выращивали на среде DMEM (Life Technologies, Великобритания), содержащей 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (Life Technologies), 4 мМ L-глутамин, 1 мМ пирувата натрия, стрептомицин/пенициллин в концентрации 100 мкг/мл и 100 ед./мл соответственно при температуре 37°C в атмосфере 5% CO₂. Первичные клетки лимба человека культивировали на среде DMEM/F12 (Life Technologies), содержащей 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (Life Technologies), 4 мМ L-глутамин, 1 мМ пирувата натрия, 10 мМ NEPEP, 0.4 мкМ инсулина, 10 нМ дексаметазона, стрептомицин/пенициллин в концентрации 100 мкг/мл и 100 ед./мл соответственно при температуре 37°C в атмосфере 5% CO₂.

Лентивирусные векторы

Рекомбинантные лентивирусные векторы были сконструированы с помощью стандартных методов генной инженерии [26, 27]. Для получения лентивирусных вирионов ДНК рекомбинантных векторов котрансфицировали в клетки линии HEK293 методом Са-фосфатной трансфекции совместно с плазмидами, направляющими синтез всех лентивирусных белков, необходимых для создания инфекционных лентивирусных частиц. Сбор инфекционных псевдолентивирусных частиц проводили в течение 2 дней с интервалом 12 ч. Титрование проводили на клетках линий A549 и H1299. Вирусные стоки с титрами 5×10^5 – 5×10^6 использовали для проведения дальнейших исследований.

Модельные линии клеток

Модельные клетки, в которых экспрессируется ген *E1A* аденовируса типа 36 человека (*E1A-D36*), получены с помощью трансдукции клеток линий A549 и H1299 псевдолентивирусными частицами *E1A-LeGO-iGT* на основе *LeGO-iGT-Puro-opt*, несущими экспрессирующую кассету «промотор – ген *E1A* аде-

новируса типа 36 человека – IRES – маркерный ген *dTomato* – ген устойчивости к пуromицину.

Для получения клеток модельной линии H1299 shE1A клетки исходной линии H1299 трансдуцировали лентивирусными частицами, содержащими последовательность, кодирующую shE1A, маркерный ген *Cerulean* и ген устойчивости к антибиотику бластицидину (BSD). Через 48 ч после трансдукции клетки помещали в селективную среду с антибиотиком бластицидином (5 мкг/мл). Селекцию продолжали в течение 10 дней. Затем клетки H1299 shE1A анализировали на проточном цитофлуориметре.

Модельные линии Limb shE2B, Limb shE1A и Limb shE2B/shE1A получали, трансдуцируя первичные клетки лимба человека псевдолентивирусными частицами, кодирующими shE2B [10, 11] или shE1A.

siРНК

Для подавления экспрессии гена *E1A* HAdV 8, 19, 36 и 37 в компании «СИНТОЛ» (Россия) были синтезированы siРНК, направленные против разных районов мРНК целевого гена. Были синтезированы siРНК длиной 21 п.н.: siE1A-1 (смысловая цепь 5'-GGAGGACUUUGUGAAUACAUU-3', антисмысловая цепь 5'-UGUAUUCACAAAGUCCUCCUU-3'); siE1A-2 (смысловая цепь 5'-GAG-GCUGUGAAUUUAAUAUUU-3', антисмысловая цепь 5'-AUUUAAAUUCACAGCCUCUU-3') и siE1A-3 (смысловая цепь 5'-GCUCU-GUGUUACAUGAAAUUU-3', антисмысловая цепь 5'-AUUUCAUGUAACACAGAGCUU-3'). Эти siРНК гомологичны последовательностям гена *E1A* HAdV типов D8, D19, D36 и D37. В качестве контроля использовали siScr, не имеющие гомологии с известными вирусными мРНК, а также мРНК человека, мыши и крысы (смысловая цепь 5'-CAAGUCUCGUAUGUAGUGGUU-3', антисмысловая цепь 5'-CCACUACAUCGAGACUUGUU-3'). siРНК конструировали с помощью программы Whitehead Institute siRNA Selection Program [28].

Трансфекция siРНК

Клетки в фазе экспоненциального роста высевали на 24-луночные планшеты по 3×10^4 клеток/лунку за 1 сутки до эксперимента и трансфицировали siРНК в концентрации 200 нМ с помощью Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent (Life Technologies) в соответствии с протоколом производителя.

shРНК

Нами были сконструированы лентивирусные векторы shE1A-LeGO-Cer/BSD и shScr-LeGO-Cer/BSD, кодирующие shРНК: shE1A, которая соответствует

siE1A-1 (смысловая цепь 5'-p-aacgATATTTAAATT-CACAGCCTCcttcctgcaaGAGGCTGTGAATTTA-ATATtttttc-3', антисмысловая цепь 5'-p-tcgagaaa-aaATATTTAAATTCACAGCCTCcttcaggaagGAGGCTGTGAATTTAATATcgtt-3'), и контрольную shScr (смысловая цепь 5'-p-gatccGCCACTACATACGA-GACTTcttcctgtcaCAAGTCTCGTATGTAGTGGttttt-3', антисмысловая цепь 5'-p-aattcaaaaaCCA-CTACATACGAGACTTgtgacaggaagCAAGTCTCG-TATGTAGTGGcg-3'). В настоящей работе мы использовали также лентивирусные векторы shE2B-LeGO-G, кодирующие shРНК, направленную против мРНК гена ДНК-полимеразы *E2B* HAdV D8, D19, D36 и D37, и shScr-LeGO-G, описанные ранее [10, 11].

Проточная цитофлуориметрия

Уровень флуоресценции клеток измеряли на проточном цитофлуориметре Epics 4XL (Beckman Coulter, США). Сбор и учет данных производили с помощью программного обеспечения WinMDI, версия 2.8.

ПЦР в реальном времени

Суммарную РНК из клеточных культур выделяли с помощью TRIzol® reagent (Life Technologies) согласно протоколу производителя. Полученную мРНК использовали для построения первых цепей кДНК с помощью набора ImProm-II™ Reverse Transcriptase (Promega, США). Для идентификации в полученной суммарной кДНК нуклеотидных последовательностей *E1A-D36* проводили ПЦР в реальном времени с праймерами, специфичными к данному гену: смысловая последовательность 5'-GCATCCAGAGCCATTTGAGC-3'; антисмысловая последовательность 5'-TTA-GGGTCGTCATCATGGGC-3'. Значения, полученные для каждого образца, нормировали на экспрессию гена «домашнего хозяйства» β-актина. Уровень экспрессии гена β-актина определяли с использованием праймеров: смыслового – 5'-ATGGATGATGATATCGCCGC-3' и антисмыслового – 5'-CTTCTGACCCATGCCAC-3'. ПЦР в реальном времени проводили в 96-луночных планшетах на приборе MiniOpticon (Bio-Rad, США) с использованием реагента iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) в соответствии с рекомендациями производителя. Продукты ПЦР анализировали с помощью программного обеспечения прибора MiniOpticon (Bio-Rad).

Определение количества копий генома аденовируса человека

HAdV D8 (ATCC® VR-1085AS/RB™ ATCC® VR-1085AS/RB™) и HAdV D37 (ATCC® VR-929™) были приобретены в American-Type-Culture-Collection

(АТСС). Для оценки репликации аденовирусов группы D человека через 6 дней после инфекции клетки, зараженные HAdV D8 и D37, собирали, выделяли суммарную ДНК с помощью набора QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Германия) согласно рекомендациям производителя. Количественную ПЦР проводили согласно [29] на приборе Rotor Gene Q cycler (QIAGEN) с использованием реагента TaqMan® Universal PCR Master Mix (Life Technologies). Продукты ПЦР анализировали с помощью программного обеспечения прибора Rotor Gene Q cycler (QIAGEN).

Статистическая обработка данных

Все данные представлены в виде средних значений \pm стандартное отклонение (СО). Статистическую значимость определяли с использованием непарного двустороннего *t*-теста и программного обеспечения GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, США). Значение $p < 0.05$ считали статистически значимым.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение линий модельных клеток, экспрессирующих ген E1A HAdV D36

Для определения функциональной активности синтетических siРНК и лентивирусных векторов, направляющих в трансдуцированных клетках синтез shРНК, необходимо было получить модельные линии клеток A549 E1A и H1299 E1A, в которых экспрессируется ген E1A аденовируса типа 36 человека (E1A-D36).

Известно, что экспрессия E1A в клетках вызывает индукцию р53-зависимого апоптоза [30]. Продукты экспрессии E1A способствуют переходу покоящейся клетки в S-фазу и нарушению механизмов, контролирующих синтез ДНК. Это увеличивает вероятность возникновения повреждений ДНК в процессе репликации. В ответ на сильное повреждение ДНК белок р53 запускает каскад реакций, приводящих к апоптозу. Поэтому сначала клетки A549 и H1299 трансфицировали siРНК, комплементарными различным участкам мРНК гена E1A, а также контрольной siScr. Через 24 ч проводили трансдукцию этих клеток псевдолентивирусными частицами (рис. 1А), содержащими экспрессирующую кассету «промотор – целевой ген E1A-D36 – IRES – ген флуоресцентного белка dTomato – ген устойчивости к пурамицину». Маркерный ген, кодирующий флуоресцентный белок dTomato, и целевой ген E1A разделены последовательностью IRES (внутренний сайт посадки рибосомы). IRES позволяет синтезировать несколько белков с одной мРНК в эукариотических клетках. Таким образом, целевой и маркерный гены экспрессируются с сопоставимой

эффективностью [31]. Это позволяет косвенно оценить уровень экспрессии гена E1A, измеряя флуоресценцию белка dTomato с помощью метода проточной цитофлуориметрии.

Эффективность экспрессии внесенных генов оценивали методами проточной цитофлуориметрии (по флуоресценции маркерного белка Tomato), а также ПЦР в реальном времени. Результаты оценки эффективности трансдукции и последующей экспрессии трансгенов с помощью проточной цитофлуориметрии приведены на рис. 1Б,В.

Количество клеток модельных линий A549 E1A и H1299 E1A, в которых регистрировали флуоресценцию белка dTomato, составляло 44 и 85% всей популяции клеток соответственно по сравнению с контролем – нетрансдуцированными клетками линий A549 и H1299.

Приведенные результаты свидетельствуют о том, что в полученных модельных трансгенных клетках A549 E1A и H1299 E1A с высокой эффективностью экспрессируются внесенный целевой ген и маркерный ген dTomato в составе кассеты «промотор – ген E1A-D36 – IRES – маркерный ген dTomato – ген устойчивости к пурамицину».

Согласно полученным данным, в модельных линиях A549 E1A и H1299 E1A количество флуоресцирующих клеток значительно различается. Причины гетерогенности линий клеток A549 E1A и H1299 E1A по уровню экспрессии dTomato могут быть связаны с индивидуальными свойствами клеток. В геноме трансгенных клеток интегрируется разное количество молекул лентивирусного провируса. Вирусная ДНК встраивается в разные участки генома, что может обеспечивать различную эффективность экспрессии трансгенов. Несмотря на сходство морфологии и происхождения клеток A549 и H1299, одной из причин могут быть различия этих двух линий. Как известно, экспрессия гена E1A приводит к р53-зависимому апоптозу. Клетки линии H1299 дефицитны по белку р53. Следовательно, вероятность развития апоптоза в клетках H1299 E1A гораздо ниже, чем в клетках A549 E1A. Можно предположить, что клетки линии A549 трансдуцируются с той же эффективностью, что и клетки H1299, но в большинстве трансдуцированных клеток A549 E1A происходит р53-зависимый апоптоз, что позволяет регистрировать флуоресценцию dTomato в меньшем количестве клеток A549 E1A, чем в клетках модельной линии H1299 E1A.

Подавление экспрессии гена E1A-D36 под действием siРНК

Структура экспрессирующей кассеты «промотор – ген E1A-D36 – IRES – маркерный ген dTomato – ген устойчивости к пурамицину» позволяет быстро

оценить ингибирующую активность siРНК и лентивирусных векторов, направляющих синтез shРНК – предшественников соответствующих siРНК. Деградация общей для обоих генов мРНК под действием интерферирующих РНК, комплементарных мРНК *E1A-D36*, приводит к прекращению образования в клетке как продуктов этого гена, так и флуоресцентного белка *dTomato*, что количественно можно оценить методом проточной цитофлуориметрии.

Поскольку экспрессия гена *E1A* приводит к индукции апоптоза, эксперимент выполняли следующим образом: siРНК, комплементарные различным районам мРНК *E1A-D36*, трансфицировали в клетки линий А549 и Н1299; через 24 ч проводили трансдукцию этих клеток псевдолентивирусными частицами, содержащими экспрессирующую кассету «промотор SFFV – ген *E1A-D36* – IRES – ген флуоресцентного белка *dTomato* – ген устойчивости к пурамицину». Через 48 и 96 ч после трансдукции эффективность действия siРНК оценивали методами проточной цитофлуориметрии и ПЦР в реальном времени.

В результате действия siРНК, комплементарных мРНК *E1A-D36*, значительно снижался уровень экспрессии *dTomato* (рис. 2). В популяции клеток А549 Е1А, трансфицированных siE1A-1, siE1A-2 и siE1A-3, средняя интенсивность флуоресценции (MFI) *dTomato* через 48 ч снизилась на 25, 49 и 53% соответственно по сравнению с контролем, а через 96 ч – на 55, 61 и 58%. В качестве контроля использо-

вали клетки линии А549 Е1А, трансфицированные siScr. Определение биологической активности siРНК показало, что уже через 48 ч MFI репортерного белка *dTomato* в популяции модельных клеток Н1299 Е1А сократилась на 18, 60 и 17% под действием siE1A-1, siE1A-2 и siE1A-3 соответственно по сравнению с контролем, а через 96 ч – на 18, 44 и 56%. Контролем служили клетки линии Н1299 Е1А, трансфицированные siScr. Все представленные результаты получены в ходе трех независимых экспериментов ($p < 0.05$).

Результаты, полученные методом проточной цитофлуориметрии, хорошо согласуются с данными ПЦР в реальном времени. Влияние siРНК на уровень экспрессии мРНК *E1A-D36* в клетках модельных линий оценивали через 48 и 96 ч после трансдукции псевдолентивирусными частицами, кодирующими целевой ген (рис. 3). В клетках линии А549 Е1А через 48 ч после трансдукции под действием siE1A-1, siE1A-2 и siE1A-3 регистрировали снижение уровня экспрессии мРНК *E1A-D36* на 58, 83 и 63% соответственно по сравнению с контролем, а через 96 ч – на 69, 88 и 72%. В клетках модельной линии Н1299 Е1А через 48 ч после трансдукции уровень мРНК *E1A-D36* уменьшался на 28, 71 и 46% при использовании siE1A-1, siE1A-2 и siE1A-3 соответственно по сравнению с контролем, а через 96 ч – на 50, 69 и 47%.

Снижение средней интенсивности флуоресценции маркерного белка *dTomato* происходит медленнее

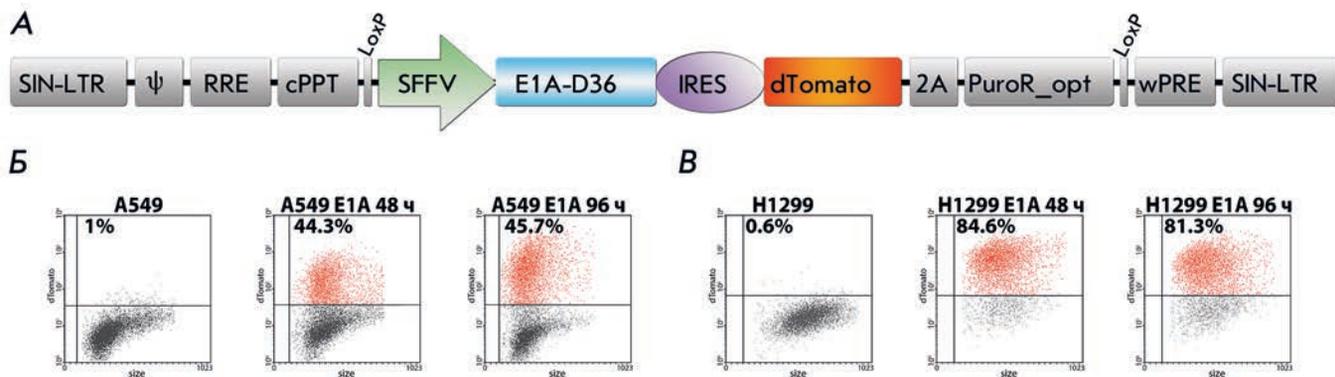


Рис. 1. Модельные линии клеток. А – схема лентивирусного вектора, несущего целевой ген *E1A-D36* и ген маркерного флуоресцентного белка *dTomato*, разделенные последовательностью IRES. Вектор сконструирован на основе вектора LeGO-iGT-Puro-opt. SIN-LTR – самоинактивирующийся (содержащий делецию промоторной области) длинный концевой повтор; ψ – сигнал упаковки; RRE – элемент, реагирующий на rev; cPPT – последовательность, богатая пуринами; SFFV – промотор вируса некроза селезенки; *E1A-D36* – ген *E1A* HAdV D36; IRES – внутренний сайт посадки рибосомы; *dTomato* – ген флуоресцентного белка *dTomato*; 2A – 2A-пептид тешовируса свиней; wPRE – посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков. Б – оценка эффективности экспрессии маркерного гена *dTomato* в клетках модельной линии А549 Е1А методом проточной цитофлуориметрии. В – анализ экспрессии маркерного гена *dTomato* в клетках модельной линии Н1299 Е1А с помощью проточной цитофлуориметрии

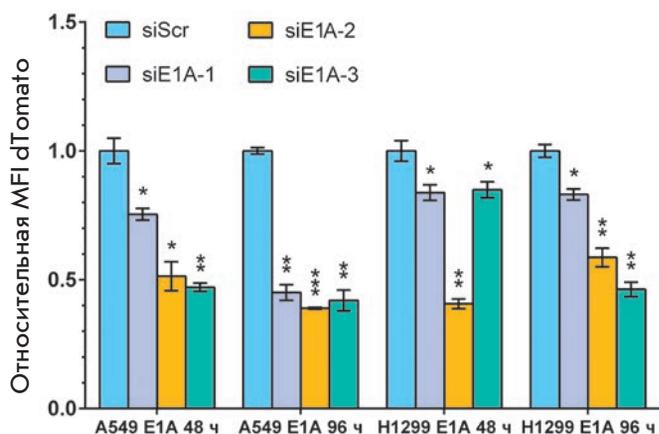


Рис. 2. Ингибирующая активность siРНК, комплементарных мРНК гена *E1A-D36*. Действие siРНК, направленных против *E1A-D36*, привело к значительному снижению средней интенсивности флуоресценции (MFI) dTomato в клетках A549 E1A и H1299 E1A. Величина MFI dTomato в контрольных образцах принята за 1. Все приведенные данные получены в ходе трех независимых экспериментов. Различия между опытными и контрольными образцами статистически значимы во всех случаях (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

и менее эффективно, чем подавление экспрессии целевого гена на уровне мРНК. Эти данные можно объяснить тем, что флуоресцентный белок достаточно стабилен, и время его полужизни составляет около 72 ч.

Согласно данным проточной цитофлуориметрии и ПЦР в реальном времени, наиболее эффективно на экспрессию гена *E1A-D36* действует siE1A-2. Ингибирующая активность siРНК определяется группой факторов. К ним относятся вторичная структура мРНК-мишени, уникальность последовательности siРНК, стабильность и термодинамическая асимметрия дуплексов siРНК. Известно, что вторичная структура мРНК-мишени или связанные с ней белки могут затруднять доступ siРНК [15, 32].

Подавление экспрессии гена *E1A-D36* с помощью лентивирусного вектора, кодирующего shРНК

Нами сконструированы лентивирусные векторы, кодирующие shРНК, соответствующие siE1A-2 (с самым высоким уровнем подавления экспрессии *E1A-D36*) и контрольной siScr. Лентивирусные векторы могут обеспечить интеграцию последовательности, кодирующей shРНК, в геном клетки, в результате чего будет достигнуто долговременное подавление экспрессии гена-мишени. Основой для таких генетических конструкций послужил лентивирусный вектор LeGO-Cerulean/BSD (рис. 4А), несущий

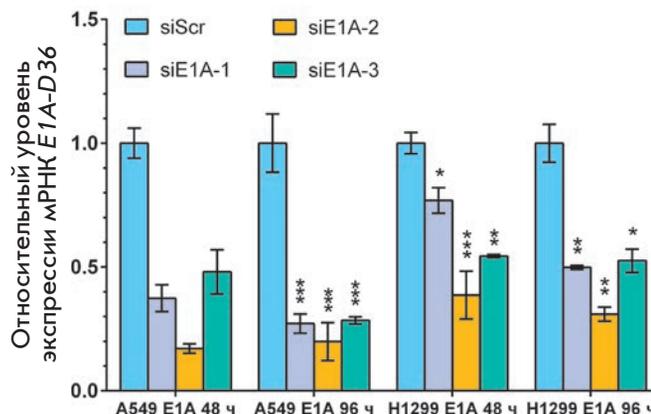


Рис. 3. Эффективность подавления экспрессии гена *E1A-D36* с помощью siРНК. Уровень экспрессии целевого гена *E1A* в клетках модельных линий A549 E1A и H1299 E1A оценивали методом ПЦР в реальном времени. Величина уровня экспрессии мРНК *E1A-D36* в контрольных образцах принята за 1. Все представленные данные получены в ходе трех независимых экспериментов. Различия между опытными и контрольными образцами статистически значимы во всех случаях (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

ген маркерного белка Cerulean и ген устойчивости к антибиотику бластицидину. В качестве контроля, иллюстрирующего отсутствие неспецифического действия shРНК, использовали вектор shScr-LeGO-Cerulean/BSD, несущий шпилечную структуру, не имеющую гомологии с известными вирусными мРНК, а также мРНК крысы, мыши и человека.

Такие лентивирусные векторы были введены в геном клеток H1299 с помощью трансдукции. Через 10 дней селекции клеток H1299 shE1A и H1299 shScr на бластицидине эффективность трансдукции оценивали с помощью проточной цитофлуориметрии по флуоресценции репортерного белка Cerulean. Количество флуоресцирующих клеток составило 92–98% от общего числа клеток в популяции по сравнению с контролем (нетрансдуцированные клетки линии H1299).

Затем клетки модельной линии H1299 shE1A трансдуцировали псевдолентивирусными частицами E1A-LeGO-iGT. Биологическую активность shE1A оценивали через 3, 6 и 10 дней после трансдукции с помощью ПЦР в реальном времени в ходе трех независимых экспериментов ($p < 0.05$). Уровень экспрессии целевого гена *E1A* под действием shE1A снизился на 57, 77 и 80% через 3, 6 и 10 дней соответственно по сравнению с контролем (рис. 4В).

Нами показано, что лентивирусные векторы, кодирующие shРНК, существенно подавляют экспрес-

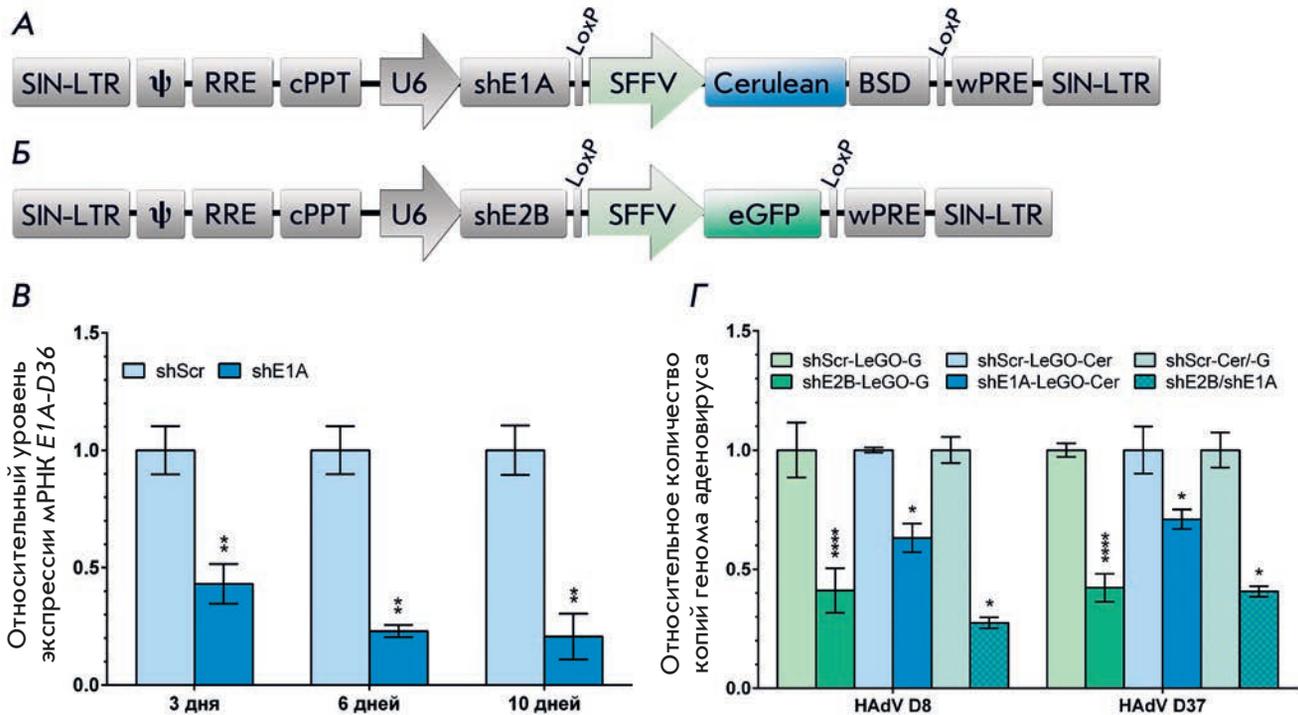


Рис. 4. Ингибирующая активность shРНК, направленных против мРНК ранних генов аденовирусов группы D человека. **А** – схема лентивирусного вектора LeGO-Cerulean/BSD, несущего шпилечную структуру shE1A, специфичную в отношении гена *E1A* HAdV D8, D19, D36 и D37. **Б** – схема лентивирусного вектора LeGO-G, несущего шпилечную структуру shE2B, специфичную в отношении гена *E2B* HAdV D8, D19, D36 и D37. SIN-LTR – самонактивирующийся (содержащий делецию промоторной области) длинный концевой повтор; ψ – сигнал упаковки; RRE – элемент, реагирующий на rev; cPPT – последовательность, богатая пуринами; U6 – промотор U6; SFFV – промотор вируса некроза селезенки; *E1A-D36* – ген *E1A* HAdV D36; IRES – внутренний сайт посадки рибосомы; *Cerulean* – ген флуоресцентного белка *Cerulean*; *eGFP* – ген флуоресцентного белка *eGFP*; *BSD* – ген устойчивости к антибиотику бластицидину; wPRE – посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурков. **В** – уровень экспрессии гена *E1A-D36* в клетках H1299, экспрессирующих shE1A, через 3, 6 и 10 дней после внесения трансгена *E1A-D36*. Величина уровня экспрессии мРНК *E1A-D36* в контрольных образцах принята за 1. Все представленные данные получены в ходе трех независимых экспериментов. Различия между опытными и контрольными образцами статистически значимы во всех случаях (** $p < 0.01$). **Г** – подавление репликации HAdV D8 и D37 в первичных клетках лимба человека с помощью shРНК. Количество копий генома аденовируса оценено методом количественной ПЦР. Количество копий генома аденовируса в контрольных образцах принято за 1. Все представленные данные получены в ходе трех независимых экспериментов. Различия между опытными и контрольными образцами статистически значимы во всех случаях (* $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$)

сию целевого гена *E1A-D36*. Необходимо добавить, что в модельных клетках в течение 10 дней сохраняется стабильное блокирование экспрессии *E1A-D36*, опосредованное экспрессирующими shРНК лентивирусными частицами. Это свидетельствует о высокой эффективности сконструированных нами лентивирусных векторов.

Подавление репликации аденовирусов группы D человека с помощью shРНК в первичных клетках лимба роговицы глаза человека

Мы оценили способность shРНК, направленных против мРНК ранних генов *E1A* и *E2B* HAdV, подавлять

репликацию вирусов. Первичные клетки лимба человека (Limb) трансдуцировали лентивирусными векторами shE2B-LeGO-G (рис. 4Б) и shE1A-LeGO-Cerulean/BSD, кодирующими shE2B и shE1A соответственно. В качестве контроля использовали клетки Limb, трансдуцированные псевдолентивирусными частицами, несущими shScr, последовательность которой не имеет гомологии с известными вирусными мРНК и мРНК мыши, крысы и человека.

Клетки полученных линий заражали HAdV D8 и HAdV D37, вызывающими эпидемический кератоконъюнктивит, с множественностью инфекции 20 ФОЕ/клетку. Клетки культивировали в течение

6 дней после заражения: этого времени достаточно для завершения полного цикла репликации аденовируса человека. Через 6 дней после инфекции эффективность действия shРНК оценивали методом количественной ПЦР по количеству копий генома HAdV D8 и HAdV D37. Мы наблюдали значительное подавление репликации аденовирусов человека в первичных клетках Limb. Количество копий генома HAdV D8 и HAdV D37 снижалось на 59 и 58% под действием shE2B, на 37 и 30% под действием shE1A, а также на 73 и 60% под действием одновременно shE2B и shE1A соответственно по сравнению с контролем (рис. 4Г).

Мы предполагаем, что в результате подавления экспрессии ранних генов аденовируса группы D человека цикл репликации аденовируса останавливается на ранней стадии. Это объясняет существенное снижение количества копий генома аденовирусов. Тем не менее нам не удалось добиться полного подавления вирусной репликации. Это можно связать с высоким значением множественности инфекции (20 ФОЕ/клетку), временем анализа образцов – 6 дней после инфекции, тогда как максимальный эффект подавления экспрессии целевых генов с помощью shРНК наблюдается на 9–10 день (рис. 4В) [10, 11], а также невысокой эффективностью трансдукции первичных клеток лимба человека (50–70% флуоресцирующих клеток в популяции по данным флуоресцентной микроскопии).

В ходе эксперимента мы использовали первичные клетки лимба человека, входящие в состав роговицы глаза человека, которая поражается при эпидемическом кератоконъюнктивите. Также мы использовали HAdV D8 и D37, основных возбудителей данного заболевания. Таким образом, нам удалось разработать модельную систему аденовирусной офтальмологиче-

ской инфекции *in vitro*, и с высокой эффективностью применить shРНК, направленные против ранних генов аденовирусов группы D человека, в качестве предполагаемых терапевтических агентов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами разработан подход к эффективному подавлению репликации аденовирусов группы D человека с помощью РНК-интерференции. С целью оценки ингибирующей активности siРНК, специфичных в отношении гена *E1A* HAdV D8, D19, D36 и D37, а также лентивирусных векторов, направляющих в клетках синтез аналогичной shРНК, мы получили модельные линии клеток, геном которых содержит экспрессирующую кассету «промотор – ген *E1A-D36* – IRES – маркерный ген *dTomato* – ген устойчивости к пуромицину». Такие модельные линии клеток позволяют быстро определять эффективность действия интерферирующих РНК, комплементарных различным участкам мРНК целевого гена.

Показана высокая эффективность таких векторов при подавлении репликации аденовирусов типов 8 и 37 группы D человека в первичных клетках лимба человека. Сочетанное действие shE1A и shE2B приводило к снижению числа копий генома аденовирусов в среднем на 70%.

Мы надеемся, что результаты нашего исследования будут полезны для разработки и создания современных лекарственных средств, высокоэффективных при заболеваниях человека, вызываемых аденовирусами. ●

Работа поддержана РФФИ (грант № 14-04-00821 А), а также программой Президиума РАН «Основы фундаментальных исследований нанотехнологий и наноматериалов».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gonzalez-Lopez J.J., Morcillo-Laiz R., Munoz-Negrete F.J. // Arch. Soc. Esp. Oftalmol. 2013. V. 88. № 3. P. 108–115.
- Alexeev V.N., Martynova E.B., Zhukova E.A. // Clin. Ophthalmol. Russian Med. J. 2005. V. 4. P. 146–149.
- Meyer-Rusenberg B., Loderstadt U., Richard G., Kaulfers P.M., Gesser C. // Dtsch Arztebl. Int. 2011. V. 108. № 27. P. 475–480.
- Langley J.M. // Pediatrics in Rev. 2005. V. 26. № 7. P. 244–249.
- Maychuk Y.F. // Russian Ophthalmol. J. 2008. V. 3. P. 18–25.
- Myers G.D., Krance R.A., Weiss H., Kuehnle I., Demmler G., Heslop H.E., Bollard C.M. // Bone Marrow Transplant. 2005. V. 36. № 11. P. 1001–1008.
- Trovato G.M., Martines G.F., Pirri C., Trovato F.M., Castro A., Garozzo A., Catalano D. // J. Clin. Gastroenterol. 2012. V. 46. № 6. P. e46–54.
- Skevaki C., Galani I., Pararas M., Giannopoulou K., Tsakris A. // Drugs. 2011. V. 71. № 3. P. 331–347.
- Kneidinger D., Ibrisimovic M., Lion T., Klein R. // Antiviral Res. 2012. V. 94. № 3. P. 195–207.
- Nikitenko N.A., Speiseder T., Groitl P., Spirin P.V., Prokofjeva M.M., Lebedev T.D., Rubtsov P.M., Lam E., Riecken K., Fehse B., et al. // Biochimie. 2015. V. 113. P. 10–16. doi:10.1016/j.biochi.2015.03.010
- Nikitenko N.A., Speiseder T., Groitl P., Spirin P.V., Prokofjeva M.M., Lebedev T.D., Rubtsov P.M., Lam E., Riecken K., Fehse B., et al. // Biochimie. 2015. doi:10.1016/j.biochi.2015.05.008
- Isobe T., Hattori T., Kitagawa K., Uchida C., Kotake Y., Kosugi I., Oda T., Kitagawa M. // J. Biol. Chem. 2009. V. 284. № 41. P. 27766–27779.
- Yousef A.F., Fonseca G.J., Pelka P., Ablack J.N., Walsh C., Dick F.A., Bazett-Jones D.P., Shaw G.S., Mymryk J.S. // Oncogene. 2010. V. 29. № 33. P. 4693–4704.
- Bantounas I., Phylactou L.A., Uney J.B. // J. Mol. Endocrinol. 2004. V. 33. № 3. P. 545–557.

15. Vilgelm A.E., Chumakov S.P., Prassolov V.S. // *Mol. Biol.* 2006. V. 40. № 3. P. 339–354.
16. Spirin P.V., Baskaran D., Orlova N.N., Rulina A.V., Nikitenko N.A., Rubtsov P.M., Chumakov P.M., Prassolov V.S., Chernolovskaya E.L., Zenkova M.A., et al. // *Mol. Biol.* 2010. V. 44. № 5. P. 776–786.
17. Spirin P.V., Nikitenko N.A., Lebedev T.D., Rubtsov P.M., Prassolov V.S., Stocking C. // *Mol. Biol.* 2011. V. 45. № 6. P. 950–958.
18. Elbashir S.M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K., Tuschl T. // *Nature.* 2001. V. 411. № 6836. P. 494–498.
19. Lebedev T.D., Spirin P.V., Prassolov V.S. // *Acta Naturae.* 2013. V. 5. № 2. P. 7–18.
20. Singer O., Verma I.M. // *Curr. Gene Ther.* 2008. V. 8. № 6. P. 483–488.
21. Manjunath N., Wu H., Subramanya S., Shankar P. // *Adv. Drug Deliv Rev.* 2009. V. 61. № 9. P. 732–745.
22. Graham F.L., Smiley J., Russell W.C., Nairn R. // *J. Gen. Virol.* 1977. V. 36. № 1. P. 59–74.
23. Mitsudomi T., Steinberg S.M., Nau M.M., Carbone D., D'Amico D., Bodner S., Oie H.K., Linnoila R.I., Mulshine J.L., Minna J.D., et al. // *Oncogene.* 1992. V. 7. № 1. P. 171–180.
24. Borzenok S.A., Onishchenko N.A., Tonaeva K.D., Komakh Y.A., Kovshun Y.V., Strusova N.A. // *Russian J. Transplantol. Artificial Organs.* 2014. V. 16. № 1. P. 12–20.
25. Borzenok S.A., Onischenko N.A., Tonaeva K.D., Komakh Y.A., Suskova V.S., Suskov S.I., Didenko L.V., Shevlyagina N.V., Kost E.A. // *Russian J. Transplantol. Artificial Organs.* 2012. V. 14. № 2. P. 78–85.
26. Weber K., Bartsch U., Stocking C., Fehse B. // *Mol. Ther.* 2008. V. 16. № 4. P. 698–706.
27. Weber K., Mock U., Petrowitz B., Bartsch U., Fehse B. // *Gene Ther.* 2010. V. 17. № 4. P. 511–520.
28. Yuan B., Latek R., Hossbach M., Tuschl T., Lewitter F. // *Nucleic Acids Res.* 2004. V. 32. Web Server issue. P. W130–134.
29. Heim A., Ebnet C., Harste G., Pring-Akerblom P. // *J. Med. Virol.* 2003. V. 70. № 2. P. 228–239.
30. Debbas M., White E. // *Genes Dev.* 1993. V. 7. № 4. P. 546–554.
31. Zhou Y., Aran J., Gottesman M.M., Pastan I. // *Hum. Gene Ther.* 1998. V. 9. № 3. P. 287–293.
32. Nikitenko N.A., Prassolov V.S. // *Acta Naturae.* 2013. V. 5. № 3. P. 35–53.