

9. А.Ж. Ташекова, А.С. Горопов. Использование листьев растений как биогеохимических индикаторов состояния городской среды // Известия Томского политехнического университета. Инжиниринг георесурсов. 2017. Т. 328. № 5. 114–124.
10. Л. Ф. Попова. Комплексная эколого-химическая оценка и нормирование качества почвенно-растительного покрова городских экосистем (на примере Архангельска) : автореф. дис. ... д-р биол. наук: 03.02.08 / Попова Людмила Федоровна. – Петрозаводск, 2015. – 34 с.
11. О.А. Неверова, В.М. Позняковский. Фитоиндикация загрязнения городской среды тяжелыми металлами (на примере г. Кемерово) // Лесной журнал». 2005. № 4. С. 92-95
12. Л.В. Ветчинникова, Т.Ю. Кузнецова, А.Ф. Титов. Особенности накопления тяжелых металлов в листьях древесных растений на урбанизированных территориях в условиях Севера /Л. В. Ветчинникова, Т. Ю. Кузнецова, А. Ф. Титов // Труды Карельского научного центра РАН. 2013. № 3. С. 68–73.
13. T. Myking, P.A. Aarrestad, J. Derome et al. Effects of air pollution from a nickel-copper industrial complex on boreal forest vegetation in the joint Russian-Norwegian-Finnish border area // Boreal Environ. Res. 2009. V. 14. P. 279-296.
14. Методические рекомендации по проведению полевых и лабораторных исследований почв и растений при контроле загрязнения окружающей среды металлами. М. : Гидрометеиздат, 1981. 108 с.).
15. K.V. Eremenko, V.M. Zubkova, «Monitoring of diseases and pests of tree plantations in the north-eastern administrative district of Moscow» // Process management and scientific developments, part 1 // Melbourne, 2021 // С. 106-113.600
16. Н. А. Плохинский, Биометрия / Н. А. Плохинский. – М. : Изд-во МГУ, 1970. – 367 с. 24. Терентьев П. В. Практикум по биометрии / П. В. Терентьев, Н. С.
17. Н.М. Матвеев, Н.В. Прохорова. Тяжелые металлы в почвах и растениях в условиях техногенеза // Вестник СамГУ. — 1996. — Специальный выпуск. — С. 125–147.
18. Kumari M., Tripathi B.D. Efficiency of Phragmites australis and Typha latifolia for heavy metal removal from wastewater // Ecotoxic Environ. Saf. 2015. V. 112. P. 80-86.
19. Жакова С.Н., Путилова А.Э., Экологический анализ содержания тяжелых металлов в почвогрунтах и листьях древесных растений скверов и парков г. Пермь // Агротехнологии XXI века: Стратегия развития, технологии и инновации, материалы всероссийской научно-практической конференции, посвященной 90-летию основания университета. Пермь, 2020, С. 89-92.
20. Карбасникова Е.Б., Залывская О.С., Чухина О.В. Содержание тяжелых металлов в почве и древесной растительности в условиях городской агломерации // Лесн. журн. - 2019. - № 5. - С. 216-223
21. Добровольский В.В. Основы биогеохимии :Учеб. Пособие для геогр., биол., геолог., с.-х. спец. вузов.- М.: Высш. шк., 1998- 413 С.)

УДК 616.517

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ДИЗАЙН И КЛОНИРОВАНИЕ КОНТРОЛЬНОЙ РНК ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТОВ ПО РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИИ ЭЛАСТАЗЫ МАКРОФАГОВ ЧЕЛОВЕКА

Бондарь В.Д.

Студент,

Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова,
Россия, г. Москва, 119991, Ленинские горы, д. 1.**Мезенцев А.В.**канд. биол. наук, старший научный сотрудник,
ФГБУН «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова
Россия, г. Москва, 119991, ул. Губкина, д. 3

MOLECULAR DESIGN AND CLONING OF CONTROL SHRNA FOR THE EXPERIMENTS SILENCING HUMAN MACROPHAGE ELASTASE

Bondar V.D.Student, M.V. Lomonosov Moscow State University,
Russia, Moscow, 119991, Leninskie gory, 1.**Mezenцев A.V.**PhD, senior research scientist, N.I. Vavilov Institute of General Genetics,
Russia, Moscow, 119991, Gubkina street, 3

DOI: 10.31618/ESU.2413-9335.2022.4.94.1592

АННОТАЦИЯ

Изменения в экспрессии матричной металлопротеиназы 12 (ММП12/*MMP12*) имеют важное клиническое значение. Повышение экспрессии *MMP12* происходит при ожогах. Оно также сопровождается образованием келоидных рубцов. При псориазе и герпетиформном дерматите Дюринга экспрессия *MMP12*

предшествует перестройке микрокапилляров дермы. Кроме того, высокий уровень ММП12 – один из наиболее важных прогностических факторов при лечении меланомы. Целью проведенного нами исследования было разработать вектор для экспрессии малой ингибирующей РНК (small hairpin RNA/shРНК), который можно было бы использовать в качестве негативного контроля в экспериментах по РНК-интерференции *MMP12* человека. Сравнение альтернативных последовательностей контрольной shРНК проводили при помощи общедоступных электронных ресурсов: “OligoCalc”, “Blastn suite” и “Palindromic Sequences Finder”. Двухцепочечную ДНК, которая кодирует выбранную последовательность shРНК, получали методом горячего отжига комплементарных одноцепочечных олигонуклеотидов. Полученный двухцепочечный олигонуклеотид клонировали в экспрессионный вектор pGPV-17019250 по сайтам связывания рестрикционных эндонуклеаз (EcoRI и BamHI), используя T4 ДНК лигазу. В ходе проведенных исследований нами была отобрана последовательность ДНК, которая кодировала контрольную shРНК, и получен вектор pGPV-17019250-MMP12c для ее экспрессии в клетках человека. Нами были также получены доказательства того, что клонированная последовательность shРНК обладает всеми необходимыми свойствами для проведения экспериментов по РНК-интерференции *MMP12* человека. В представленной работе получен экспрессионный вектор pGPV-17019250-MMP12c для экспрессии контрольной shРНК. Экспрессионный вектор pGPV-17019250-MMP12c предназначен для проведения экспериментов по РНК-интерференции *MMP12* человека.

ABSTRACT

Changes in the expression of matrix metalloproteinase 12 (*MMP12/MMP12*) are essential for the pathogenesis of several diseases. The induction of *MMP12* occurs in burns and keloids. In psoriasis and herpetiformis Dühring dermatitis, the expression of *MMP12* precedes a remodeling of dermal microcapillaries. Moreover, the elevated expression of *MMP12* is one of the well-known risk factors for melanoma. The aim of this study was to create an expression vector producing control shRNA (small hairpin RNA) for the experiments on human *MMP12* silencing. To compare the alternative variants of predesigned control shRNA, we used free electronic resources “OligoCalc”, “blastn suite”, and “Palindromic Sequences Finder”. The double-stranded DNA encoding the desired shRNA sequence was obtained by annealing two single-stranded oligonucleotides. After annealing, we cloned the obtained double-stranded DNA between EcoRI and BamHI binding sites of the expression vector pGPV-17019250 using the respective endonucleases and T4 DNA ligase. Using a computer analysis, we designed the control shRNA, a proposed negative control for silencing human *MMP12*. Then, we cloned the DNA sequence encoding the desired shRNA in the expression vector pGPV-17019250 to generate the new vector pGPV-17019250-MMP12c. The obtained data suggest that the vector pGPV-17019250-MMP12c can express the control *MMP12* shRNA and serve as a negative control in the experiments designated to silence *MMP12* in human cells. In this paper, we present the new vector pGPV-17019250-MMP12c encoding a control *MMP12* shRNA suitable for its expression in human cells. The named shRNA can be used as a negative control for the experiments on *MMP12*.

Ключевые слова: рак, эластаза макрофагов, молекулярное клонирование, экспрессионный вектор pGPV-17019250, shРНК, РНК-интерференция.

Key words: cancer, macrophage elastase, molecular cloning, the expression vector pGPV-17019250, shRNA, gene silencing.

Введение

Матриксная металлопротеиназа 12 (ММП12) имеет важное клиническое значение для ряда заболеваний кожи. Повышенная экспрессия *MMP12* при облучении ультрафиолетовым светом (UVA1) приводит к повреждениям эластиновых волокон, ускоряя старение кожи [1]. Увеличение активности ММП12 сопровождается процессом образования келоидных рубцов [2], а также миграцию раковых клеток у больных меланомой [3]. В первом случае, ММП12 синтезируют макрофаги, а также в CD31⁺-позитивные клетки сосудистого эндотелия, а во втором, – непосредственно раковые клетки (меланоциты) и ассоциированные с опухолью макрофаги [3]. У больных герпетиформным дерматитом Дюринга повышенный уровень экспрессии *MMP12*, которую также экспрессируют макрофаги [4], приводит к нарушениям целостности базальной мембраны, в частности, – к протеолитической деградации входящих в ее состав протеогликанов. При псориазе, кроме того, изменения в экспрессии *MMP12* предшествуют перестройке

микрокапилляров дермы [5]. В настоящее время ММП12 предложено использовать в качестве биомаркеров повреждений кровеносных сосудов [2] и фотостарения кожи [1], а также в качестве независимого прогностического фактора при лечении меланомы [3].

В виду важного клинического значения ММП12, важно уметь контролировать ее уровень в межклеточном матриксе, а также экспрессию ее гена в пораженных болезнью клетках. Этого можно добиться разными путями, например, воздействуя на ММП12 специфичными ингибиторами, снизив уровень транскрипции ее гена, или заблокировав трансляцию *MMP12* мРНК. При проведении экспериментальных исследований для подавления биосинтеза металлопротеиназы (ММП) наиболее часто используют РНК-интерференцию. Для этого культивируемые клетки человека трансфицируют shРНК (малой ингибирующей РНК/ small hairpin RNA), которая специфичным образом взаимодействует с мРНК выбранного гена. Их взаимодействие приводит к инактивации мРНК и блокирует биосинтез кодируемого ею белка на

рибосомах. **Целью** данной работы было получить вектор для экспрессии shРНК, которую можно было бы использовать в качестве отрицательного контроля при проведении экспериментов по РНК-интерференции *MMP12* человека.

Материалы и методы

Обработку вектора рестрикционными эндонуклеазами *Bam*HI и *Eco*RI (10 единиц каждой) проводили в течение часа в буферном растворе R (ThermoFisher, США) при 37°C. При этом, объем добавленных ферментов не превышал 10% общего объема реакционной смеси. По окончании реакции рестрикционные эндонуклеазы инактивировали нагреванием (80°C; 20 мин). Для разделения получившихся фрагментов ДНК готовили гель, содержащий 1% агарозы, буферный раствор ТАЕ (40 мМ Трис, 20 мМ уксусная кислота, 1 мМ ЭДТА, pH 7.6) и 0.5 мкг/мл бромистого этидия. Для утяжеления образцов, а также для того, чтобы иметь возможность контролировать электрофорез визуально, к образцам добавляли 0.1% раствор бромфенолового синего, который содержал 40% сахарозу и 60 мМ ЭДТА (6х). По окончании электрофореза фрагмент ДНК, необходимый для последующей работы, вырезали из геля острым лезвием и переводили в водный раствор при помощи “стеклянных бус” (т.н. “glass milk”), как было описано ранее [6]. Для получения двухцепочечной ДНК из комплементарных одноцепочечных олигонуклеотидов пробирку с образцами олигонуклеотидов (9 пмоль каждого), растворенными в буферном растворе TE (10 мМ Трис-HCl, 1 мМ ЭДТА, pH 8.0), переносили на водяную баню (общий объем 1 литр) и оставляли остывать до комнатной температуры (~30 мин). Лигирование полученного путем отжига двухцепочечного олигонуклеотида и очищенного из геля фрагмента ДНК проводили в соотношении 10 : 1 при помощи фермента T4 ДНК лигазы (“ThermoFisher Scientific”, США) из расчета 7.5 единиц лигазы на 1 мкг ДНК на ледяной бане в течение 16-18 часов.

Для получения компетентных клеток *E. coli* небольшую аликвоту бактериальной суспензии (60 мкл) разводили в 6 мл среды LB [7], содержащей антибиотик-тетрацилин (12.5 мкг/мл) и инкубировали на качалке в течение 1 часа (37°C, 160 об/мин). По окончании инкубации бактерии находились во льду в течение 10 мин. После этого, их осаждали центрифугированием (13200g, 30 сек, 4°C). Удалив надосадочную жидкость, бактерии ресуспендировали в 350 мкл 0.1М CaCl₂ и инкубировали во льду в течение 40 мин. Затем их снова осаждали центрифугированием и ресуспендировали осадок в свежей порции 0.1М CaCl₂ (200 мкл).

Для проведения трансфекции компетентных клеток продуктами лигазной реакции небольшую аликвоту реакционной смеси (10 мкл) добавляли к суспензии компетентных клеток. После этого клетки инкубировали во льду в течение 30 мин. По

окончании инкубации клетки подвергали тепловому шоку (42°C; 2 мин) и быстро переносили назад – в лед. Затем, после 5 мин инкубации во льду, к клеткам добавляли 1 мл среды LB и, не перемешивая, помещали в термостат (37°C) на 1 час. По окончании термостатирования трансформированные бактерии высевали на плотную питательную среду (LB-агар), в которую был добавлен антибиотик-ампициллин (100 мкг/мл), и подращивали при 37°C в течение 14-16 часов. Из числа выросших колоний случайным образом отбирали три клона, границы которых не перекрывались с соседними клонами *E. coli*. Полученные таким образом образцы бактерий наращивали в жидкой питательной среде LB, в которую был добавлен ампициллин, при 37°C в течение 14-16 часов. Перед выделением плазмидной ДНК бактерии осаждали центрифугированием (13200g, 30 сек, 4°C). Выделение плазмидных векторов из осажденных бактериальных клеток проводили при помощи набора реагентов “Plasmid Miniprep” (“Евроген”, Россия) в соответствии с указаниями фирмы-производителя.

Измерения концентрации ДНК проводили на флуориметре Qubit (“ThermoFisher Scientific”) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Наличие сайтов ДНК, чувствительных к рестрикционным эндонуклеазам *Bam*HI и *Eco*RI в полученных векторах подтверждали при помощи электрофореза в 1% агарозном геле. Примерно за час до нанесения на гель образцы обрабатывали одной из указанных рестрикционных эндонуклеаз или обоими рестриктазами одновременно. Электрофорез проводили, как описано выше.

Чтобы проверить присутствует ли клонированная последовательность ДНК в полученных векторах, небольшие аликвоты каждого образца (~10 нг ДНК) амплифицировали со специфичными праймерами EXT-F: 5'-ACG-TGA-AAT-GTC-TTT-GGA-TTT-GGG-3' и EXT-R 5'-CAG-AGA-GAC-CCA-GTA-GAA-GCA-3'. Амплифицированные фрагменты ДНК разделяли электрофоретически в 2% агарозном геле, как описано выше. Проверку правильности клонирования выбранной последовательности ДНК в экспрессионный вектор проводили при помощи метода автоматического секвенирования ДНК в сервисном центре компании “Евроген”.

Результаты

Для проведения молекулярного дизайна контрольной shРНК использовали последовательность 5'-gga-aac-att-ata-tca-cct-a-3', которая входит в состав второго экзона кодирующего *MMP12* гена [8]. Эта последовательность (Рис. 1) является частью специфичной к *MMP12* shРНК, клонированной нами ранее в вектор pGPV-17019250-MMP12 – для ее экспрессии в клетках человека [9].

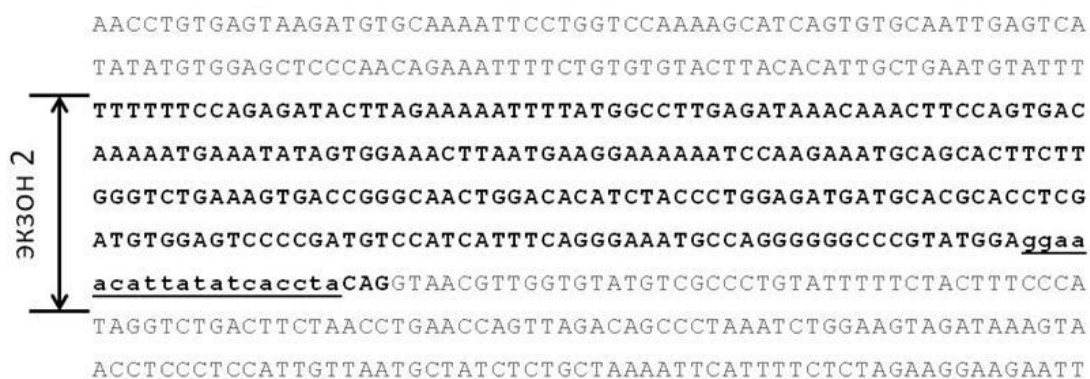


Рисунок 1. Расположение фрагмента ДНК, выбранного для дизайна контрольной shPHK, в последовательности гена MMP12 человека.

Участок, относящийся к специфичной shPHK набран строчными буквами и подчеркнут. Последовательности соседних интронов обозначены серым цветом.

Вначале при помощи общедоступных электронных ресурсов, принадлежащих корпорациям GenScript (США) [10] и InvivoGen (США) [11], мы получили два альтернативных фрагмента кДНК (Таблица 1) и исследовали их свойства. При этом мы сравнили нуклеотидный состав этих последовательностей, определили содержание в них "G" и "C", а также количество нуклеотидных повторов (четыре одинаковых нуклеотида подряд и более). Затем, при помощи электронного ресурса "OligoCalc" мы проверили, могут ли тестируемые ДНК образовывать элементы вторичной структуры (т. н. "внутренние димеры" и

"шпильки") [12]. После этого, используя электронный ресурс "blastn suite" (США) [13], мы определили степень гомологии каждой из полученных нами кДНК с кДНК других генов. Наконец, при помощи электронного ресурса "Palindromic Sequences Finder" (NovoPro, Китай) [14] мы проверили содержат ли последовательности тестируемых кДНК палиндромные сиквенсы из шести и более нуклеотидов. Результаты проведенной проверки показали, что последовательность ДНК №2 (Таблица 1) не может быть использована в дальнейшей работе, потому что в ее составе находится палиндром. В силу этого, для дизайна последовательности, кодирующей контрольную shPHK, мы выбрали последовательность №1 (Таблица 1).

Таблица 1.

Сравнительный анализ последовательностей кДНК, предложенных для дизайна контрольной (scramble) sh-PHK MMP12

Параметр	исходная кДНК	GenScript (№1)	InvivoGen (№2)
Сиквенс	ggaacattatatcaccta	atccgtaataaccgaataa	gccaataaactcgattaat
Размер, п.н.	19	19	19
Нуклеотидный состав	G – 2; C – 4; A – 8; T – 5;	G – 2; C – 4; A – 8; T – 5;	G – 2; C – 4; A – 8; T – 5;
Образование шпилек	нет	нет	нет
Образование димеров	нет	нет	нет
Дифференциальная термостабильность	нет	нет	нет
Повторяющиеся нуклеотиды*	нет	нет	нет
Максимальная гомология, %	100% (MMP12)	63% (SLC25A31)	73% (PAPSS1)
Палиндромы**	нет	нет	A ₁₄ TTAAT ₁₉

п.н. – пар нуклеотидов; международные названия генов, обладающих наибольшей гомологией с указанными последовательностями, приведены в скобках [13]; * - наличие участков из четырех нуклеотидов и более; ** - наличие участков из 6 нуклеотидов и более.

Дизайн shPHK проводили при помощи электронного ресурса "Design hairpin insert" (InvivoGen) [15]. Олигонуклеотид, кодирующий контрольную shPHK (Рис. 2), представлял собою двухцепочечную ДНК. Верхняя половина клонированной последовательности состояла из нескольких участков: фрагментов сайтов рестрикции EcoRI и BamHI с выступающими

концами, которые были необходимы для клонирования олигонуклеотида в вектор pGPV-17019250, последовательности, кодирующей shPHK (т.н. "смысловой последовательности"), и комплементарной ей последовательности (т.н. "антисмысловой последовательности"). В середине сиквенса, т.е. между "смысловой" и "антисмысловой" последовательностями

располагался некоплементарный участок ДНК, необходимый для образования "шпильки". В свою очередь, нижняя (антипараллельная)

последовательность кДНК была комплементарна верхней за исключением участков, относящихся к полусайтам рестрикции EcoRI и BamHI.

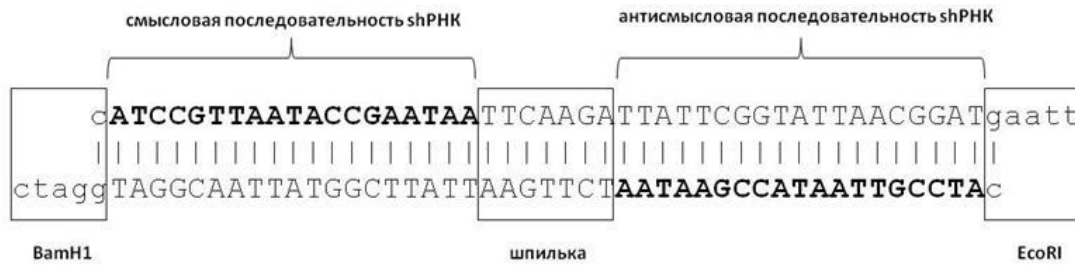


Рис. 2. Последовательность двухцепочечного олигонуклеотида, кодирующего контрольную shRNA, выбранного для клонирования.

Фрагменты сайтов рестрикции BamHI и EcoRI расположены с левого и с правого краев сиквенса, соответственно, и заключены в рамку (см. объяснения в тексте).

Стратегия по клонированию полученной последовательности в вектор pGPV-17019250 (7,911 н.п.) заключалась в следующем. Вначале мы обработали вектор pGPV-17019250

рестрикционными эндонуклеазами EcoRI и BamHI и разделили образовавшиеся фрагменты ДНК (7,852 и 59 н.п.) при помощи электрофореза в 1% агарозном геле (Рис. 3). После этого, используя острое лезвие, мы вырезали нужный для проведения клонирования фрагмент ДНК (7,852 н.п.) и провели его очистку при помощи "стеклянных бус".

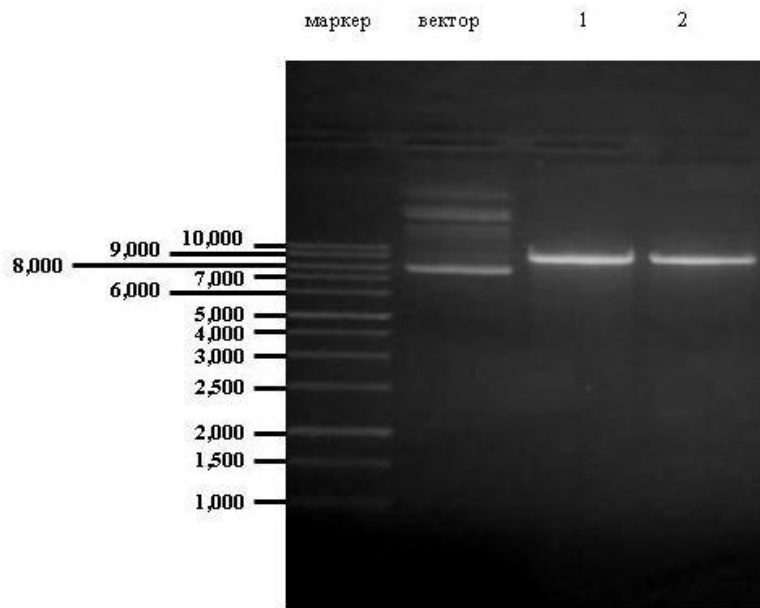


Рис. 3. Разделение фрагментов вектора pGPV-17019250 после его обработки рестрикционными эндонуклеазами BamHI и EcoRI. Слева – направо: Дорожка 1 - 1 кВ маркеры ДНК (слева от геля приведены размеры каждого из фрагментов в п.н.); Дорожка 2 - вектор, необработанный рестрикционными эндонуклеазами; Дорожки 3 и 4 - фрагмент вектора (7,852 п.н.), необходимый для клонирования.

Полученный электрофоретически чистый фрагмент вектора лигировали с описанным выше двухцепочечным олигонуклеотидом (Рис. 2). По окончании лигирования мы провели трансфекцию компетентных клеток *E. coli* продуктами лигазной реакции с последующей селекцией трансфицированных клеток на среде, содержащей

ампициллин. Согласно полученным результатам, примененная в работе методика позволила нам получить более сотни клонов трансфицированных клеток, устойчивых к ампициллину (Рис. 4), что свидетельствует о высокой эффективности проведенной нами трансфекции.

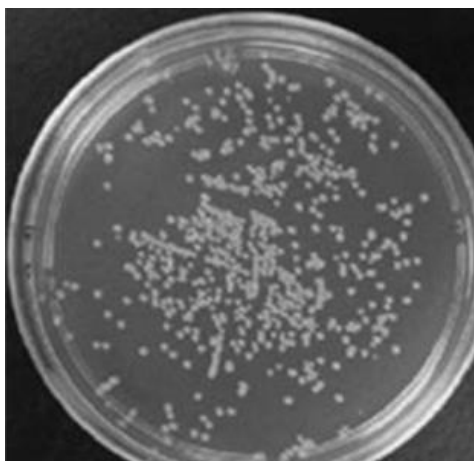


Рис. 4. Устойчивые к ампициллину клетки *E. coli*, полученные после трансфекции продуктами лигационной реакции.

Проверка плазмидной ДНК, полученной из трех случайным образом отобранных клонов, показала присутствие сайтов, чувствительных к рестрикционным эндонуклеазам *VamH1* и *EcoRI*, т.е. участков ДНК, по которым, собственно, и было проведено клонирование (Рис. 5а). Амплификация плазмидной ДНК со специфичными праймерами методом полимеразной цепной реакции,

подтвердила присутствие продукта реакции необходимого нам размера (154 н.п.) в каждом из исследованных образцов (Рис. 5б). Наконец, анализ одного из этих образцов, выполненный методом автоматического ДНК секвенирования, подтвердил, что выделенный нами из *E. coli* вектор действительно содержал последовательность, кодирующую контрольную *shRNA* (Рис. 6).

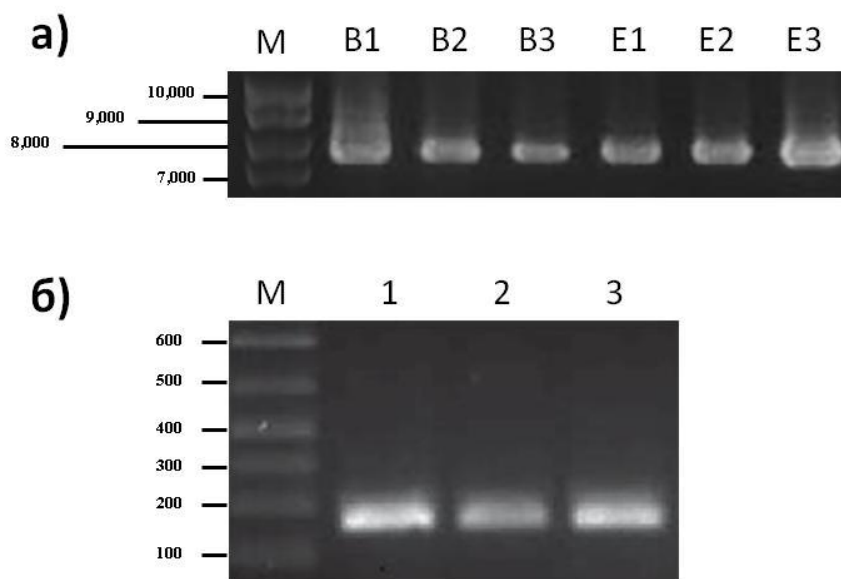


Рис. 5. Анализ полученной плазмидной ДНК. а) обработка рестрикционными эндонуклеазами *VamH1* и *EcoRI*. М - 1 кВ маркеры ДНК; В1-В3 – образцы плазмидной ДНК, обработанные *VamH1*; Е1-Е3 – образцы плазмидной ДНК, обработанные *EcoRI*; б) амплификация плазмидной ДНК со специфичными праймерами *EXT-F* и *EXT-R* (см. раздел "Материалы и методы"). М - 100 б.р. маркеры ДНК; Номера дорожек (1-3) соответствуют номерам тестируемых клонов.

Размеры фрагментов ДНК в маркерах указаны слева от соответствующей иллюстрации.

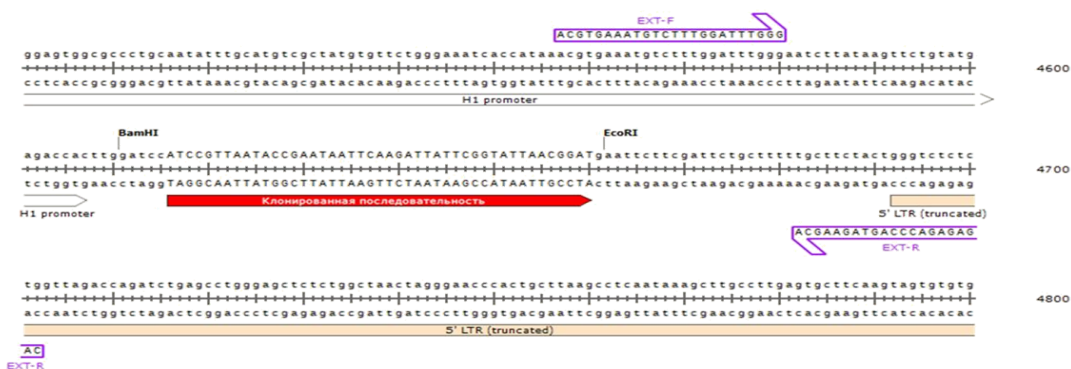


Рис. 6. Результаты секвенирования образца плазмидной ДНК из выбранного клона *E. coli*. На рисунке показаны: клонированная последовательность ДНК, а также близлежащие регуляторные элементы вектора (промотор H1 для экспрессии shРНК и укороченные повторы LTR вируса иммунодефицита человека, HIV-1). Последовательности праймеров, использованных для проведения секвенирования, приведены в разделе "Материалы и методы".

Обсуждение

Природные ингибирующие РНК необходимы для регуляции биосинтеза белка. Их взаимодействие мРНК приводит к ее деградации и, в свою очередь, предотвращает биосинтез целевого белка, то есть того белка, который она кодирует. Этот процесс называется РНК-интерференцией. Синтетические ингибирующие РНК (например, shРНК) удобно использовать в экспериментальной работе с аналогичной целью, т.е. для подавления экспрессии конкретного гена. Например, РНК-интерференция может потребоваться в той ситуации, когда исследуемый ген является частью генного кластера. Такой кластер может включать в себя несколько различных генов с согласованной регуляцией. Тогда, поскольку гены кластера регулируются в составе группы, избирательное "выключение" одного из этих генов без применения РНК-интерференции может оказаться весьма нетривиальной задачей.

Искусственно созданные гены shРНК широко применяются в медицинской промышленности. На их основе создают лекарственные препараты [16] и вакцины [17]. При этом, необходимо помнить, что чем больше shРНК экспрессирует клетка, тем больше вероятность того, что shРНК будет взаимодействовать неспецифично с мРНК других генов. Прежде всего, такое взаимодействие может произойти, когда последовательности двух разных мРНК гомологичны, т.е. их сиквенсы в значительной степени совпадают друг с другом. В англоязычной литературе этот вид неспецифических взаимодействий называют "off target effects".

Для того, чтобы отличить неспецифичные эффекты от специфичных, сравнивают две разновидности культивируемых клеток. Первая – экспрессирует shРНК к нужному гену (т.н. специфичную shРНК). Вторая – экспрессирует контрольную shРНК. Как правило, контрольная shРНК имеет тот же самый нуклеотидный состав, что специфичная shРНК (Таблица 1), но при этом порядок расположения нуклеотидов в контрольной shРНК подобран таким образом, чтобы она не

могла специфично взаимодействовать с уже известными мРНК человека, в том числе и с мРНК нужного гена. По этой причине, для экспериментов по РНК-интерференции *MMP12* человека нам было необходимо провести молекулярный дизайн контрольной shРНК и клонировать кодирующую ее последовательность ДНК в экспрессионный вектор.

Для решения этой задачи мы использовали общедоступные электронные ресурсы [10, 11], чтобы установить две альтернативные последовательности кДНК (комплементарной ДНК). Исследовав свойства обеих кДНК, т.е., сравнив их состав, структуру и дифференциальную термостабильность (Таблица 1), мы выбрали одну из последовательностей (последовательность №1) и клонировали ее в экспрессионный вектор pGPV-17019250. После этого, используя метод автоматического ДНК секвенирования, мы подтвердили, что полученный нами вектор pGPV-17019250-MMP12с содержал нужный для наших экспериментов сиквенс (Рис. 6). В дополнение к сказанному мы хотели бы подчеркнуть, что последовательность №2, также представленная в Таблице 1, не подходила для нашей работы, потому что она содержала палиндром A₁₄TT-AA₁₉. Кроме того степень ее гомологии к одной из известных мРНК человека (*PAPSS1* мРНК) оказалась на 10% больше аналогичного показателя для последовательности №1.

Экспрессионный вектор pGPV-17019250, который мы использовали в нашей работе, является генетически модифицированным лентивирусом, из генома которого были удалены гены, непосредственно связанные с инфекционным процессом. Вместо них в геном pGPV-17019250 были добавлены гены, которых в геноме вируса дикого типа не было. Например, для воспроизводства вектора в *E. coli* был добавлен фактор устойчивости к ампициллину *AmpR*, а для удобства отбора трансдуцированных лентивирусами клеток человека – фактор устойчивости к пурамицину (*PuroR*) и флуоресцентный белок *CopGFP*. Конкретно,

фактор устойчивости к пурамицину был необходим для того, чтобы трансфецированные клетки могли расти и размножаться на селективной среде, в которую добавлен пурамицин, а флуоресцентный белок *CopGFP* – для того, чтобы иметь возможность контролировать трансдукцию визуально, т.е. наблюдать в микроскоп изменения флуоресценции инфицированных клеток во времени.

Непосредственно для клонирования выбранной последовательности (Рис. 2) мы использовали "сайты рестрикции" *EcoRI* и *BamHI*, поскольку в этом случае обработка вектора эндонуклеазами не затрагивает его близлежащие регуляторные элементы: 5'-LTR – сиквенс и промотор *H1*. Целостность промотора *H1* важна, потому что он должен будет регулировать экспрессию *shPНК* в инфицированных клетках человека. В свою очередь, последовательность 5'-LTR необходима для интеграции вирусной ДНК в геном инфицированной клетки.

Полученные нами результаты свидетельствуют о высокой эффективности трансформации *E. coli*, в ходе которой нам удалось получить более сотни клонов трансфецированных клеток (Рис. 4). Отобрав случайным образом три бактериальных клон, мы показали, что находящиеся в них вектора содержат клонированную нами последовательность ДНК. В этой связи, необходимо отметить, что во-первых, в ходе клонирования сохранилась целостность "сайтов рестрикции" *BamHI* и *EcoRI*, по которым мы клонировали выбранную нами последовательность (Рис. 5а). Проверка целостности сайтов рестрикции была необходима для того, чтобы, убедиться в отсутствии мутаций, которые могли появиться в ДНК в процессе клонирования. Для этого мы получили две серии образцов (по три образца в каждой серии), обработав плазмидную ДНК из отобранных клонов одним из упомянутых выше ферментов, и разделили полученные в ходе реакции фрагменты ДНК методом электрофореза. Согласно полученным нами результатам, обработка тестируемых образцов привела к образованию линейной формы вектора. При этом ее подвижность соответствовала подвижности фрагмента ДНК ожидаемого размера (~7.8 тыс. п.н.). В этом можно убедиться, сравнив Рис. 3 и 5а. Кроме того, используя метод полимеразной цепной реакции, мы амплифицировали фрагмент вектора со специфичными праймерами *EХТ-F* и *EХТ-R*. Размер полученного нами продукта реакции совпадал с расчетным значением ~150 п.н. (Рис. 5б), т.е., предположительно, содержал клонированную нами последовательность ДНК.

Появление мутаций при проведении лигирования – сравнительно нечастое явление, в особенности, если учесть, что в современной лабораторной практике в подавляющем большинстве случаев используют генетически модифицированные ферменты с улучшенными свойствами. При этом в литературе описаны

ситуации, когда при взаимодействии с Т4 ДНК лигазой, в молекуле ДНК, действительно, могут появляться мутации. Например, во время заражения бактерий бактериофагом Т4 одноименная лигаза бактериофага, помимо своей основной активности, катализирует удаление из ДНК поврежденных оснований, которые могут случайно там оказаться [18].

В экспериментах, подобных нашему, наиболее вероятны повреждения в последовательности двухцепочечного олигонуклеотида, клонированного в вектор. Во-первых, мутации в использованной нами синтетической ДНК могли появиться из-за технических проблем в процессе синтеза олигонуклеотидных последовательностей из коммерческих реагентов. Во-вторых, необходимо помнить, что эффективность работы Т4 ДНК лигазы существенно снижается при уменьшении концентрации АТФ в буферном растворе, который используют для лигирования. Например, при многократном замораживании и оттаивании буферного раствора в нем происходит снижение концентрации АТФ [19]. В этом случае, наибольшему риску подвергаются т.н. "липкие" концы ДНК, т.е. те ее участки, которые находятся в непосредственном контакте с ферментом.

Наконец, нам надо было убедиться в том, что сиквенс клонированной последовательности точно совпадает с сиквенсом, выбранной нами для клонирования кДНК. Для решения этой задачи мы провели секвенирование одного из выбранных нами ранее трех образцов плазмидной ДНК. В этом эксперименте мы использовали уже упомянутую выше пару праймеров. Это означает, что мы секвенировали ДНК в обоих направлениях, причем обе секвенированные последовательности содержали клонированный нами фрагмент. Кроме этого, секвенированные нами последовательности перекрывались друг с другом, что позволило нам определить, как именно клонированный олигонуклеотид соединен с вектором *pGPV-17019250*. В результате нам удалось подтвердить, что секвенированный участок, действительно, содержит последовательность гена, который кодирует контрольную *shPНК* (Рис. 6).

В заключение, мы хотели бы отметить, что полученный нами вектор *pGPV-17019250-MMP12c* содержал последовательность, кодирующую контрольную *shPНК* (*MMP12c shPНК*). Таким образом, этот вектор можно использовать в экспериментах по РНК-интерференции *MMP12* человека для создания отрицательного контроля. Нами были также получены клоны *E. coli*, для наработки вектора *pGPV-17019250-MMP12c* в бактериях. В дальнейшем мы планируем использовать вектор *pGPV-17019250-MMP12c* в экспериментальных исследованиях псориаза и рака кожи.

Список литературы

1. Tewari A., Grys K., Kollet J., Sarkany R., Young A.R. Upregulation of MMP12 and its activity by UVA1 in human skin: potential implications for

- photoaging // *J. Invest. Dermatol.* 2014. V. 134. № 10. P. 2598 – 2609.
2. Stawski L, Haines P, Fine A, Rudnicka L, Trojanowska M. MMP-12 deficiency attenuates angiotensin II-induced vascular injury, M2 macrophage accumulation, and skin and heart fibrosis // *PLoS One.* 2014. V. 9. № 10. e109763.
3. Zhang Z, Zhu S, Yang Y, Ma X, Guo S. Matrix metalloproteinase-12 expression is increased in cutaneous melanoma and associated with tumor aggressiveness // *Tumour Biol.* 2015. V. 36. № 11. P. 8593 – 8600.
4. Mogulevtseva, J.A., Mezentsev, A., Bruskin S.A., The Role of Matrix Metalloproteinases in the Pathogenesis of Psoriasis, in *A Closer Look at Metalloproteinases.* Hauppauge, NY. Nova science publishers, 2019.
5. Koolwijk P, Sidenius N, Peters E, Sier C.F., Hanemaaijer R, Blasi F., van Hinsbergh V.W. Proteolysis of the urokinase-type plasminogen activator receptor by metalloproteinase-12: implication for angiogenesis in fibrin matrices // *Blood.* 2001. V. 97. № 10. P. 3123 – 3131.
6. Vogelstein B., Gillespie D. Preparative and analytical purification of DNA from agarose // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1979. V. 76. № 2. P. 615 – 619.
7. Bertani G. Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems // *J. Bacteriol.* 2004. V. 186. № 3. P. 595 – 600.
8. Hammond M. P., Birney E. Genome information resources – developments at Ensembl // *Trends Genet.* 2004. V. 20. № 6. P. 268 – 272.
9. Бондарь В., Мезенцев А.В. Клонирование последовательности shРНК, специфичной к эластазе макрофагов, в экспрессионный вектор рGPV-17019250 // *Евразийский Союз Ученых. Серия: медицинские, биологические и химические науки.* 2021. № 7. С. 29–36.
10. Online Application to design scrambled sequence [Electronic resource]. URL: <https://www.genscript.com/ssl-bin/app/scramble> (Accessed at 18.01.2022).
11. Scrambled siRNA [Electronic resource]. URL: <http://www.invivogen.com/sirnazard/scrambled.php> (Accessed at 18.01.2022).
12. Oligo Calc [Electronic resource]. URL: <http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html> (Accessed at 18.01.2022).
13. blastn suite [Electronic resource]. URL: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch (Accessed at 18.01.2022).
14. Palindromic Sequences Finder [Electronic resource]. URL: <https://www.novoprolabs.com/tools/dna-palindrome> (Accessed at 18.01.2022).
15. Design hairpin insert [Electronic resource]. URL: <https://www.invivogen.com/sirnazard/construct.php> (Accessed at 18.01.2022).
16. Kristen A.V., Ajroud-Driss S., Conceição I., Gorevic P., Kyriakides T., Obici L. Patisiran, an RNAi therapeutic for the treatment of hereditary transthyretin-mediated amyloidosis. // *Neurodegener Dis. Manag.* 2019. V. 9. № 1. P. 5-23.
17. Geall A.J., Verma A., Otten G.R., Shaw C.A., Hekele A., Banerjee K., Nonviral delivery of self-amplifying RNA vaccines // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012. V. 109. № 36. P. 14604 – 14609.
18. Bogenhagen D.F., Prinz K.G. The action of DNA ligase at abasic sites in DNA // *J. Biol Chem.* 1998. V. 273. № 14. P. 7888-7893.
19. Green, M.R., Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual: 4th ed.* Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012. P. 235-239.