

ОЦЕНКА ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИИ ИНТЕРСТИЦИАЛЬНОЙ КОЛЛАГЕНАЗЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ПСОРИАЗА

Ю. А. Могилевцева¹, А. В. Мезенцев² ✉, С. А. Брускин²

¹ Российский государственный аграрный университет–МСХА имени К. А. Тимирязева, Москва

² Лаборатория функциональной геномики, отдел генетических основ биотехнологии, Институт общей генетики имени Н. И. Вавилова РАН, Москва

Матриксные металлопротеиназы играют важную роль в поддержании гомеостаза кожи, заживлении ран и инициации воспалительного процесса. При псориазе матриксные металлопротеиназы участвуют в структурных перестройках эпидермиса и регуляции проницаемости микрокапилляров дермы, способствуя инфильтрации кожи клетками иммунной системы. В силу этого умение контролировать активность матриксных металлопротеиназ представляется необходимым для успешного лечения псориаза. Целью данной работы являлась оценка возможных изменений в патогенезе псориаза в результате РНК-интерференции интерстициальной коллагеназы в эпидермальных кератиноцитах. Для этого клетки трансдуцировали лентивирусными частицами, кодирующими в геноме малую интерферирующую РНК. Для анализа уровней экспрессии генов использовали метод полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени». Ферментативную активность определяли методом зимографии. Согласно полученным результатам РНК-интерференция привела к снижению уровня экспрессии гена и ферментативной активности интерстициальной коллагеназы в 20 и 4 раза соответственно. При этом экспрессия гомологичных генов (*MMP2*, *-9* и *-12*) менялась незначительно. Напротив, нами были показаны изменения в уровнях экспрессии генов цитокератинов (*KRT1*: $16,89 \pm 0,97$; *KRT14*: $2,36 \pm 0,19$; *KRT17*: $0,12 \pm 0,01$; *KRT18*: $0,56 \pm 0,02$), инволюкрина ($0,79 \pm 0,11$) и филаггрина ($6,99 \pm 0,97$). Помимо этого, РНК-интерференция вызвала существенное снижение скорости миграции клеток, хотя практически не повлияла на их пролиферацию. Таким образом, терапевтический потенциал малых интерферирующих РНК, специфичных к интерстициальной коллагеназе, заключается в нормализации экспрессии важных для патогенеза псориаза генов (*IVL*, *FLG*, *KRT1*, *-14* *-17* и *-18*).

Ключевые слова: псориаз, интерстициальная коллагеназа, лентивирусы, трансдукция, трансфекция, малая интерферирующая РНК, цитокератины, инволюкрин, филаггрин

Благодарности: авторы благодарят проф. Элеонору Пирузян (Институт общей генетики имени Н. И. Вавилова РАН) за критический анализ текста рукописи и проф. Марию Лагаркову (Институт общей генетики имени Н. И. Вавилова РАН) — за предоставление необходимых для работы плазмид.

✉ **Для корреспонденции:** Мезенцев Александр Викторович
ул. Губкина, д. 3, г. Москва, 119333; mesentsev@vigg.ru

Статья получена: 17.02.2017 **Статья принята к печати:** 25.03.2017

RNA INTERFERENCE TARGETING INTERSTITIAL COLLAGENASE IS A POTENTIAL THERAPEUTIC TOOL TO TREAT PSORIASIS

Mogilevtseva YuA¹, Mezentsev AV² ✉, Bruskin SA²

¹ Russian State Agrarian University - Timiryazev Moscow Agricultural Academy, Moscow, Russia

² Laboratory of Functional Genomics, Department of Genetics and Biotechnology, Vavilov Institute of General Genetics of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Matrix metalloproteinases play an important role in maintaining skin homeostasis, promote wound healing, and are involved in triggering inflammation. They are implicated in the structural changes occurring in the epidermis of psoriatic patients and also facilitate infiltration of the skin by immune cells by regulating permeability of dermal capillaries. In this light, control over the enzymatic activity of matrix metalloproteinases is crucial for a successful treatment outcome in patients with psoriasis. The aim of this work was to investigate the effect of RNA interference on the progression of psoriasis by targeting interstitial collagenase of epidermal keratinocytes. As part of the experiment, the latter were transduced with lentiviral particles that encode small hairpin RNA. Gene expression was measured by real time polymerase chain reaction. Enzymatic activity was measured by zymography. RNA interference was found to lead to a 20- and 4-fold decrease in the expression and enzymatic activity of interstitial collagenase, respectively. Expression of homologous genes (*MMP2*, *-9* and *-12*) changed insignificantly. In contrast, there were marked changes in expression of cytokeratin (*KRT1*: 16.89 ± 0.97 ; *KRT14*: 2.36 ± 0.19 ; *KRT17*: 0.12 ± 0.01 ; *KRT18*: 0.56 ± 0.02), involucrin (0.79 ± 0.11) and filaggrin (6.99 ± 0.97). Besides, RNA interference caused a significant decline in cell migration rates, although it did not affect cell proliferation. Thus, small hairpin RNAs targeting interstitial collagenase are potentially therapeutic for psoriatic patients due to their ability to regulate expression of genes implicated in psoriasis (*IVL*, *FLG*, *KRT1*, *-14*, *-17*, and *-18*).

Keywords: psoriasis, interstitial collagenase, lentiviruses, transduction, transfection, small hairpin RNA, cytokeratins, involucrin, filaggrin

Acknowledgements: the authors thank Prof. Eleonora Piruzian of Vavilov Institute of General Genetics for a critical analysis of the manuscript and Prof. Maria Lagarkova of Vavilov Institute of General Genetics for the plasmids used in this study.

✉ **Correspondence should be addressed:** Aleksandr Mezentsev
ul. Gubkina, d. 3, Moscow, Russia, 119333; mesentsev@vigg.ru

Received: 17.02.2017 **Accepted:** 25.03.2017

Псориаз является наиболее распространенным дерматозом [1]. К числу основных признаков псориаза обыкновенного, на который приходится до 90 % вновь регистрируемых случаев болезни, относятся видоизменение внешнего облика кожных покровов (образование псориатических бляшек), хроническое воспаление кожи и, как следствие, инфильтрация кожи клетками иммунной системы. На молекулярном уровне для заболевания характерно изменение уровней экспрессии генов, связанных с дифференцировкой эпидермальных кератиноцитов: в пораженной болезнью коже разнонаправленно изменяются уровни экспрессии генов цитокератинов (уменьшение экспрессии *KRT1* и *KRT14* и увеличение — *KRT17* и *KRT18*), инволюкрина и филагтрина.

К сожалению, вылечить псориаз пока нельзя, а существующие медицинские препараты позволяют контролировать болезнь только в течение определенного периода времени. По этой причине поиск новых подходов к лечению псориаза остается актуальной социально значимой задачей, которая требует безотлагательного решения. Очевидно, что для разработки эффективных методов лечения заболевания необходимо знать, каким образом происходит образование псориатических бляшек и как можно воздействовать на этот процесс. В свою очередь, для этого необходимо установить основных участников патогенеза псориаза и охарактеризовать их роль в развитии патологии.

Объектом наших исследований является интерстициальная коллагеназа (ИК), которая при псориазе играет важную роль в структурных перестройках эпидермиса, взаимодействии эпидермальных кератиноцитов друг с другом, а также в регуляции проницаемости микрокапилляров дермы для клеток иммунной системы [2]. Также известно, что нарушения в экспрессии генов некоторых матриксных металлопротеиназ, включая ИК, совпадают по времени с обострением псориаза, а содержание кодируемых ими белков в пораженной болезнью ткани коррелирует со степенью тяжести заболевания. По этой причине нам представляется важным уметь контролировать металлопротеиназную активность в пораженных болезнью участках кожи.

Ранее для контроля активности матриксных металлопротеиназ предполагалось использовать их специфические ингибиторы. Однако разработка таких веществ и их внедрение в клиническую практику были признаны нецелесообразными. В одних случаях причиной отказа от использования ингибиторов была их низкая эффективность [3], в других — тяжелые побочные эффекты, которые могли представлять серьезную угрозу для жизни пациентов [4]. Одним из способов контроля экспрессии генов матриксных металлопротеиназ может стать РНК-интерференция («нокдаун») целевого гена, т. е. воздействие на пораженную болезнью область кожи препаратами, способными избирательно разрушать его транскрипты (молекулы мРНК). Например, такие препараты могли бы содержать неvirulentные вирусные частицы, которые при попадании в клетку нарабатывали бы в ней специфичную малую интерферирующую РНК (shРНК) [5, 6].

Важно отметить, что, согласно данным литературы, разные линии клеток характеризуются разной эффективностью трансфекции даже при использовании одного и того же протокола. Так, по сравнению с клетками эмбрионального почечного эпителия человека HEK293, эффективность трансфекции и трансдукции эпидермальных кератиноцитов человека HaCaT сравнительно невелики [7].

Это может происходить, по меньшей мере, по двум причинам. Во-первых, несмотря на то, что HaCaT — это иммортализованные клетки, в них в отличие от других клеточных линий продолжают работать механизмы, защищающие клетку от попадания чужеродной РНК. В частности, HaCaT экспрессируют рецепторы TLR3 и TLR7, ответственные за ее распознавание [8, 9]. Во-вторых, по своему происхождению HaCaT относятся к эпидермальным кератиноцитам. В живом организме эти клетки выполняют, прежде всего, барьерную функцию, предотвращая попадание в него микробов и вредных химических соединений, а также ослабляют действие вредного излучения (например, УФ или ионизирующей радиации). В силу этого не удивительно, что клетки HaCaT более устойчивы к действию трансфекционных реагентов чем, например, клетки внутренних органов [10]. Поэтому доставка shРНК в первичные клетки, например при проведении аналогичных экспериментов на животных, особенно в клетки кожи, представляется нам весьма нетривиальной задачей.

В работе были оценены изменения в патогенезе псориаза, вызываемые РНК-интерференцией ИК в эпидермальных кератиноцитах человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеток

Клетки культивировали в среде DMEM, которая содержала L-глутамин («ПанЭко», Россия), антибиотик-антимикотик и 5 % эмбриональной сыворотки теленка (Thermo Fisher Scientific, США). В процессе роста клеток культуральную среду меняли через день. При покрытии клетками 70–75 % ростовой поверхности чашки культуру пересевали. В каждую новую чашку переносили пятую часть собранных клеток. Для подсчета клеток использовали камеру Горяева. Для анализа фотографических изображений трансдуцированных клеток (измерений площади, занятой клетками, и определения долей клеток, обладающих флуоресценцией) использовали сервисные опции Freehand selection и Cell counter программы ImageJ (NIH, США) соответственно.

Получение трансгенных эпидермальных кератиноцитов

Для получения генетически модифицированных вирионов, в геноме которых закодированы нужные для нашей работы shРНК, нами была проведена трансфекция клеток эмбрионального почечного эпителия человека HEK293 (одной из так называемых packaging cell lines) набором из четырех плазмид: pMDLg-pRRE, pREV-TRE, pCMV_VSV_G и pGPV. Плазмиды pMDLg-pRRE, pREV-TRE, pCMV_VSV_G, которые кодировали гены, участвующие в сборке вирионов, были любезно предоставлены проф. М. А. Лагарьковой (Институт общей генетики имени Н. И. Вавилова РАН). Векторы лентивирусного происхождения pGPV-17019250-ММП1 и pGPV-17019250-кММП1, в геноме которых были закодированы shРНК, были получены, как описано ранее [11, 12]. Соответственно, вектор pGPV-17019250-ММП1 использовали для получения клеток с «нокдауном» ИК, а вектор pGPV-17019250-кММП1 — для получения контрольных клеток, которые экспрессировали «бессмысленную» (контрольную) shРНК. Немаловажно также, что в исходном векторе pGPV были также закодированы гены фактора устойчивости к пуromицину и зеленого флуоресцентного белка (*PuroR* и *copGFP* соответственно),

необходимые для отбора клеток, устойчивых к упомянутому антибиотику. Непосредственно перед началом эксперимента упомянутые выше плазмиды смешивали в весовом соотношении 10 : 5 : 2 : 10. К полученному водному раствору плазмид добавляли небогатую питательную среду (DMEM) и реагент для трансфекции метафектен (Metafectene; Biontex, Германия), следуя указаниям фирмы-производителя. По окончании 15-минутной инкубации, которую проводили при комнатной температуре, раствор добавляли в культуру клеток HEK293, которая находилась в активной фазе роста (30–40 % покрытия ростовой поверхности чашки). Через 6 ч после начала трансфекции культуральную среду меняли на свежую. В течение последующих за трансфекцией четырех дней проводили отбор среды, содержащей вирионы. Собранную среду фильтровали от попавших в нее клеток (диаметр пор фильтра — 0,4 мкм) и использовали для трансдукции клеток NaCaT.

Для проведения трансдукции использовали культуры эпидермальных кератиноцитов человека NaCaT, находившиеся в фазе активного роста (не более 60 % покрытия ростовой поверхности чашки) и питательную среду, собранную при проведении трансфекции клеток HEK293. В течение 4 дней, следующих за трансфекцией HEK293, питательную среду в чашках с NaCaT заменяли фильтрованной средой, собранной при трансфекции HEK293. Затем в течение недели, следующей за трансдукцией, клетки культивировали в питательной среде, которая содержала 5 мкг/мл пурамицина (Thermo Fisher Scientific), для того чтобы провести их селекцию на устойчивость к данному антибиотику. Таким образом, в результате трансдукции были получены две новые линии клеток (NaCaT-ИК и NaCaT-КТП) с различным уровнем экспрессии ИК.

Получение клеточного гомогената

Для получения гомогенатов использовали культуры клеток, покрывавшие 60–70 % ростовой поверхности чашки. Клетки ресуспендировали в буфере RIPA следующего состава: 25 мМ ТРИС, 150 мМ NaCl, 0,1 % додецилсульфат натрия, 0,5 % дезоксихолат натрия, 1 % NP-40, pH 7.4 (Thermo Fisher Scientific). Буфер охлаждали до температуры 2–8 °С до полного разрушения клеток (1–2 мин) из расчета 500 мкл буферного раствора на флакон (общая площадь флакона — 25 см²).

Определение концентрации белка

Для определения концентрации белка использовали флуориметрический метод и набор реагентов Qubit Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) в соответствии с указаниями фирмы-производителя.

Электрофорез белков в полиакриламидном геле и зимография

Для проведения электрофореза в полиакриламидном геле использовали метод Лэммли [13, 14]. Концентрация акриламида в разделяющем и концентрирующем гелях составляла 10 и 5 % соответственно. Для проведения зимографии использовали 10 % полиакриламидный гель, содержащий 4 мг/мл коллагена (Thermo Fisher Scientific). Компоненты геля смешивали на ледяной бане при температуре 2–8 °С, а его полимеризацию проводили при комнатной температуре. Для электрофоретического раз-

деления белков и последующей обработки геля использовали ранее опубликованный протокол [15]. Количественную оценку ферментативной активности ИК проводили методом денситометрии, используя сервисную опцию Gels программы ImageJ.

Получение суммарной РНК

Для выделения суммарной РНК из клеток использовали TRIzol (Thermo Fisher Scientific), как описано ранее [16]. Качество препаратов РНК проверяли методом электрофореза в 1,5 % агарозном геле в неденатурирующих условиях. Для измерения концентрации РНК использовали флуориметрический метод и набор реагентов Qubit RNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) в соответствии с указаниями фирмы-производителя.

ПЦР в режиме «реального времени»

Перед проведением эксперимента из образцов выделенной РНК получали кДНК, используя набор реагентов MMLV RT («Евроген») в соответствии с указаниями фирмы-производителя. При проведении полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме «реального времени» использовали праймеры выбранных генов из базы данных Probe [17], образцы кДНК и набор реагентов qPCRMix-HS SYBR + HighROX («Евроген»). Для приготовления проб указанные компоненты смешивали между собой в соответствии с указаниями фирмы-производителя. Общий объем пробы составлял 25 мкл, конечная концентрация праймеров — 1 мкМ, а предполагаемая концентрация кДНК — 4 мкг/мл. Эксперименты проводили на приборе Eco (Illumina, США) в 48-луночных планшетах, предоставленных фирмой-производителем прибора, в соответствии с прилагаемыми инструкциями. Температура амплификации составляла 60 °С. Перед началом эксперимента планшеты запечатывали прозрачной пленкой. После этого, чтобы избежать неравномерного распределения содержимого проб в лунках, планшеты центрифугировали (100 g; 3 мин; 18 °С). Полученные результаты нормализовали к уровню экспрессии гена *ACTB*. Результаты анализировали при помощи программы Eco, предоставленной производителем прибора. Экспериментальный дизайн предполагал использование трех биологических повторов для каждой из проб. Помимо этого каждый эксперимент повторяли трижды.

Количественная оценка пролиферации клеток

Для количественной оценки пролиферации в 6-луночные планшеты высевали по 40 000 клеток на лунку. Ежедневно случайно выбранные образцы обрабатывали 0,25 % раствором трипсина-ЭДТА («ПанЭко»), после чего, используя камеру Горяева, в них определяли количество клеток. Данные по образцам использовали для построения кривых роста. Результаты представляли в линейных координатах. Каждый эксперимент повторяли трижды.

Количественная оценка миграции клеток

Для проведения количественной оценки миграции клетки культивировали до тех пор, пока они полностью не покрывали поверхность культуральной чашки. Перед началом эксперимента, используя носик для автоматической пипетки, по поверхности чашки проводили прямую линию, очищая от клеток полосу шириной ~1,25 мм. Полученные

таким образом образцы культивировали в течение 5–6 дней, ежедневно фотографируя участки не занятых клетками областей. Для количественной оценки свободной от клеток ростовой поверхности использовали сервисную опцию Freehand selection программы ImageJ.

Статистическая обработка результатов

Результаты измерений представляли в виде: среднее значение \pm стандартное отклонение ($m \pm SD$). Для сравнения средних значений двух и более групп использовали однофакторный дисперсионный анализ. Если вероятность ошибки при отклонении нулевой гипотезы не превышала 0,05, то статистические различия между средними величинами считали статистически значимыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение лентивирусных частиц

При проведении трансфекции флуоресценция трансфицированных НЕК293 была заметна уже на следующий день после начала эксперимента, а в последующие дни доля флуоресцирующих клеток возрастала до 75–85 % (рис. 1А). Помимо этого, нами было установлено, что трансфекция вектором, который кодирует shРНК, специфичную к ИК, влияет на прикрепление клеток к ростовой поверхности. Так, в отличие от клеток, трансфицированных вектором, кодирующим контрольную shРНК (НЕК293-КТР), клетки, трансфицированные вектором, кодирующим специфичную shРНК (НЕК293-ИК), остаются в прикрепленном состоянии при «подкислении» среды, которое можно было наблюдать при их продолжительном культивировании, и требуют обработки трипсином при необходимости пересеять культуру.

Получение эпидермальных кератиноцитов с экспрессией shРНК и их последующая селекция на устойчивость к пурамицину

При проведении трансдукции клеток HaCaT флуоресценция в трансдуцированных клетках была заметна на второй день проведения эксперимента. При этом доля флуоресцирующих клеток в образцах не превышала ~10 % (рис. 1Б). На третий и четвертый день доля клеток HaCaT с флуоресценцией возрастала до 35–50 %.

Полученные образцы клеток проверяли на устойчивость к антибиотику пурамицину. В течение первых 3 дней культивирования происходило резкое снижение количества клеток. При этом нетрансдуцированные клетки (отрицательный контроль) оказались неустойчивы к действию антибиотика (рис. 1В). Напротив, количество жизнеспособных клеток в других образцах составило ~15–25 % от общего числа клеток, обработанных антибиотиком.

Помимо этого, нами было установлено, что клетки, трансдуцированные вирионами, кодирующими shРНК, специфичную к ИК (HaCaT-ИК), и контрольную shРНК (HaCaT-КТР), различаются по своим морфологическим признакам. Так, клетки HaCaT-ИК образовывали колонии с резко очерченными границами (рис. 2А). При этом сами клетки часто располагались одна над другой, что свидетельствовало об образовании между ними более прочных по сравнению с клетками HaCaT-КТР контактов (рис. 2Б). Напротив, HaCaT-КТР сохраняли характерные для не-

трансдуцированных клеток морфологические признаки: границы образованных ими колоний были «размыты», а по достижении конfluence клетки образовывали правильную монослой.

Особенности профиля генной экспрессии в трансдуцированных клетках

Использование РНК-интерференции позволило снизить уровень экспрессии гена ИК примерно в 20 раз. При этом анализ уровней экспрессии генов, кодирующих матриксные металлопротеиназы (*MMP2*, *MMP9* и *MMP12*), проведенный методом количественной ПЦР, не выявил статистически значимых изменений (рис. 3А). Напротив, нами были обнаружены изменения в уровнях экспрессии генов инволюлина и филаггрина (0.79 ± 0.11 и 6.99 ± 0.97 соответственно, рис. 3Б). В здоровой коже упомянутые гены играют ключевую роль в дифференцировке эпидермальных кератиноцитов. Помимо этого, в клетках с недостатком ИК происходят изменения в экспрессии генов, кодирующих характерные для эпидермиса здоровой и пораженной псориазом кожи цитокератины (рис. 3В). Так, в клетках HaCaT-ИК по сравнению с клетками HaCaT-КТР экспрессия первых (*KRT1* и *KRT14*) возрастала в $16,89 \pm 0,97$ и $2,36 \pm 0,19$ раз соответственно, а экспрессия вторых (*KRT17* и *KRT18*) снижалась до $0,12 \pm 0,01$ и $0,56 \pm 0,02$ соответственно.

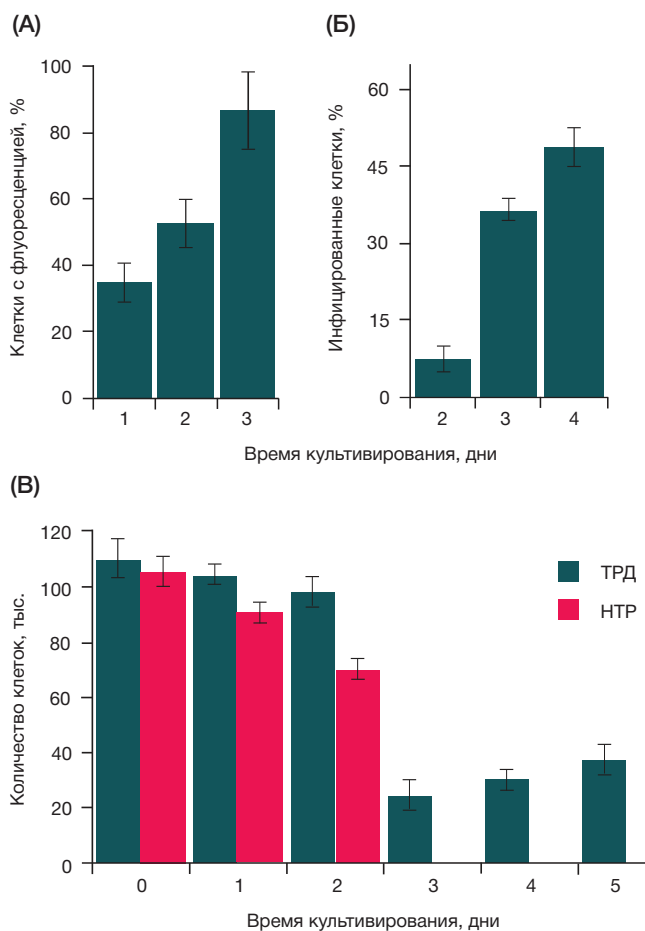


Рис. 1. Лентивирусная трансдукция клеток. **(А)** Изменение доли флуоресцирующих клеток НЕК293 при проведении трансфекции; **(Б)** Изменение доли флуоресцирующих клеток HaCaT при проведении трансдукции; **(В)** Изменение числа клеток в образцах при отборе клеток, устойчивых к пурамицину. TRD — трансдуцированные клетки; NTR — нетрансдуцированные клетки (отрицательный контроль). Трансдукцию и трансфекцию клеток проводили так, как описано в разделе «Материалы и методы»

Пролиферация и миграция трансдуцированных клеток

Анализ кривых роста клеток HaCaT-ИК и HaCaT-КТР не выявил достоверных отличий (рис. 4А). Напротив, сравнение скоростей миграции клеток показало, что РНК-интерференция ИК влияет на скорость миграции (рис. 4Б). В то время как клетки HaCaT-КТР за 5 дней культивирования покрывали ~85 % свободной поверхности, аналогичный показатель для HaCaT-ИК составил менее 40 % (рис. 4В).

Изменения ферментативной активности ИК в трансдуцированных клетках

Сравнение ферментативной активности секретируемой ИК показало, что обе линии трансдуцированных клеток синтезируют секретируемые коллагеназы (ИК, MMP2 и MMP9) и секретируют их в питательную среду (рис. 5А и Б). При этом в HaCaT-ИК по сравнению с HaCaT-КТР уровень экспрессии ИК, согласно результатам денситометрии, снижен в 4 раза (рис. 5В). В дополнение анализ клеточных гомогенатов позволяет детектировать незначительные количества про-MMP1 в образцах, полученных из HaCaT-КТР. При этом в клеточных гомогенатах HaCaT-ИК существенного накопления ИК не происходит (рис. 5Б и В).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе нами были получены клеточные линии иммортализованных эпидермальных кератиноцитов человека: HaCaT-КТР, экспрессировавшие «бесмысленную» (контрольную) shРНК, которые в дальнейшем использовали в качестве контроля, и HaCaT-ИК, экспрессировавшие shРНК, специфичную к ИК. Нами были охарактеризованы морфологические особенности клеток HaCaT-КТР и HaCaT-ИК (рис. 2). Мы также показали, что экспрессия shРНК, специфичной к ИК, влияет на скорость миграции клеток (рис. 4В), но практически не влияет на скорость их пролиферации (рис. 4А). Наконец, нами были установлены изменения в уровнях экспрессии генов цитокератинов (*KRT1*, *-14*, *-17* и *-18*), а также генов инволюкрина (*IVL*) и филагрина (*FLG*), которые играют ключевую роль в дифференцировке эпидермальных кератиноцитов (рис. 3).

Примечательно, что в процессе культивирования трансдуцированных клеток мы наблюдали между ними отличия по морфологическим признакам. При культивировании HaCaT-ИК колонии этих клеток имели резко очерченные границы, а многие из клеток располагались друг над другом (рис. 2А). Напротив, клетки HaCaT-КТР сохраняли облик, характерный для нетрансфицированных

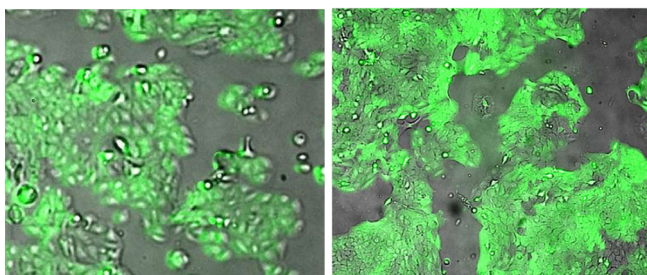


Рис. 2. Влияние экспрессии miРНК на морфологические характеристики трансдуцированных клеток. (А) Клетки, экспрессирующие контрольную shРНК. (Б) Клетки, экспрессирующие shРНК, специфичную к интерстициальной коллагеназе. Трансдукцию клеток HaCaT проводили так, как описано в разделе «Материалы и методы»

клеток. Границы колоний, образованных этими клетками, были размыты, а при продолжительном культивировании HaCaT-КТР образовывали правильный монослой (рис. 2Б). По причине же того, что геномы клеток отличались только по одному из генов (гену, который кодировал shРНК), мы сделали заключение, что наблюдаемые морфологические различия между HaCaT-ИК и HaCaT-КТР вызваны непосредственно РНК-интерференцией ИК.

Согласно данным литературы (например, [2]), ИК регулирует образование межклеточных контактов, а также перемещение клеток, например при повреждении кожных покровов. Например, клетки с высоким уровнем экспрессии ИК (такие как инвазивные раковые клетки) слабо взаимодействуют друг с другом, но при этом обладают высокой мобильностью. Напротив, подавление экспрессии ИК в этих клетках, например при помощи специфичной РНК-интерференции, способствует образованию между ними межклеточных контактов, а также замедляет их

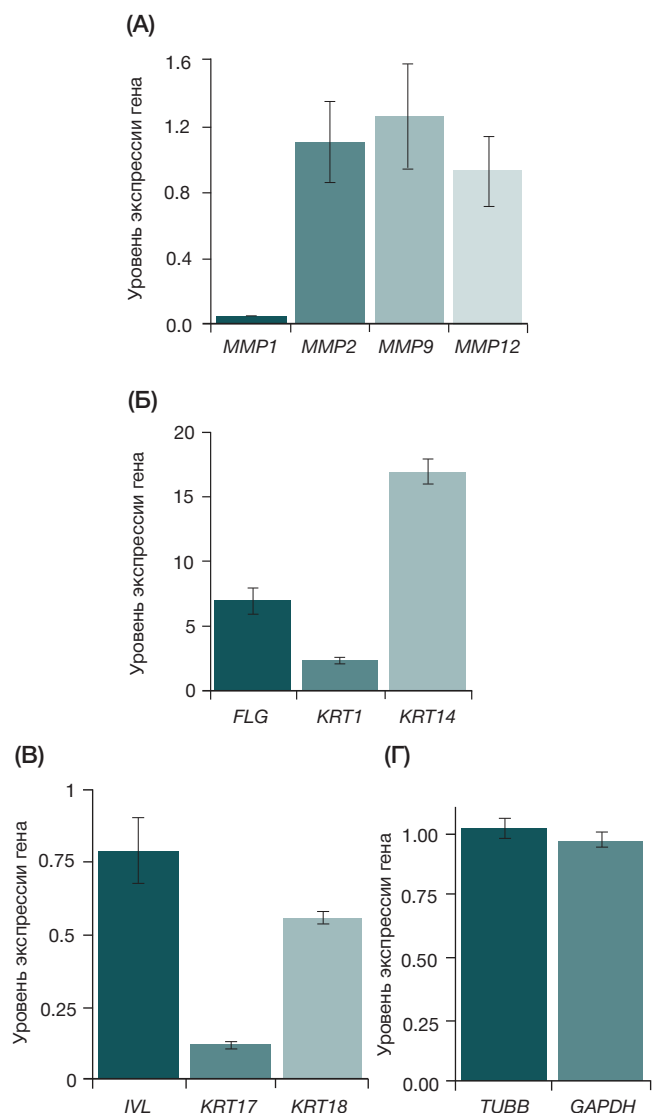


Рис. 3. Оценка изменений генной экспрессии в трансдуцированных эпидермальных кератиноцитах человека методом количественной ПЦР. (А) Изменения в экспрессии матричных металлопротеиназ. (Б) и (В) Изменения в экспрессии генов с повышенной и пониженной экспрессией соответственно. (Г) Экспрессия генов «домашнего хозяйства». Данные измерений нормировали по уровню экспрессии гена *ACTB*. На рисунке показаны результаты сравнения генной экспрессии в эпидермальных кератиноцитах, экспрессирующих shРНК, специфичную к интерстициальной коллагеназе и контрольную shРНК (см. раздел «Материалы и Методы»)

миграцию, что, в свою очередь, снижает риск образования метастазов в удаленных органах и тканях животных-реципиентов [18]. В силу этого неудивительно, что в наших экспериментах были получены похожие результаты. Клетки HaCaT-ИК образовывали более прочные межклеточные контакты между собой и мигрировали со скоростью примерно в 2,5 раза меньшей, чем клетки HaCaT-KTP (рис. 4Б и В). Аналогичные изменения, такие как более прочное взаимодействие клеток с ростовой поверхностью, мы также наблюдали и при проведении трансфекции НЕК293 вектором, который кодировал shРНК, специфичную к ИК.

Далее, принимая во внимание особенности строения эпидермиса, следует заметить, что способностью к миграции обладают, как правило, недифференцированные и слабодифференцированные клетки базального слоя, число которых возрастает в пораженных псориазом участках кожи. Напротив, клетки, находящиеся на более поздних стадиях дифференцировки, прочно связаны друг с другом десмосомами. По этой причине мы предположили, что наблюдаемые морфологические изменения в HaCaT-ИК могут быть связаны не только со снижением активности ИК, но и с инициацией процесса дифференцировки этих клеток.

Как уже было показано ранее, резкие изменения в экспрессии одного из генов, такие как его «суперэкспрессия» или «нокаут» способны кардинальным образом перестроить работу всего организма и вызвать существенные изменения в экспрессии, по меньшей мере, нескольких сотен других генов [20, 21]. РНК-интерференция, напротив, позволяет откорректировать уровень генной экспрессии до необходимого значения, например за счет использования в эксперименте нуклеотидных последовательностей с различным родством к специфичной мРНК, а также подбора необходимого для проведения трансдукции количества вирусных частиц. Так, сравнение уровней экспрессии генов в HaCaT-ИК и HaCaT-KTP, выполненное методом количественной ПЦР, показало, что почти двадцатикратное снижение уровня экспрессии гена, кодирующего ИК (*MMP1*), вследствие РНК-интерференции не привело к существенным изменениям в уровне экспрессии генов других (гомологических) матриксных металлопротеиназ, таких как *MMP2*, -9 и -12 (рис. 3А).

Отсутствие статистически значимых изменений в уровне экспрессии этих генов важно, по крайней мере, по двум причинам. Прежде всего, это говорит в пользу того, что нам удалось селективно блокировать биосинтез ИК, не затрагивая экспрессию генов, сиквенс которых имеет высокую степень гомологии с мРНК ИК. Кроме того, полученный результат представляется нам также очень важным в контексте специфичности наблюдаемых нами фенотипических изменений клеток (рис. 2).

В то же время количественная оценка активности ИК, выполненная методом денситометрии, показала, что РНК-интерференция приводит только к четырехкратному снижению активности фермента в культуральной среде (рис. 5Б). При этом мы не наблюдали существенного накопления ИК внутри клеток (рис. 5Б). Наблюдаемые различия в изменениях уровня экспрессии гена ИК (рис. 3А) и уровне ферментативной активности белка (рис. 5Б), по нашему мнению, вызваны превышением верхней границы чувствительности метода денситометрии. Дело в том, что интенсивность наблюдаемых в геле полос может расти пропорционально до определенного предела. Соответственно, сравнительно небольшая разница в оценке

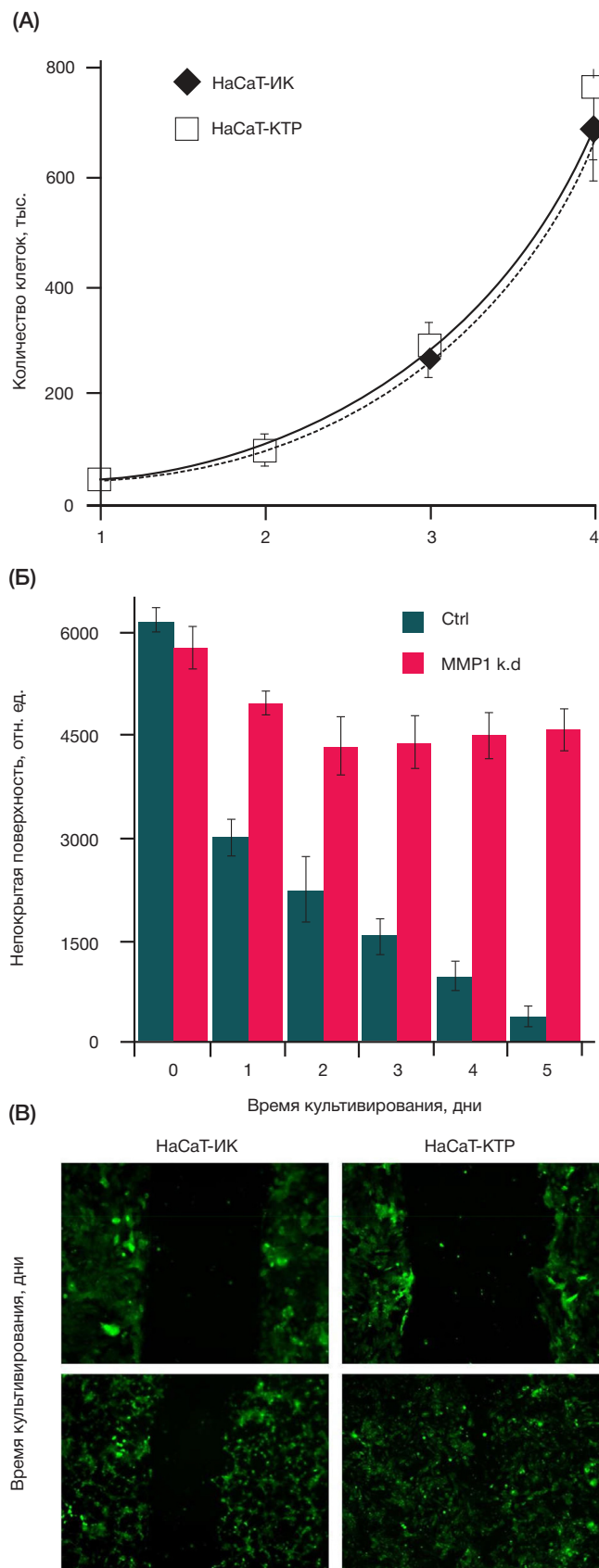


Рис. 4. Влияние экспрессии shРНК, специфичной к интерстициальной коллагеназе (ИК), на пролиферацию и миграцию трансдуцированных клеток. Анализ кривых роста (А) и количественная оценка скорости миграции (Б) клеток HaCaT, экспрессирующих shРНК, специфичную к ИК и контрольную shРНК. (В) Миграция трансдуцированных клеток: состояние культур на следующий день после начала эксперимента и по его окончании. Детали экспериментальных процедур описаны в разделе «Материалы и методы»

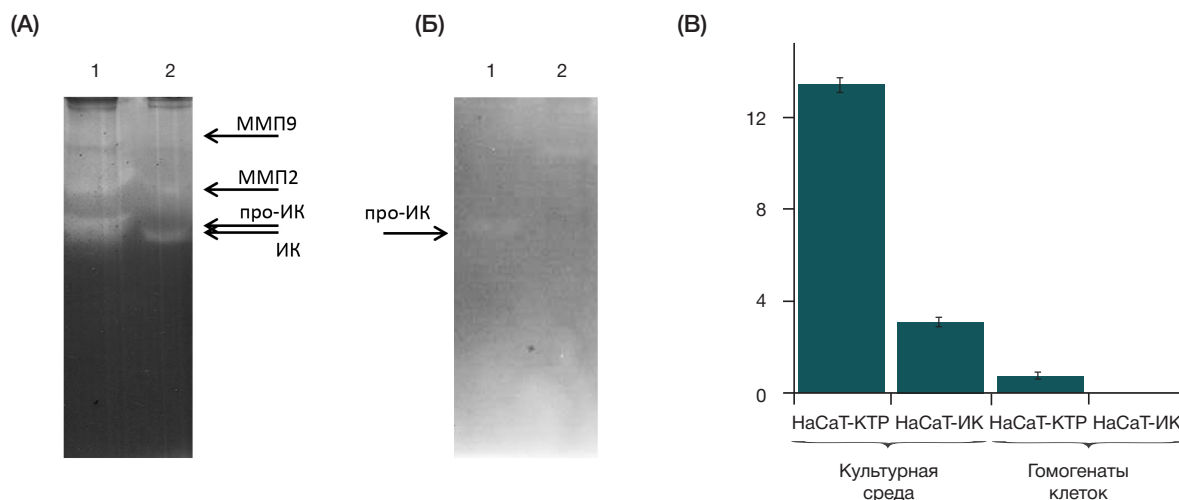


Рис. 5. Оценка ферментативной активности интерстициальной коллагеназы (ИК) в трансдуцированных эпидермальных кератиноцитах клеточном гомогенате и культуральной среде. **(А)** Зимография образцов питательной среды, собранных при культивировании трансдуцированных клеток: 1 — клетки, экспрессировавшие контрольную shРНК; 2 — клетки, экспрессировавшие shРНК, специфичную к ИК. Стрелками указано месторасположение матричных металлопротеиназ в геле. **(Б)** Зимография образцов клеточного гомогената, собранных при культивировании трансдуцированных клеток: 1 — клетки, экспрессировавшие контрольную shРНК; 2 — клетки, экспрессировавшие shРНК, специфичную к ИК. **(В)** Количественная оценка ферментативной активности. Время культивирования клеток до начала сбора образцов — 48 ч. Конфлюэнтность клеток на момент сбора образцов — 60 %. Культивирование клеток, получение гомогената, а также проведение белкового электрофореза и зимографии описаны в разделе «Материалы и методы»

ферментативной активности между образцами могла быть вызвана «перегрузом» ИК в образце, полученном из HaCaT-KTR.

Между тем, сравнение уровней генной экспрессии в клетках HaCaT-IK и HaCaT-KTR позволило нам установить статистически значимые изменения в уровнях экспрессии генов цитокератинов (*KRT1*, *-14*, *-17* и *-18*). Примечательно, что наблюдаемые изменения носили разнонаправленный характер (рис. 3В). В частности, нами было установлено, что экспрессия *KRT1* и *KRT14* возростала, тогда как экспрессия *KRT17* и *KRT18* — снижалась. Согласно данным литературы, изменения в уровнях экспрессии упомянутых генов имеют важное физиологическое и клиническое значение. С одной стороны, нормальный уровень экспрессии *KRT1* и *KRT14* в эпидермисе здоровой кожи важен для правильной дифференцировки эпидермальных кератиноцитов [22]. С другой стороны, в области кожи, пораженной псориазом, где процесс дифференцировки клеток нарушен, возрастает экспрессия *KRT17* и *KRT18*, а экспрессия *KRT1* и *KRT14* — снижается [23, 24]. Согласно же полученным нами данным (рис. 3В), РНК-интерференция ИК может иметь важный терапевтический эффект в случае псориаза, поскольку она частично нормализует экспрессию генов упомянутых цитокератинов (снижает экспрессию *KRT17* и *KRT18* и увеличивает экспрессию *KRT1* и *KRT14*).

Помимо этого, РНК-интерференция ИК приводит к изменениям в уровнях экспрессии генов *IVL* и *FLG* (рис. 3Б). Белки, кодируемые этими генами (инволюкрин и филаггрин соответственно), являются важными структурными элементами верхнего (рогового) слоя эпидермиса. Они относятся к числу маркеров «ранней» и «поздней» стадий дифференцировки эпидермальных кератиноцитов. В свою

очередь, образование псориазических бляшек сопровождается нарушениями в экспрессии упомянутых генов: экспрессия *IVL* увеличивается, а экспрессия *FLG* снижается [25]. Соответственно, нарушается состав и структура роговой оболочки и меняется внешний облик кожных покровов. Согласно полученным нами данным (рис. 3Б), РНК-интерференция ИК частично нормализует экспрессию *IVL* и *FLG* в трансдуцированных клетках, что усиливает ее терапевтический эффект.

Примечательно, что в отличие от других исследуемых в нашей работе генов (рис. 3А–В) экспрессия генов «домашнего хозяйства» *TUBB* и *GAPDH*, широко используемых в современной лабораторной практике в качестве внутреннего контроля, существенно не меняется (рис. 3Д). Это, в свою очередь, свидетельствует о возможности использования данных об уровне экспрессии гена *ACTB* для нормализации результатов ПЦР в режиме «реального времени» в клетках HaCaT-KTR и HaCaT-IK.

ВЫВОДЫ

В заключение мы бы хотели отметить, что полученные нами клеточные линии эпидермальных кератиноцитов — HaCaT-IK с экспрессией shРНК, специфичной к ИК, и HaCaT-KTR с экспрессией контрольной shРНК — различаются по своим морфологическим признакам и способности к миграции. Сравнительный анализ генной экспрессии в трансдуцированных клетках показал, что РНК-интерференция ИК обладает потенциальным терапевтическим эффектом, поскольку приводит к коррекции уровней экспрессии ряда важных для патогенеза псориаза генов: *IVL*, *FLG*, *KRT1*, *-14*, *-17* и *-18*.

Литература

1. Sabat R, Philipp S, Höflich C, Kreutzer S, Wallace E, Asadullah K et al. Immunopathogenesis of psoriasis. *Exp Dermatol.* 2007; 16 (10): 779–98. PubMed PMID: 17845210.
2. Mezentssev A, Nikolaev A, Bruskin S. Matrix metalloproteinases

and their role in psoriasis. *Gene.* 2014; 540 (1): 1–10. PubMed PMID: 24518811.

3. Corbitt CA, Lin J, Lindsey ML. Mechanisms to inhibit matrix metalloproteinase activity: where are we in the development of

- clinically relevant inhibitors? Recent Pat Anticancer Drug Discov. 2007; 2 (2): 135–42. PubMed PMID: 18221058.
4. Peterson JT. The importance of estimating the therapeutic index in the development of matrix metalloproteinase inhibitors. *Cardiovasc Res.* 2006; 69 (3): 677–87. PubMed PMID: 16413004.
 5. Shi Q, Zhang XL, Dai KR, Benderdour M, Fernandes JC. siRNA therapy for cancer and non-lethal diseases such as arthritis and osteoporosis. *Expert Opin Biol Ther.* 2011; 11 (1): 5–16. PubMed PMID: 21058934.
 6. Schambach A, Baum C. Clinical application of lentiviral vectors - concepts and practice. *Curr Gene Ther.* 2008; 8 (6): 474–82. PubMed PMID: 19075630.
 7. Naldini L, Blömer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science.* 1996; 272 (5259): 263–7. PubMed PMID: 8602510.
 8. Köllisch G, Kalali BN, Voelcker V, Wallich R, Behrendt H, Ring J et al. Various members of the Toll-like receptor family contribute to the innate immune response of human epidermal keratinocytes. *Immunology.* 2005; 114 (4): 531–41. PubMed PMID: 15804290.
 9. Olaru F, Jensen LE. Chemokine expression by human keratinocyte cell lines after activation of Toll-like receptors. *Exp Dermatol.* 2010; 19 (8): e314–6. PubMed PMID: 20100199.
 10. Proksch E, Brandner JM, Jensen JM. The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol.* 2008; 17 (12): 1063–72. PubMed PMID: 19043850.
 11. Могилевцева Ю., Мезенцев А. В. Клонирование последовательности малой ингибирующей РНК, специфичной к металлопротеиназе 1 человека, в экспрессионный вектор pGPV-17019250. *Wschodnioeuropejskie Czasopismo Naukowe.* 2016; (9): 85–92.
 12. Могилевцева Ю., Мезенцев А. В. Молекулярный дизайн и клонирование контрольной РНК для проведения экспериментов по РНК-интерференции интерстициальной коллагеназы человека. В сб.: Сборник статей студентов, магистрантов, аспирантов, молодых ученых и преподавателей «Развитие современной науки: теоретические и прикладные аспекты»; 4 августа 2016 г.; Пермь, 2016; (6): 70–7.
 13. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227 (5259): 680–5. PubMed PMID: 5432063.
 14. Meyer TS, Lamberts BL. Use of coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips. *Biochim Biophys Acta.* 1965; 107 (1): 144–5. PubMed PMID: 4159310.
 15. Gogly B, Groult N, Hornebeck W, Godeau G, Pellat B. Collagen zymography as a sensitive and specific technique for the determination of subpicogram levels of interstitial collagenase. *Anal Biochem.* 1998; 255 (2): 211–6. PubMed PMID: 9451506.
 16. Chomczynski P, Mackey K. Short technical reports. Modification of the TRI reagent procedure for isolation of RNA from polysaccharide- and proteoglycan-rich sources. *Biotechniques.* 1995; 19 (6): 942–5. PubMed PMID: 8747660.
 17. Probes [Интернет]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); [цитировано 10 февраля 2017 г.]. Доступно по ссылке: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/>
 18. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell.* 2010; 141 (1): 52–67. PubMed PMID: 20371345.
 19. Momota Y, Suzuki N, Kasuya Y, Kobayashi T, Mizoguchi M, Yokoyama F et al. Laminin $\alpha 3$ LG4 module induces keratinocyte migration: involvement of matrix metalloproteinase-9. *J Recept Signal Transduct Res.* 2005; 25 (1): 1–17. PubMed PMID: 15960391.
 20. Swindell WR, Johnston A, Carbajal S, Han G, Wohn C, Lu J et al. Genome-wide expression profiling of five mouse models identifies similarities and differences with human psoriasis. *PLoS One.* 2011; 6 (4): e18266. PubMed PMID: 21483750.
 21. Zhang X, Jin JY, Wu J, Qin X, Streilein R, Hall RP et al. RNA-Seq and ChIP-Seq reveal SQSTM1/p62 as a key mediator of JunB suppression of NF- κ B-dependent inflammation. *J Invest Dermatol.* 2015; 135 (4): 1016–24. PubMed PMID: 25501661.
 22. Matsui T, Amagai M. Dissecting the formation, structure and barrier function of the stratum corneum. *Int Immunol.* 2015; 27 (6): 269–80. PubMed PMID: 25813515.
 23. Rao KS, Babu KK, Gupta PD. Keratins and skin disorders. *Cell Biol Int.* 1996; 20 (4): 261–74. PubMed PMID: 8664850.
 24. Al Robaee AA. Molecular genetics of Psoriasis (Principles, technology, gene location, genetic polymorphism and gene expression). *Int J Health Sci (Qassim).* 2010; 4 (2): 103–27.
 25. Iizuka H, Takahashi H, Honma M, Ishida-Yamamoto A. Unique keratinization process in psoriasis: late differentiation markers are abolished because of the premature cell death. *J Dermatol.* 2004; 31 (4) 271–6.

References

1. Sabat R, Philipp S, Höflich C, Kreutzer S, Wallace E, Asadullah K et al. Immunopathogenesis of psoriasis. *Exp Dermatol.* 2007; 16 (10): 779–98. PubMed PMID: 17845210.
2. Mezentsev A, Nikolaev A, Bruskin S. Matrix metalloproteinases and their role in psoriasis. *Gene.* 2014; 540 (1): 1–10. PubMed PMID: 24518811.
3. Corbitt CA, Lin J, Lindsey ML. Mechanisms to inhibit matrix metalloproteinase activity: where are we in the development of clinically relevant inhibitors? *Recent Pat Anticancer Drug Discov.* 2007; 2 (2): 135–42. PubMed PMID: 18221058.
4. Peterson JT. The importance of estimating the therapeutic index in the development of matrix metalloproteinase inhibitors. *Cardiovasc Res.* 2006; 69 (3): 677–87. PubMed PMID: 16413004.
5. Shi Q, Zhang XL, Dai KR, Benderdour M, Fernandes JC. siRNA therapy for cancer and non-lethal diseases such as arthritis and osteoporosis. *Expert Opin Biol Ther.* 2011; 11 (1): 5–16. PubMed PMID: 21058934.
6. Schambach A, Baum C. Clinical application of lentiviral vectors - concepts and practice. *Curr Gene Ther.* 2008; 8 (6): 474–82. PubMed PMID: 19075630.
7. Naldini L, Blömer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH et al. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science.* 1996; 272 (5259): 263–7. PubMed PMID: 8602510.
8. Köllisch G, Kalali BN, Voelcker V, Wallich R, Behrendt H, Ring J et al. Various members of the Toll-like receptor family contribute to the innate immune response of human epidermal keratinocytes. *Immunology.* 2005; 114 (4): 531–41. PubMed PMID: 15804290.
9. Olaru F, Jensen LE. Chemokine expression by human keratinocyte cell lines after activation of Toll-like receptors. *Exp Dermatol.* 2010; 19 (8): e314–6. PubMed PMID: 20100199.
10. Proksch E, Brandner JM, Jensen JM. The skin: an indispensable barrier. *Exp Dermatol.* 2008; 17 (12): 1063–72. PubMed PMID: 19043850.
11. Mogilevtseva Yu, Mezentsev AV. Клонирование последовательности малой ингибирующей РНК, специфичной к металлопротеиназе 1 человека, в экспрессионный вектор pGPV-17019250. *Wschodnioeuropejskie Czasopismo Naukowe.* 2016; (9): 85–92. Russian.
12. Mogilevtseva Yu, Mezentsev AV. Молекулярный дизайн и клонирование контрольной РНК для проведения экспериментов по РНК-интерференции интерстициальной коллагеназы человека. In: Сборник статей студентов, магистрантов, аспирантов, молодых ученых и преподавателей «Развитие современной науки: теоретические и прикладные аспекты»; 2016 Aug 4; Perm, 2016; (6): 70–7. Russian.
13. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227 (5259): 680–5. PubMed PMID: 5432063.
14. Meyer TS, Lamberts BL. Use of coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips. *Biochim Biophys Acta.* 1965;

- 107 (1): 144–5. PubMed PMID: 4159310.
15. Gogly B, Groult N, Hornebeck W, Godeau G, Pellat B. Collagen zymography as a sensitive and specific technique for the determination of subpicogram levels of interstitial collagenase. *Anal Biochem.* 1998; 255 (2): 211–6. PubMed PMID: 9451506.
 16. Chomczynski P, Mackey K. Short technical reports. Modification of the TRI reagent procedure for isolation of RNA from polysaccharide- and proteoglycan-rich sources. *Biotechniques.* 1995; 19 (6): 942–5. PubMed PMID: 8747660.
 17. Probes [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); [cited 2017 Feb 10]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/>
 18. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell.* 2010; 141 (1): 52–67. PubMed PMID: 20371345.
 19. Momota Y, Suzuki N, Kasuya Y, Kobayashi T, Mizoguchi M, Yokoyama F et al. Laminin α 3 LG4 module induces keratinocyte migration: involvement of matrix metalloproteinase-9. *J Recept Signal Transduct Res.* 2005; 25 (1): 1–17. PubMed PMID: 15960391.
 20. Swindell WR, Johnston A, Carbajal S, Han G, Wohn C, Lu J et al. Genome-wide expression profiling of five mouse models identifies similarities and differences with human psoriasis. *PLoS One.* 2011; 6 (4): e18266. PubMed PMID: 21483750.
 21. Zhang X, Jin JY, Wu J, Qin X, Streilein R, Hall RP et al. RNA-Seq and ChIP-Seq reveal SQSTM1/p62 as a key mediator of JunB suppression of NF- κ B-dependent inflammation. *J Invest Dermatol.* 2015; 135 (4): 1016–24. PubMed PMID: 25501661.
 22. Matsui T, Amagai M. Dissecting the formation, structure and barrier function of the stratum corneum. *Int Immunol.* 2015; 27 (6): 269–80. PubMed PMID: 25813515.
 23. Rao KS, Babu KK, Gupta PD. Keratins and skin disorders. *Cell Biol Int.* 1996; 20 (4): 261–74. PubMed PMID: 8664850.
 24. Al Robae AA. Molecular genetics of Psoriasis (Principles, technology, gene location, genetic polymorphism and gene expression). *Int J Health Sci (Qassim).* 2010; 4 (2): 103–27.
 25. Iizuka H, Takahashi H, Honma M, Ishida-Yamamoto A. Unique keratinization process in psoriasis: late differentiation markers are abolished because of the premature cell death. *J Dermatol.* 2004; 31 (4) 271–6.