

На правах рукописи

АКИМОВ ИВАН АЛЕКСЕЕВИЧ



**ИНТЕРФЕРИРУЮЩАЯ И АНТИПРОЛИФЕРАТИВНАЯ  
АКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ дцРНК В КУЛЬТУРАХ ОПУХОЛЕВЫХ  
КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ**

03.01.04 – биохимия

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2012

Работа выполнена в Институте химической биологии и фундаментальной  
медицины СО РАН

**Научный руководитель:**

к.х.н. Черноловская Елена Леонидовна

**Официальные оппоненты:**

д.б.н., профессор, чл.-корр. РАН Дыгало Николай Николаевич  
д.б.н. Рыкова Елена Юрьевна

**Ведущая организация:**

Институт молекулярной биологии  
им. В. А. Энгельгардта РАН

Защита состоится « \_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2012 г. в \_\_\_\_\_ часов  
на заседании диссертационного совета Д 003.045.01 при Институте  
химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу:  
630090, Новосибирск, проспект академика Лаврентьева, 8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института химической  
биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Автореферат разослан « \_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2012 г.

Ученый секретарь диссертационного совета  
к.х.н., доцент



Коваль В. В.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Онкологические заболевания являются одной из основных проблем современной медицины. Существующие на данный момент схемы лечения злокачественных опухолей используют хирургические методы в комплексе с высокодозной агрессивной химиотерапией, серьезным недостатком которой является высокая токсичность современных противоопухолевых препаратов в отношении жизненно-важных органов и систем организма. Поиск генов-мишеней, селективное ингибирование экспрессии которых блокирует или значительно замедляет пролиферацию опухолевых клеток, является задачей, решение которой важно для разработки новых препаратов для терапии онкологических заболеваний. Продукты генов *Her2*, *CCNB1* и *PKC* играют ключевую роль в регуляции клеточной пролиферации. Аномально высокий уровень экспрессии этих генов обнаружен в клетках опухолей человека различных типов, и показано что он может быть причиной развития ряда онкологических заболеваний. Определение влияния селективного “выключения” генов-кандидатов на клеточную пролиферацию является важным для определения их терапевтического потенциала как мишеней для ген-направленной терапии. Продукты генов, участвующих в развитии раковых заболеваний, относятся к разным классам белков, поэтому прямым подходом к получению ингибиторов экспрессии генов является использование малых интерферирующих РНК (siРНК), способных избирательно связываться с мРНК гена-мишени и инактивировать ее. Таким образом, создание на основе siРНК специфических ингибиторов экспрессии генов, участвующих в регуляции клеточного цикла: *Her2*, *CCNB1* и *PKC*, и исследование влияния этих ингибиторов на пролиферацию опухолевых клеток человека различного происхождения является актуальной задачей, решение которой важно для разработки новых методов терапии онкологических заболеваний.

**Целью настоящей работы** являлось создание специфических ингибиторов экспрессии генов, участвующих в регуляции клеточного цикла: *Her2* (*c-erb-B2*, *neu*), *CCNB1* (циклин В1) и *PKC* (протеинкиназа С), на основе дцРНК и исследование влияния этих ингибиторов на пролиферацию опухолевых клеток человека различного происхождения. В ходе исследования решались следующие задачи:

- 1) Исследовать эффективность и длительность ингибирующего действия малых интерферирующих РНК (siРНК), направленных на мРНК генов *Her2*, *CCNB1* и *PKC* в опухолевых клетках человека различного происхождения.
- 2) Исследовать влияние длинных дцРНК, гомологичных мРНК генов *c-Myc* и *GFP* на пролиферацию опухолевых клеток человека.

3) Исследовать изменение скорости пролиферации опухолевых клеток различного происхождения, подвергнутых действию siРНК, направленных на мРНК генов *Her2*, *CCNB1* и *PKC*, после восстановления экспрессии генов-мишеней.

4) Исследовать влияние полученных siРНК на изменение генной экспрессии в опухолевых клетках человека и их жизнеспособность.

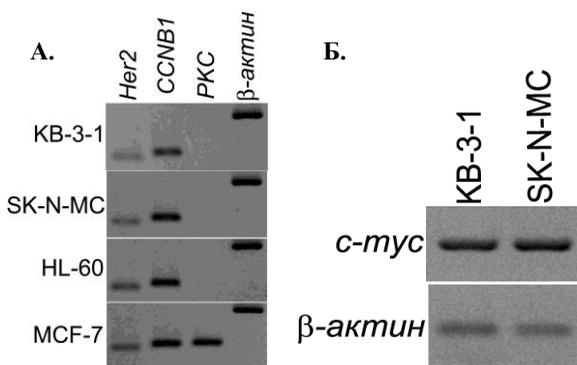
**Научная новизна и практическая ценность работы.** Впервые исследована кинетика изменения относительного уровня экспрессии генов *Her2*, *CCNB1* и *PKC* под действием siРНК на протяжении первых 12 суток после трансфекции клеток KB-3-1, SK-N-MC и MCF-7, с целью определения длительности ингибирующего экспрессию генов-мишеней действия. Показано, что максимальное ингибирование экспрессии генов-мишеней достигается через 72 ч после трансфекции siРНК. Впервые исследована скорость пролиферации данных опухолевых клеток после восстановления уровней экспрессии генов *Her2*, *CCNB1* и *PKC*. Показано, что наиболее значительный и длительный антипролиферативный эффект оказывает ингибирование экспрессии генов *CCNB1* и *PKC* в клетках культуры SK-N-MC. Впервые показано, что в клетках рака молочной железы MCF-7 антипролиферативное действие ингибирования экспрессии генов *CCNB1* и *PKC* существенно выше антипролиферативного действия, обусловленного ингибированием экспрессии гена *Her2*. Таким образом, гены *CCNB1* и *PKC* могут являться перспективными терапевтическими мишенями для препаратов, предназначенных для лечения нейроblastом и рака молочной железы. Примененная нами схема технологической платформы исследования может быть использована для расширенных исследований различной целевой направленности при определении генов-мишеней.

**Публикации и апробация работы.** По материалам диссертации опубликовано 3 печатные работы. Результаты работы представлены на конференциях: “Apoptosis World 2008: From mechanisms to applications” (Люксембург, 2008); “IV съезд Российского Общества Биохимиков и Молекулярных Биологов” (Новосибирск, 2008); “Фундаментальные науки – медицине” (Новосибирск, 2008, 2010); “Cell Signal-Omics 2011: Integrated cellular pathology. Systems biology of human disease” (Люксембург, 2011).

**Структура и объем работы.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на 152 страницах, содержит 27 рисунков и 16 таблиц. Библиография содержит 410 литературных источников.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Выбор генов-мишеней, клеточных линий, siРНК и длинных дцРНК.** Гены *Her2* (*c-erb-B2*), *CCNB1*, *PKC* и *c-Мус* (*MRTL*), кодирующие белковые факторы, относящиеся к разным группам регуляторов клеточного цикла, могут рассматриваться как потенциальные мишени для направленного действия siРНК. Ранее было показано экспериментально и подтверждено клинически, что нарушения экспрессии этих генов могут приводить к возникновению злокачественных опухолей у человека. Основываясь на литературных данных, мы выбрали эти гены в качестве мишеней для siРНК. В качестве моделей для исследования биологической активности siРНК и длинных дцРНК были использованы клетки эпидермоидной карциномы KB-3-1, нейробластомы SK-N-MC и клетки острого лейкоза HL-60, характеризующиеся повышенной экспрессией генов *Her2* и *CCNB1*, а также клетки аденокарциномы молочной железы MCF-7 в которых вместе с этими генами также наблюдается гиперэкспрессия *PKC* (Рис. 1).



**Рис. 1.** А. Уровни мРНК генов *Her2*, *CCNB1* и *PKC* в клетках линий KB-3-1, SK-N-MC, MCF-7 и HL-60. Б. Уровни мРНК гена *c-Мус* в клетках линий KB-3-1 и SK-N-MC. Продукты реакции ОТ-ПЦР разделяли методом электрофореза в 1.5% агарозном геле и детектировали с помощью окрашивания бромистым этидием.

Для направленного подавления экспрессии генов *Her2*, *CCNB1* и *PKC* мы использовали siРНК, выбранные с помощью программы BioPredSi и синтезированные твердофазным фосфитамидным методом (Табл. 1). Нуклеазо-чувствительные сайты siРНК были защищены путем введения 2'-О-метил-аналогов рибонуклеотидов. В качестве негомологичного по отношению к мишени контроля использовали siScr, не обладающую значимой гомологией с последовательностями мРНК генов мыши, крысы и человека.

**Таблица 1.** siРНК, использованные в работе

Обозначение	Последовательность*	Мишень
siHer	5`-GCAGUUAC <u>C</u> AGUGC <u>C</u> AAUAAU-3` 3`-CCC <u>G</u> CAA <u>U</u> GG <u>U</u> CAGG <u>U</u> UAU-5`	1299 – 1319 н. мРНК <i>Her2</i>
siCyc	5`- <u>C</u> AC <u>C</u> AGGAACUCGAAAAUUUU-3` 3`-CAG <u>U</u> GG <u>U</u> CCUUGAGCUUUUAA-5`	190 – 210 н. мРНК <i>CCNB1</i>
siPKC	5`-GCGGC <u>C</u> AGAGAAGGAAAAUU-3` 3`-G <u>U</u> CGCCG <u>G</u> UCUCUUCUUUUU-5`	1080 – 1100 н. мРНК <i>PKC</i>
siScr	5`- <u>C</u> AAGUCUCG <u>U</u> A <u>U</u> GUAG <u>U</u> GGUU-3` 3`-UU <u>G</u> UUCAGAGCA <u>U</u> A <u>C</u> A <u>U</u> CA <u>C</u> C-5`	-

\* C – 2`-О-метил-цитозин, U – 2`-О-метил-уридин

Для сравнения с действием siРНК была выбрана длинная дцРНК dsMyc, гомологичная участку мРНК *c-Myc*, вызывающая как РНК-интерференцию так и интерфероновый ответ; dsEGFP, гомологичная участку мРНК *EGFP* - способная вызывать только неспецифический интерфероновый ответ; и коммерчески доступный препарат поли-инозиновой-поли-цитидиловой кислоты (poly(I:C)), являющийся индуктором эндогенного интерферона (Табл. 2). Цепи дцРНК получали транскрипцией *in vitro* на ДНК-матрицах.

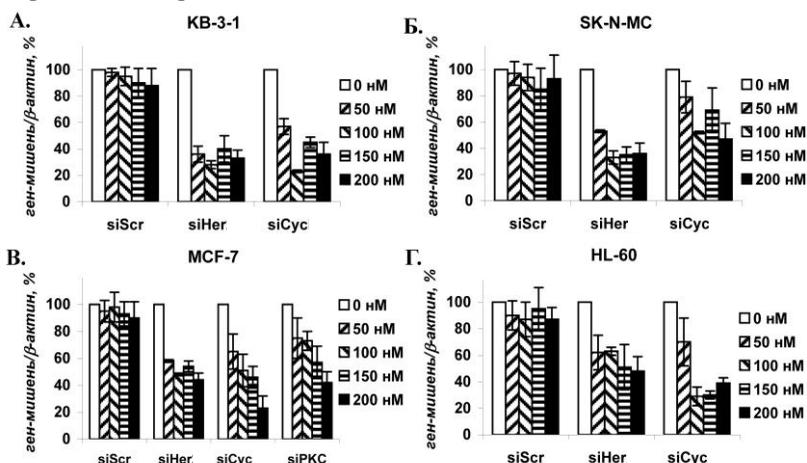
**Таблица 2.** Длинные дцРНК, использованные в работе

дцРНК	Мишень
dsMyc	1159 – 1631 н. мРНК гена <i>c-Myc</i>
dsEGFP	1 – 448 н. мРНК гена <i>EGFP</i>
poly(I:C)	коммерчески доступный препарат

**Подавление экспрессии *Her2*, *CCNB1*, *PKC* и *c-Myc* в клеточных линиях KB-3-1, SK-N-MC, MCF-7 и HL-60 под действием siРНК и дцРНК.** Эффективность интерферирующего действия используемых siРНК оценивали по снижению уровня целевой мРНК. Относительный уровень мРНК генов определяли с помощью ОТ-ПЦР, в качестве внутреннего стандарта использовали мРНК  $\beta$ -актина. Показано, что через 48 ч после трансфекции siCyc, siHer и siPKC вызывают существенное ингибирование экспрессии генов-мишеней в клетках KB-3-1, SK-N-MC, MCF-7 и HL-60 (Рис. 2).

Через 48 ч после трансфекции siHer уровень мРНК гена *Her2* составлял 28 – 40% в клетках линии KB-3-1, 33 – 53% в SK-N-MC, 44 – 58% в MCF-7 и 48 – 63% в клетках линии HL-60 относительно уровня этой мРНК в клетках контрольной популяции, которая была обработана только трансфецирующим агентом, причем этот эффект мало зависит от концентрации siHer в диапазоне 50 – 200 нМ (Рис. 2). Трансфекция клеток siCyc в концентрации 50

– 200 нМ снижает уровень мРНК гена *CCNB1* концентрационно-зависимым образом, что особенно сильно проявляется в клетках линий MCF-7 и SK-N-MC. Наименьшие по сравнению с контролем уровни экспрессии мРНК гена *CCNB1* составили 23% и 29% для клеток KB-3-1 и HL-60 при концентрации siCyc 100 нМ и 23% и 47% для клеток MCF-7 и SK-N-MC при концентрации siCyc 200 нМ (Рис. 2). Аналогичные данные были получены для siРНК, направленной к мРНК гена *PKC*: трансфекция siРНК в концентрации 200 нМ вызывает снижение уровня мРНК этого гена в клетках линии MCF-7 до 42%-го уровня по сравнению с контрольной популяцией (Рис. 2). Наблюдаемое подавление экспрессии генов-мишеней под действием siРНК является ген-специфичным, поскольку после добавления, например, комплекса siРНК с трансфекционным реагентом



**Рис. 2.** Подавление экспрессии генов *Her2*, *CCNB1* и *PKC* в клетках KB-3-1 (А), SK-N-MC (Б), MCF-7 (В) и HL-60 (Г) через 48 ч после трансфекции siРНК в концентрации от 50 до 200 нМ. Представлено среднее значение ± стандартное отклонение, рассчитанное по результатам трех независимых экспериментов. Относительную экспрессию генов-мишеней определяли как отношение уровня их мРНК к уровню мРНК  $\beta$ -актина, использованного в качестве внутреннего стандарта.

(олигофектамин для клеток SK-N-MC и липофектамин - для остальных) происходило снижение экспрессии только целевого гена-мишени, а экспрессия других генов и гена домашнего хозяйства  $\beta$ -актина оставалась на прежнем уровне. Как и ожидалось, siРНК со случайной последовательностью siScr практически не влияет на экспрессию генов-мишеней. Сопоставляя полученные нами результаты с описанными в литературе, можно сделать вывод о том, что последовательности siРНК были выбраны нами удачно, так

как обеспечивают более эффективное подавление экспрессии соответствующих генов, чем описано в литературе.

Для проверки возможности применения длинных дцРНК как в качестве специфических инструментов РНК-интерференции, так и в качестве индукторов неспецифического клеточного ответа мы сравнили действие siРНК с действием протяженных дцРНК на опухолевые клетки человека. При трансфекции клеток KB-3-1 и SK-N-MC длинной дцРНК dsMyc, гомологичной участку мРНК гена *c-Myc*, в концентрации 0.05 – 0.25 мкг/мл, через 48 ч после трансфекции наблюдалось снижение относительного уровня экспрессии этого гена до 5 – 20% в клетках KB-3-1 и до 30 – 50% в клетках SK-N-MC. dsEGFP (в концентрации 0.05 – 0.25 мкг/мл) вызывала снижение экспрессии *c-Myc* до 35 – 90% в KB-3-1 и до 40 – 60% - в SK-N-MC. Гомополимер poly(I:C) был не эффективен в концентрации 0.05 мкг/мл, но при концентрации 0.25 мкг/мл его трансфекция через 48 ч вызывала снижение уровня экспрессии *c-Myc* в клетках KB-3-1 и SK-N-MC до 40%-го уровня в сравнении с контролем (Табл. 3).

**Таблица 3.** Подавление экспрессии гена *c-Myc* в клетках KB-3-1 и SK-N-MC через 48 ч после трансфекции дцРНК

дцРНК		Уровень экспрессии <i>c-Myc</i> , %	
		KB-3-1	SK-N-MC
0.05 мкг/мл	dsMyc	20	50
	dsEGFP	90	60
	poly(I:C)	100	100
0.25 мкг/мл	dsMyc	5	30
	dsEGFP	35	40
	poly(I:C)	40	40

**Пролиферация клеток линий KB-3-1, SK-N-MC, MCF-7 и HL-60 после подавления экспрессии генов *Her2*, *CCNB1* и *PKC*.** Зависимость скорости пролиферации клеток в линиях KB-3-1, SK-N-MC, MCF-7 и HL-60 от уровня экспрессии генов *Her2*, *CCNB1* и *PKC* определяли с помощью колориметрического МТТ-теста, принимая за 100% скорость клеточной пролиферации в контрольных лунках. Полученные данные показывают (Табл. 4), что siHer в концентрациях 50 и 200 нМ приводит к снижению скорости пролиферации клеток KB-3-1 до 84 и 75%, SK-N-MC – до 93 и 79%, MCF-7 – до 82 и 65% от скорости роста клеток в контроле, соответственно. Несмотря на значительное подавление экспрессии гена *Her2* под действием siHer во всех клеточных линиях, скорость пролиферации заметно снижалась лишь в клетках MCF-7 (до 65%), в то время как в остальных клеточных линиях антипролиферативный эффект был выражен слабо.

Подавление экспрессии гена *CCNB1* с помощью siCycс снижает скорость деления клеток KB-3-1 до 75 и 61% от контроля, SK-N-MC – до 82 и 4%, MCF-7 – до 77 и 53% при концентрации 50 и 200 нМ, соответственно. Несмотря на значительное снижение экспрессии гена *CCNB1* под действием siCycс в клетках HL-60 (Рис. 2), это снижение не сопровождается достоверным снижением скорости их роста (Табл. 4).

**Таблица 4.** Влияние siHer, siCycс, siPKC, dsEGFP и poly(I:C) на пролиферацию клеток KB-3-1, SK-N-MC, MCF-7 и HL-60

siРНК / дцРНК, концентрация	Скорость пролиферации, %*			
	KB-3-1	SK-N-MC	MCF-7	HL-60
<b>Контроль**</b>	100 ±5	100 ±1	100 ±3	100 ±3
<b>siScr, 50 нМ / 0.668 мкг/мл</b>	89 ±2	105 ±5	94 ±4	99 ±2
<b>siScr, 200 нМ / 2.671 мкг/мл</b>	90 ±2	68 ±2	92 ±3	101 ±1
<b>siHer, 50 нМ, 0.665 мкг/мл</b>	84 ±8	93 ±4	82 ±5	97 ±2
<b>siHer, 200 нМ / 2.661 мкг/мл</b>	75 ±9	79 ±1	65 ±1	100 ±4
<b>siCycс, 50 нМ / 0.666 мкг/мл</b>	75 ±2	82 ±4	77 ±3	99 ±2
<b>siCycс, 200 нМ / 2.663 мкг/мл</b>	61 ±4	4 ±2	53 ±4	98 ±4
<b>siPKC, 50 нМ / 0.668 мкг/мл</b>	-	-	57 ±3	-
<b>siPKC, 200 нМ / 2.672 мкг/мл</b>	-	-	11 ±2	-
<b>siEx3, 50 нМ / 0.668 мкг/мл</b>	90 ±3***	95 ±2***	68 ±2	80 ±5
<b>siEx3, 200 нМ / 2.672 мкг/мл</b>	2 ±1***	46 ±3***	20 ±5	37 ±3
<b>dsMyc, 0.017 нМ / 0.005 мкг/мл</b>	14 ±5	3 ±2	-	-
<b>dsMyc, 0.164 нМ / 0.05 мкг/мл</b>	0 ±1	7 ±3	-	-
<b>dsEGFP, 0.017 нМ / 0.005 мкг/мл</b>	0 ±2	9 ±7	0 ±3	102 ±4
<b>dsEGFP, 0.174 нМ / 0.05 мкг/мл</b>	0 ±1	9 ±5	0 ±2	106 ±7
<b>poly(I:C), 0.005 мкг/мл</b>	104 ±7	112 ±3	53 ±4	101 ±3
<b>poly(I:C), 0.05 мкг/мл</b>	44 ±6	0 ±3	0 ±5	106 ±10

\*Представлены средние значения по результатам трех независимых экспериментов ± стандартное отклонение.

\*\* Клетки, обработанные только трансфецирующим агентом.

\*\*\*Данные Кабиловой Т.О.

Сравнение действия siРНК с действием длинных дцРНК показало, что трансфекция 0.005 – 0.05 мкг/мл dsMyc приводит к практически полному блокированию деления клеток KB-3-1 (при 0.05 мкг/мл), и более чем в 10 раз замедляет пролиферацию клеток SK-N-MC. Трансфекция dsEGFP 10-кратно замедляет деление SK-N-MC, полностью блокирует пролиферацию KB-3-1 и MCF-7, и не влияет на пролиферацию клеток HL-60. Гомополимер poly(I:C),

при трансфекции в концентрации 0.005 мкг/мл, не влияет на деление клеток KB-3-1, SK-N-MC и HL-60, и вдвое замедляет деление MCF-7. При повышении его концентрации до 0.05 мкг/мл происходит полная остановка деления SK-N-MC и MCF-7, а также 2-кратное замедление деления KB-3-1, в то время как скорость деления HL-60 остается без изменения (Табл. 4). Полученные данные свидетельствуют о том, что длинная дцРНК dsMyc оказывает более эффективное антипролиферативное действие, чем siРНК, направленная на тот же ген (siEx3, данные Т.О.Кабиловой) (Табл. 4). Это вероятно связано со вкладом интерферон-индуцирующего эффекта дцРНК. Уменьшение относительного уровня мРНК гена *c-Myc* в клетках KB-3-1 и SK-N-MC под действием препаратов dsMyc, dsEGFP и poly(I:C) коррелирует со значительным снижением скорости клеточной пролиферации. Более эффективное снижение скорости пролиферации KB-3-1 под действием препарата dsMyc, чем под действием poly(I:C), вероятно, в данном случае связано с вкладом специфического подавления экспрессии гена *c-Myc* по механизму РНК-интерференции. Высокая антипролиферативная активность dsEGFP, сравнимая с активностью dsMyc, вероятно связана с более эффективной индукцией интерферонового ответа, а, возможно, и с наличием определенных последовательностей, которые затем после процессинга dsEGFP, в составе siРНК способны подавлять экспрессию других генов, ответственных за клеточную пролиферацию.

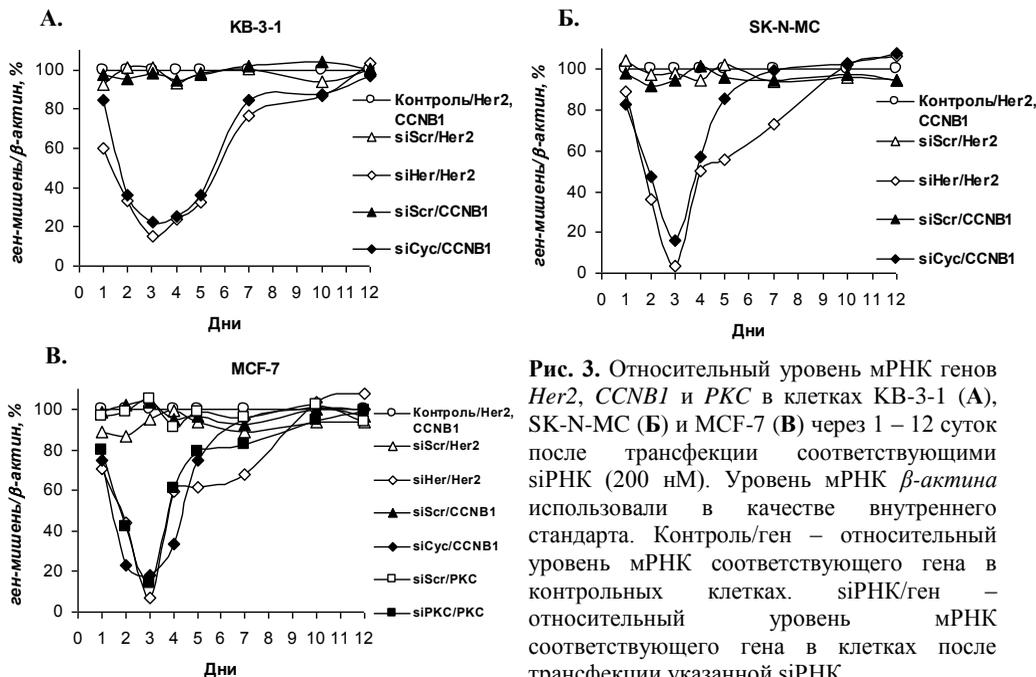
Ингибирование экспрессии гена *PKC* под действием 50 и 200 нМ siPKC снижает скорость деления клеток MCF-7 до уровня в 57 и 11%, соответственно (Табл. 4). Несмотря на то, что ген *Her2* является традиционной мишенью для генотерапевтического воздействия на клетки рака молочной железы, наши данные показывают, что в клетках MCF-7 ген *PKC* является более предпочтительной мишенью. Двукратное снижение уровня экспрессии этого гена почти на порядок подавляет скорость пролиферации клеток линии MCF-7 (Рис. 2, Табл. 4). Ни одна из описанных выше siРНК не влияет на скорость пролиферации клеток HL-60 (Табл. 4). Можно предположить, что в клетках HL-60 активированы альтернативные пути передачи сигнала, способные компенсировать выключение единичных регуляторных генов и поддерживать клеточное деление, не исключено, что присутствующая в этих клетках химерная тирозинкиназа (*c-ABL*) компенсирует функции тех регуляторных факторов, экспрессия которых была снижена с помощью siРНК. Исходя из полученных экспериментальных данных, можно заключить, что гены *Her2* и *CCNB1*, по-видимому, не могут рассматриваться как перспективные мишени для антипролиферативных препаратов в клеточных линиях KB-3-1 и HL-60, поскольку эффективное подавление экспрессии этих генов не вызывает значимого снижения скорости клеточного деления. Возможно, в клетках карциномы такой мишенью может

быть ген *c-Myc*, поскольку ранее в нашей лаборатории к. б. н. Кабиловой Т. О. было показано, что подавление экспрессии этого гена в клетках KB-3-1 (200 нМ siEx3) практически полностью блокирует их пролиферацию (до 2% от контроля), а в клетках SK-N-MC – замедляет ее вдвое (Табл. 4).

Мы испытали полученную ранее анти-*c-Myc* siEx3 на других клеточных линиях. Трансфекция клеток MCF-7 50 – 200 нМ siEx3 приводит к снижению скорости пролиферации до 20 – 70% от контроля, а скорость деления клеток HL-60 снижается до 40 – 80%, что может указывать на то, что ген *c-Myc* может являться перспективной мишенью для подавления пролиферации клеток HL-60 с помощью siРНК. Таким образом, наиболее эффективное ингибирование пролиферации клеток KB-3-1 (до 2%) происходит при ингибировании экспрессии гена *c-Myc*. Для клеток SK-N-MC наиболее эффективной молекулярной мишенью, ингибирование которой оказывает антипролиферативное действие (до 4%) является ген *CCNB1*, для клеток MCF-7 – ген *PKC* (до 11%), а для клеток HL-60 – ген *c-Myc* (подавление до 40%). Полученные нами данные показали, что использование siРНК позволяет подобрать индивидуальную молекулярную мишень для антипролиферативных агентов в разных типах опухолевых клеток человека.

**Кинетика изменения уровня экспрессии генов *Her2*, *CCNB1* и *PKC* в клетках линий KB-3-1, SK-N-MC и MCF-7 после трансфекции siРНК.** Важной информацией при исследовании антипролиферативного действия siРНК является длительность их специфического ингибирующего экспрессию генов-мишеней действия. Мы исследовали кинетику изменения относительного уровня экспрессии генов *Her2*, *CCNB1* и *PKC* под действием siРНК (200 нМ) на протяжении первых 12 суток после трансфекции клеток KB-3-1, SK-N-MC и MCF-7. Все исследуемые siРНК эффективно и специфично подавляют экспрессию своих генов-мишеней в использованных клеточных линиях, причем максимальное подавление (до 1 – 3% от контроля) наблюдается через 72 ч после трансфекции (Рис. 3). Через 72 ч после трансфекции уровень мРНК гена *Her2* составил 15% в клетках KB-3-1, 4% в клетках SK-N-MC и 7% - в клетках линии MCF-7 относительно контроля. Уровень мРНК гена *CCNB1* через 72 ч после трансфекции siCус понижался до 22% по сравнению с контролем в клетках KB-3-1, до 16% - в SK-N-MC и до 18% - в клетках MCF-7. Трансфекция siPKC снижает уровень мРНК гена *PKC* в клетках MCF-7 до 14%. Полученные данные свидетельствуют о том, что siHer, как ингибитор экспрессии гена *Her2*, наиболее эффективен в клетках линий SK-N-MC и MCF-7, а siCус наиболее эффективно снижает уровень мРНК гена *CCNB1* в клетках SK-N-MC и MCF-7 (Рис. 3). Начиная с 4-го дня после трансфекции, уровень мРНК всех генов постепенно увеличивался и возвращался к исходному значению к 7 – 12 суткам после трансфекции. Постепенное восстановление исходного уровня мРНК в

клетках может быть связано с клеточным делением, которое приводит к снижению концентрации siРНК в цитоплазме, и, как следствие, к ослаблению эффекта РНК-интерференции. Другой причиной снижения биологической эффективности также может быть расщепление siРНК под действием рибонуклеаз в цитоплазме и снижение их активной концентрации.



**Рис. 3.** Относительный уровень мРНК генов *Her2*, *CCNB1* и *PKC* в клетках KB-3-1 (А), SK-N-MC (Б) и MCF-7 (В) через 1 – 12 суток после трансфекции соответствующими siРНК (200 нМ). Уровень мРНК  $\beta$ -актина использовали в качестве внутреннего стандарта. Контроль/ген – относительный уровень мРНК соответствующего гена в контрольных клетках. siРНК/ген – относительный уровень мРНК соответствующего гена в клетках после трансфекции указанной siРНК.

**Проапоптотическая активность siHer, siCyc, dsMyc, dsEGFP и poly(I:C).** Для выяснения механизма антипролиферативного действия исследованных siРНК мы проанализировали их влияние на индукцию апоптоза, используя для этого метод селективного окрашивания живых, мертвых и находящихся в стадии апоптоза клеток. Все образцы, включая контрольные клетки, подвергнутые действию только трансфектанта, через 72 ч содержали определенный процент мертвых клеток (от 11 до 58%), в то время как популяция клеток перед трансфекцией содержала менее 10% мертвых клеток (Табл. 5). Это связано с определенной токсичностью самого трансфецирующего агента. После трансфекции siScr, siHer и siCyc доля мертвых клеток была различна для разных клеточных линий: минимальное их содержание обнаружено в популяции клеток HL-60 (10.4 – 15.2%), несколько больше в клетках KB-3-1 (17.1 – 20.2%) и SK-N-MC (23.7 – 28%), а

наименее жизнеспособными оказались клетки линии MCF-7 (36.3 – 50.5% погибших клеток). Клетки, находящиеся в стадии апоптоза, обнаружены только в популяциях клеток линий KB-3-1 (1.6 – 3.9%) и HL-60 (1.7 – 2.6%).

**Таблица 5.** Количество мертвых клеток (М) и клеток в стадии апоптоза (А) через 72 ч после трансфекции дцРНК\*

дцРНК \ клетки	KB-3-1		SK-N-MC	MCF-7	HL-60
	А	М			
Контроль**	А	2.5	-	-	1.7
	М	17.1	29.5	41.3	11.4
siScr, 200 нМ	А	3.3	-	-	2.1
	М	17.1	23.7	46	15.2
siHer, 200 нМ	А	3.9	-	-	1.7
	М	20.2	28	50.5	12.7
siCyc, 200 нМ	А	1.6	-	-	2.6
	М	17.3	26	36.2	10.4
dsMyc, 0.05 мкг/мл	А	0.32	-	-	-
	М	35.5	-	-	-
dsEGFP, 0.05 мкг/мл	А	0.28	-	-	-
	М	58.5	-	-	-
poly(I:C), 0.05 мкг/мл	А	0.3	-	-	-
	М	24.7	-	-	-

\*Данные представлены как средние значения по результатам трех независимых экспериментов. Стандартное отклонение составляет < 10%.

\*\* Клетки, обработанные только трансфектантом.

В популяции KB-3-1 после трансфекции 0.05 мкг/мл dsMyc, dsEGFP и poly(I:C) доля мертвых клеток составляет, соответственно, 35, 58 и 24%. Из этих данных видно, что доля мертвых клеток в популяции KB-3-1 через 72 ч после трансфекции значительно превышает таковую после обработки siРНК, что вероятно связано с индукцией интерферонового ответа и вызванной им клеточной гибелью (Табл. 5).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в популяциях, обработанных как контрольной siРНК, так и siРНК, направленными на мРНК генов *CCNB1*, *Her2* и *PKC*, не происходит увеличения количества мертвых и находящихся в стадии апоптоза клеток по сравнению с препаратами клеток, обработанных только трансфектантом. Можно предположить, что в используемых клеточных линиях не клеточная гибель, а подавление клеточного деления лежит в основе антипролиферативной активности исследованных siРНК.

**Пролиферация клеток линий KB-3-1, SK-N-MC и MCF-7 после восстановления исходного уровня экспрессии генов *c-Myc*, *Her2*, *CCNB1* и *PKC*.** Зависимость скорости пролиферации клеток KB-3-1, SK-N-MC и

MCF-7 от уровня экспрессии генов *Her2*, *CCNB1* и *PKC* оценивали с помощью МТТ-теста в период с 7 по 12 день после трансфекции соответствующей siРНК (200 нМ), принимая скорость пролиферации клеток в контрольных образцах за 100% (Табл. 6).

**Таблица 6.** Скорость деления клеток KB-3-1, SK-N-MC, MCF-7 после восстановления исходного уровня экспрессии генов-мишеней

siРНК, 200 нМ	Скорость пролиферации*, %		
	KB-3-1	SK-N-MC	MCF-7
Контроль**	100±7	100±6	100±3
siScr	113±10	90±7	93±6
siHer	123±8	36±9	78±2
siCyc	112±9	14±4	73±2
siPKC	117±14	9±3	79±2

\*Представлены средние значения по результатам трех независимых экспериментов ± стандартное отклонение.

\*\*Клетки, обработанные только трансфектантом.

Показано, что скорость пролиферации клеток линии KB-3-1 после восстановления исходных уровней экспрессии генов-мишеней (*Her2*, *CCNB1*) практически не отличается от скорости пролиферации контрольных клеток. После трансфекции siHer скорость деления клеток SK-N-MC и MCF-7 в интервале 7 – 12 суток составляла 36 и 78% от уровня в контроле, соответственно. Скорость пролиферации клеток SK-N-MC и MCF-7, обработанных siCyc, оставалась на уровне 14 и 73%, а клеток, подвергнутых действию siPKC – 9 и 79% от уровня в контроле, соответственно (Табл. 6). Как видно из Табл. 6, использованные клеточные линии можно условно разделить на три группы: клетки, скорость пролиферации которых полностью восстанавливается (KB-3-1); скорость пролиферации которых остается значительно сниженной (SK-N-MC); и клетки, скорость пролиферации которых остается незначительно сниженной после восстановления исходного уровня мРНК генов-мишеней. Вероятно, временное подавление экспрессии генов *Her2*, *CCNB1*, *PKC* не приводит к необратимым изменениям в регуляторных системах клеток KB-3-1, поэтому при восстановлении уровней мРНК этих генов восстанавливается скорость их пролиферации. В культуре клеток SK-N-MC временное выключение экспрессии генов *Her2*, *CCNB1* и *PKC* приводит к значительному замедлению деления клеток, даже после восстановления исходного уровня мРНК генов-мишеней (Табл. 6). Выраженный антипролиферативный эффект (5–10 раз) кратковременного выключения экспрессии этих генов сохраняется до 12 суток инкубации, причем антипролиферативный эффект ингибирования экспрессии генов *CCNB1* и *PKC* существенно выше эффекта, обусловленного

siHer. Длительное антипролиферативное действие siPKC на клетки SK-N-MC является довольно неожиданным, поскольку в этих клетках не наблюдается гиперэкспрессия гена *PKC* (Рис. 1А). Полученные данные свидетельствуют о том, что наиболее эффективная мишень в клетках нейробластомы SK-N-MC – ген *CCNB1*, а в клетках рака молочной железы MCF-7 – ген *PKC*, эти гены можно рассматривать как перспективные терапевтические мишени для препаратов, предназначенных для лечения нейробластом и рака молочной железы.

Аналогичное исследование мы выполнили на клетках KB-3-1 и SK-N-MC после трансфекции длинными дцРНК dsMyc, dsEGFP (0.005 мкг/мл) и 0.05 мкг/мл poly(I:C) (Табл. 7). Показано, что в интервале 7 – 12 суток после трансфекции 0.005 мкг/мл dsMyc скорость пролиферации клеток KB-3-1 уменьшена до 55% от контрольной, а SK-N-MC – до 20%. Через 7 – 12 дней после трансфекции 0.005 мкг/мл dsEGFP, а также после 0.05 мкг/мл poly(I:C) скорость деления KB-3-1 восстанавливается до скорости в контроле.

**Таблица 7.** Скорость деления клеток KB-3-1 и SK-N-MC в интервале 7 – 12 дней после трансфекции 0.005 мкг/мл dsMyc, dsEGFP и 0.05 мкг/мл poly(I:C)

дцРНК	Скорость пролиферации*, %	
	KB-3-1	SK-N-MC
Контроль**	100±3	100±7
dsMyc, 0.005 мкг/мл	55±4	21±3
dsEGFP, 0.005 мкг/мл	94±4	46±4
poly(I:C), 0.05 мкг/мл	95±2	13±2

\*Представлены средние значения по результатам трех независимых экспериментов ± стандартное отклонение. \*\*Клетки, обработанные только трансфектантом.

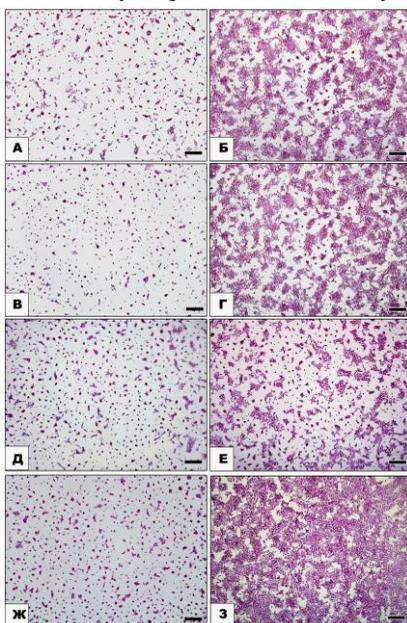
Скорость деления SK-N-MC остается сниженной, соответственно, до 46 и 13% от контроля. dsEGFP, при сравнимом антипролиферативном эффекте на обеих клеточных линиях через 1 – 5 дней после трансфекции, оказывает более длительное антипролиферативное действие на клетки SK-N-MC. Длительность антипролиферативного действия poly(I:C) на клетки SK-N-MC сопоставима с длительностью действия siРНК, однако проявляется только при высокой концентрации.

**Влияние ингибирования экспрессии генов *CCNB1* и *PKC* на морфологические характеристики клеток линии SK-N-MC.** Поскольку наиболее сильный антипролиферативный эффект наблюдается при ингибировании экспрессии *CCNB1* и *PKC* в культуре клеток SK-N-MC (Табл. 4, 6), то мы провели микроскопическое изучение морфологии этих клеток после воздействия 200 нМ siCyc и siPKC. Установлено, что культура SK-N-MC, обработанная олигофектаминол (контроль), через 24 ч инкубации представлена разными типами клеток: “островные”, распластанные

нейроноподобные, веретеновидные клетки. При одинаковой посевной дозе за 3 дня инкубации контрольные клетки культуры и клетки трансфицированные siScr, практически полностью заполняли площадь стекла, тогда как трансфекция siCus и siPKC резко замедляла размножение клеток, их число на стекле в это же время было несравнимо меньше (**Рис. 4**). Также наблюдалось резкое уменьшение числа митозов в клетках (**Табл. 8**). Даже через 12 дней после трансфекции siCus количество клеток на стеклах было существенно меньше, чем в контроле через 3 дня после трансфекции. Количество клеток на стекле через 12 дней после трансфекции siPKC превышало их количество после трансфекции siCus. Таким образом, результаты микроскопического изучения клеток SK-N-MC после трансфекции этими siРНК согласуются с данными по их влиянию на скорость пролиферации этих клеток.

Изучение морфологии клеток SK-N-MC через 3 – 12 дней после трансфекции показало, что временное ингибирование экспрессии генов *CCNB1* и *PKC* не приводит к их гибели или терминальной дифференцировке, на что указывает сохранение разных типов клеток в популяции, а приводит к задержке клеточного деления.

Постепенное увеличение к 10 – 12 суток инкубации суммарного количества клеток в препаратах, трансфицированных специфическими siРНК, и клеток в стадии митоза (**Табл. 8**), в частности, указывает на то, что длительность антипролиферативного действия этих siРНК в клетках SK-N-MC, по-видимому, ограничена 12 – 15 сутками.



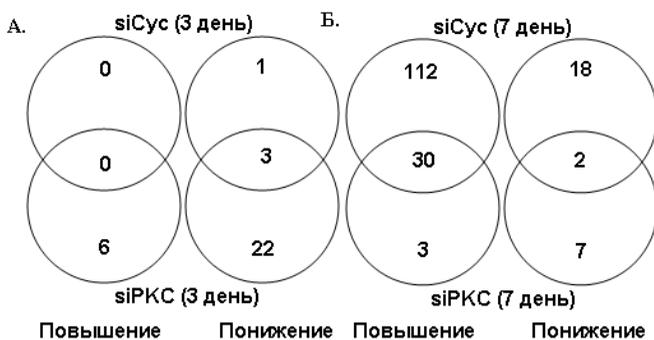
**Рис. 4.** Клетки нейробластомы SK-N-MC на стекле (тотальные препараты). Контрольные клетки (обработка только трансфектантом): **А** - 1 сутки инкубации, **Б** - 3 суток инкубации. Трансфекция 200 нМ siScr: **В** - 1 сутки инкубации, **Г** - 3 сутки инкубации. Трансфекция siCus: **Д** - 3 суток инкубации, **Е** - 12 суток инкубации. Трансфекция siPKC: **Ж** - 3 суток инкубации, **З** - 12 суток инкубации. Окраска гематоксилином. Длина масштабной линии 200 мкм.

**Таблица 8.** Количество клеток SK-N-MC в фазе митоза через 1 – 12 суток после трансфекции siCyc и siPKC (200 нМ)

Дни	Количество митозов на 1000 клеток				
	Контроль*	siScr	siCyc	siPKC	Контроль без трансфектанта
1	14 ± 5	16 ± 8	-	-	-
2	40 ± 16	25 ± 7	-	-	22 ± 15
3	21 ± 10	33 ± 12	15 ± 11	16 ± 7	-
5	-	-	30 ± 12	20 ± 11	-
7	-	-	28 ± 6	35 ± 5	-
12	-	-	30 ± 6	49 ± 14	-

\* Клетки, обработанные только трансфектантом. (-) – не определяли.

**Полногеномный анализ экспрессии генов на микрочипах в клетках SK-N-MC после подавления экспрессии генов *CCNB1* и *PKC*.** Для более детального изучения антипролиферативного действия исследуемых siРНК siCyc и siPKC был выполнен полногеномный анализ экспрессии генов в клетках SK-N-MC с использованием микрочипов. При сравнении профиля генной экспрессии в клетках SK-N-MC через 3 и 7 дней после трансфекции 200 нМ siCyc и siPKC, с целью выявить общие гены, экспрессия которых одновременно повышается либо понижается после обработки этими siРНК, было выявлено 3 гена экспрессия которых понижается на 3 день и 2 гена – на 7-й день, а также 30 общих транскриптов, уровень которых оказался повышен через 7 дней после трансфекции как siCyc, так и siPKC (**Рис. 5**).



**Рис. 5.** Сравнение профилей генной экспрессии в клетках SK-N-MC через 3 дня (А) и 7 дней (Б) после трансфекции 200 нМ siCyc и siPKC, нормированных на контрольные клетки.

Анализ распределения этих транскриптов по функциональным категориям генов показал, что они участвуют в таких важных клеточных процессах, как метаболизм, апоптоз и транспорт ионов (Табл. 9).

Изучение регуляторных схем, в которых участвуют выявленные гены, показало, что изменение экспрессии *ENO2* – известного маркера нейрональной дифференцировки участвующего в метаболизме глюкозы, а также экспрессии *AK3L1* – регулятора метаболизма пуриновых нуклеотидов, могут быть факторами, замедляющими клеточное деление после восстановления экспрессии генов-мишеней siРНК. Анализ показал, что наибольшее изменение уровня экспрессии через 7 дней после трансфекции siРКС и siСус наблюдается для генов, кодирующих: альдозазу С – участника метаболизма сахаров в клетках мозга; *DDIT4*, *TXNIP* и *BNIP3* – регуляторов апоптоза и клеточного цикла.

Таким образом, проведенный транскрипционный анализ генов в клетках SK-N-МС, после трансфекции 200 нМ siСус и siРКС, выявил изменения в уровнях экспрессии генов, которые также косвенно могут быть причастны к антипролиферативному действию исследуемых siРНК.

**Таблица 9.** Распределение по функциональным категориям генов, экспрессия которых увеличена по сравнению с контролем ( $P < 0.01$ ) в клетках SK-N-MC, через 7 дней после трансфекции, как 200 нМ siCyc так и siPKC

Ген	Функция	Категория
<i>ALDOC</i>	Фруктозо-дифосфат альдолаза; гликолиз, глюконеогенез, пентозо-фосфатный путь, метаболизм фруктозы и маннозы	Метаболизм
<i>ACSS2</i>	Ацетил-СоА синтаза; гликолиз, глюконеогенез, метаболизм пировиноградной и пропановой кислот	
<i>PFKFB4</i>	6-Фосфо-фрукто-2-киназа, фруктозо-2,6-бифосфатаза; метаболизм глюкозы, фруктозы и маннозы	
<i>ENO2</i>	Енолаза; гликолиз, глюконеогенез, метаболизм глюкозы	
<i>HK1</i>	Гексокиназа; синтез углеводов	
<i>INSIG1</i>	Регуляция концентрации холестерина в клетке	
<i>HMGCS1</i>	3-гидрокси-3-метилглутарил-СоА синтаза; синтез холестерина	
<i>TM7SF2</i>	Синтез стероидов, холестерина	
<i>FADS2</i>	Синтез ненасыщенных жирных кислот	
<i>ACLY</i>	АТР-цитрат лиаза, синтез липидов, цикл лимонной кислоты	
<i>AK3L1</i>	Аденилат киназа; метаболизм пуринов и пуриновых нуклеотидов	
<i>CYP4F22</i>	Моноксигеназа, цитохром P450	
<i>SLC16A3</i>	Трансмембранный транспортер монокарбоксильных жирных кислот	Метаболизм, транспорт
<i>SLC2A3</i>	Трансмембранный транспортер глюкозы	
<i>SLC2A1</i>	Транспорт глюкозы	
<i>CCDC155</i>	Связывание ионов $Ca^{2+}$	Транспорт
<i>LITAF</i>	Позитивная регуляция путей I-кВ киназы и NF-кВ	Апоптоз
<i>BNIP3L</i>	Защитный противовирусный ответ, апоптоз	
<i>BNIP3</i>	Индукция апоптоза	
<i>TXNIP</i>	Индукция апоптоза; клеточный цикл	
<i>DDIT4</i>	Связывание белков семейства 14-3-3	
<i>TPT1</i>	Ингибирование апоптоза, гомеостаз $Ca^{2+}$	

## ВЫВОДЫ

1. Разработаны siРНК (siHer, siCyc, siPKC), направленные к мРНК генов *Her2*, *CCNB1* и *PKC*. Показано, что данные siРНК специфично ингибируют экспрессию генов-мишеней в клетках KB-3-1, SK-N-MC, MCF-7 и HL-60: наибольшее снижение уровня мРНК-мишеней (до 10 – 20% от контроля) достигается через 3 суток после трансфекции, а исходный уровень экспрессии восстанавливается через 7 суток.
2. Показано, что ингибирование экспрессии генов *Her2*, *CCNB1* и *PKC* с разной эффективностью замедляет деление клеток KB-3-1, SK-N-MC, MCF-7, однако не влияет на пролиферацию клеток HL-60. Обнаружено, что наиболее выраженный антипролиферативный эффект наблюдается в клетках нейробластомы SK-N-MC под действием siCyc, а рост клеток MCF-7 наиболее эффективно тормозится под действием siPKC. Сравнение антипролиферативного действия siРНК, направленных к мРНК генов *Her2*, *CCNB1* и *PKC*, на опухолевые клетки различного происхождения выполнено впервые.
3. Получены дцРНК, гомологичные мРНК генов *c-Myc* (dsMyc) и *GFP* (dsEGFP) длиной 473 и 448 п.н., соответственно. Показано, что препарат dsMyc, действующий как по механизму РНК-интерференции, так и через индукцию интерферонового ответа, снижает уровень экспрессии интерферон-чувствительного гена *c-Myc* более эффективно, чем препарат dsEGFP, действующий только по пути индукции интерферонового ответа. При этом оба препарата дцРНК со сравнимой эффективностью замедляют деление клеток KB-3-1 и SK-N-MC.
4. Впервые изучено изменение скорости пролиферации исследованных клеточных линий после восстановления экспрессии генов *Her2*, *CCNB1* и *PKC*. Показано, что скорость деления клеток KB-3-1 восстанавливается после достижения исходного уровня экспрессии генов-мишеней, в то время как скорость деления SK-N-MC остается в 3 – 10 раз сниженной до 12 суток после воздействия siHer, siCyc и siPKC, а также длинных дцРНК.
5. Показано, что введение в клетки siРНК, направленных к мРНК генов *Her2*, *CCNB1* и *PKC* не вызывает гибели клеток, а подавляет их деление, что подтверждается данными морфологического анализа. Напротив, доля мертвых клеток в популяции, трансфицированной длинной дцРНК значительно увеличивается, что связано с индукцией интерферонового ответа и вызванной им гибелью клеток.

6. С помощью полногеномного анализа транскриптома клеток SK-N-MC, трансфицированных siCyc и siPKC, обнаружено, что после восстановления экспрессии генов-мишеней, экспрессия определенных генов (*ENO2*, *AK3L1*, *ALDOC*, *TXNIP*, *BNIP*, *DDIT4* и др.) остается измененной, что может обуславливать длительное антипролиферативное действие исследуемых siРНК в этой клеточной линии.

**Основные результаты диссертации опубликованы в следующих работах:**

1. Akimov I.A., Kabilova T.O., Vlassov V.V., Chernolovskaya E.L. Inhibition of human cancer-cell proliferation by long double-stranded RNAs. // *Oligonucleotides*. –2009. –V. 19. –P. 31–40.
2. Акимов И.А., Черноловская Е.Л. Подавление экспрессии генов *CCNB1*, *Her2* и *PKC* с помощью малых интерферирующих РНК с разной эффективностью замедляет деление раковых клеток человека различного происхождения. // *Молекулярная Биология*. –2010. –Т. 44. –С. 98–106.
3. Акимов И.А., Черноловская Е.Л., Спицына Ю.Е., Рябчикова Е.И., Зенкова М.А. Подавление экспрессии генов *Her2*, *CCNB1* и *PKC* с помощью siРНК снижает скорость пролиферации клеток нейробластомы человека на длительное время. // *Acta Naturae*. –2011. –Т. 3. –С. 31–41.