

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).

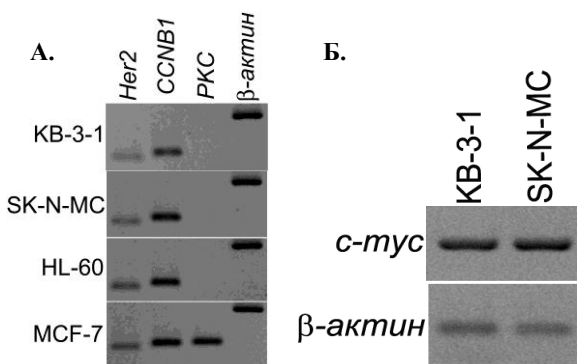


Рис. 1. А. Уровни мРНК генов *Her2*, *CCNB1* и *PKC* в клетках линий KB-3-1, SK-N-MC, MCF-7 и HL-60. Б. Уровни мРНК гена *c-Мус* в клетках линий KB-3-1 и SK-N-MC. Продукты реакции ОТ-ПЦР разделяли методом электрофореза в 1.5% агарозном геле и детектировали с помощью окрашивания бромистым этидием.

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> CA <u>G</u> GU <u>AU</u> -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> U <u>C</u> UCUUCUUUUU-5`	1080 – 1100 н. мРНК <i>PKC</i>
siScr	5`- <u>C</u> AAGUCUCG <u>U</u> A <u>U</u> GU <u>A</u> GU <u>G</u> UU-3` 3`-UU <u>G</u> U <u>C</u> AGAGCA <u>U</u> A <u>C</u> A <u>U</u> CA <u>C</u> -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 β -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

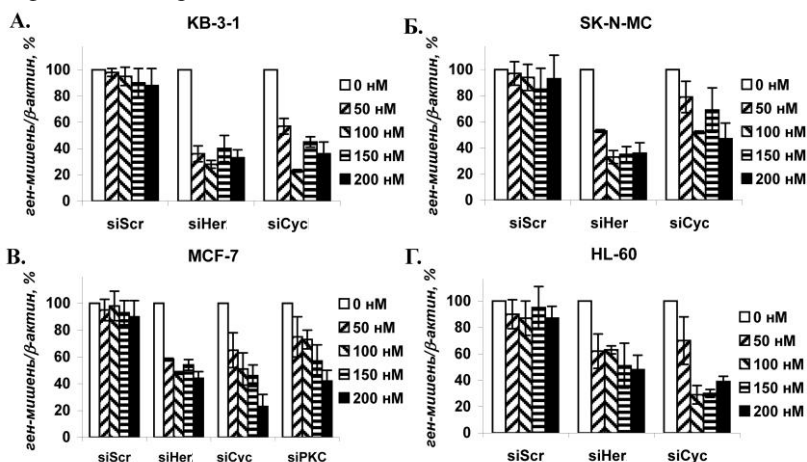


Рис. 2. Подавление экспрессии генов *Her2*, *CCNB1* и *PKC* в клетках KB-3-1 (А), SK-N-MC (Б), MCF-7 (В) и HL-60 (Г) через 48 ч после трансфекции siРНК в концентрации от 50 до 200 нМ. Представлено среднее значение ± стандартное отклонение, рассчитанное по результатам трех независимых экспериментов. Относительную экспрессию генов-мишеней определяли как отношение уровня их мРНК к уровню мРНК β -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 β -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
Контроль**	100 ±5	100 ±1	100 ±3	100 ±3
siScr, 50 нМ / 0.668 мкг/мл	89 ±2	105 ±5	94 ±4	99 ±2
siScr, 200 нМ / 2.671 мкг/мл	90 ±2	68 ±2	92 ±3	101 ±1
siHer, 50 нМ, 0.665 мкг/мл	84 ±8	93 ±4	82 ±5	97 ±2
siHer, 200 нМ / 2.661 мкг/мл	75 ±9	79 ±1	65 ±1	100 ±4
siCycс, 50 нМ / 0.666 мкг/мл	75 ±2	82 ±4	77 ±3	99 ±2
siCycс, 200 нМ / 2.663 мкг/мл	61 ±4	4 ±2	53 ±4	98 ±4
siPKC, 50 нМ / 0.668 мкг/мл	-	-	57 ±3	-
siPKC, 200 нМ / 2.672 мкг/мл	-	-	11 ±2	-
siEx3, 50 нМ / 0.668 мкг/мл	90 ±3***	95 ±2***	68 ±2	80 ±5
siEx3, 200 нМ / 2.672 мкг/мл	2 ±1***	46 ±3***	20 ±5	37 ±3
dsMyc, 0.017 нМ / 0.005 мкг/мл	14 ±5	3 ±2	-	-
dsMyc, 0.164 нМ / 0.05 мкг/мл	0 ±1	7 ±3	-	-
dsEGFP, 0.017 нМ / 0.005 мкг/мл	0 ±2	9 ±7	0 ±3	102 ±4
dsEGFP, 0.174 нМ / 0.05 мкг/мл	0 ±1	9 ±5	0 ±2	106 ±7
poly(I:C), 0.005 мкг/мл	104 ±7	112 ±3	53 ±4	101 ±3
poly(I:C), 0.05 мкг/мл	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 снижался 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 siHer₂, 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.

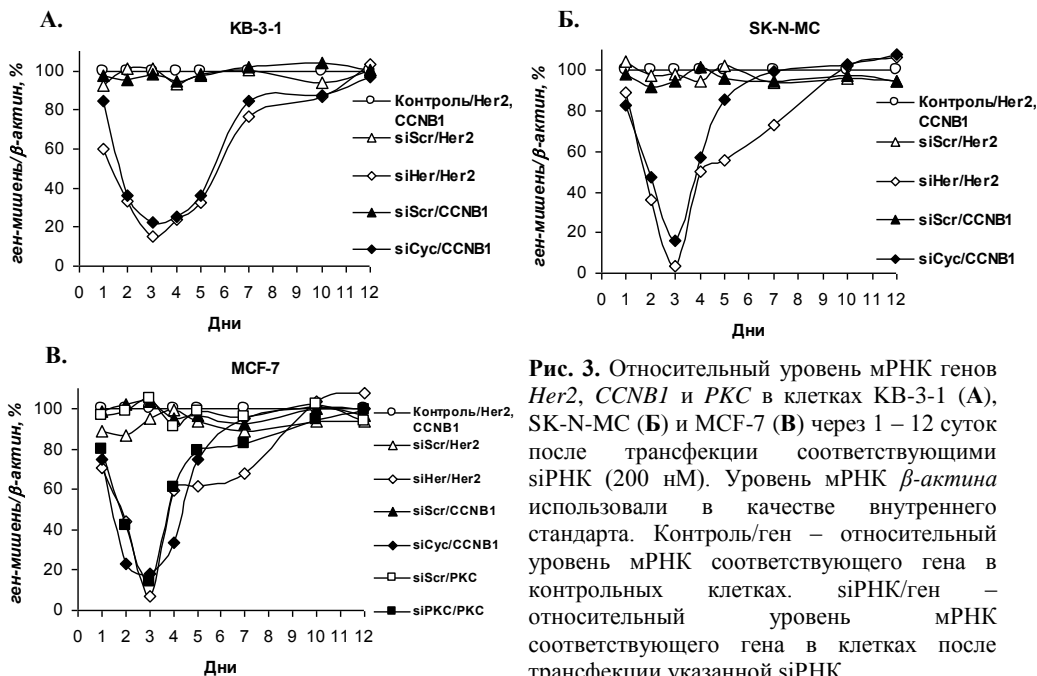


Рис. 3. Относительный уровень мРНК генов *Her2*, *CCNB1* и *PKC* в клетках KB-3-1 (А), SK-N-MC (Б) и MCF-7 (В) через 1 – 12 суток после трансфекции соответствующими siРНК (200 нМ). Уровень мРНК β -актина использовали в качестве внутреннего стандарта. Контроль/ген – относительный уровень мРНК соответствующего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

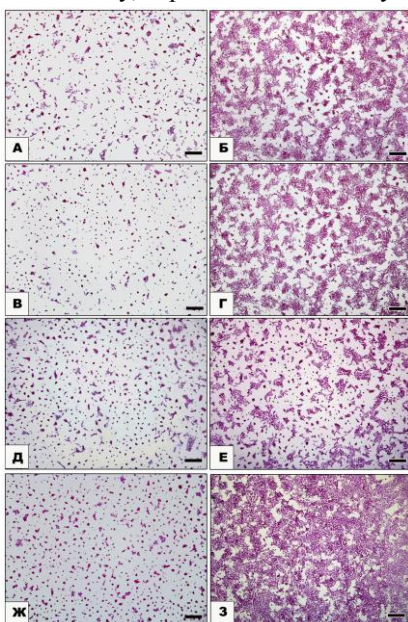


Рис. 4. Клетки нейробластомы SK-N-MC на стекле (тотальные препараты). Контрольные клетки (обработка только трансфектантом): **А** - 1 сутки инкубации, **Б** - 3 суток инкубации. Трансфекция 200 нМ siScr: **В** - 1 сутки инкубации, **Г** - 3 сутки инкубации. Трансфекция siCus: **Д** - 3 суток инкубации, **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**).

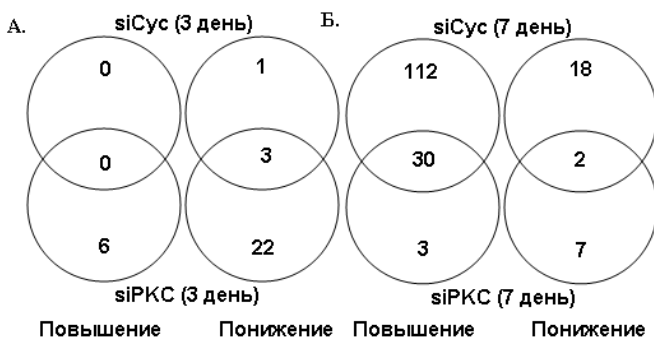


Рис. 5. Сравнение профилей генной экспрессии в клетках SK-N-MC через 3 дня (А) и 7 дней (Б) после трансфекции 200 нМ siCyc и siPKC, нормированных на контрольные клетки.

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-MC, 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.