

ОБРАЩЕНИЕ ФЕНОТИПА МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ РАКОВЫХ КЛЕТОК С ПОМОЩЬЮ siРНК

Е.Б. Логашенко, А.А. Волков, Е.Л. Черноловская, М.А. Зенкова, В.В. Власов

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия,
e-mail: evg_log@niboch.nsc.ru

Малые интерферирующие РНК (siРНК) являются мощным инструментом для специфического подавления генной экспрессии. Однако эффективность действия siРНК может быть ограничена при использовании их для подавления экспрессии генов, характеризующихся высокой стабильностью кодируемых мРНК и белков. Именно таким является ген *mdr1*, кодирующий трансмембранный белок Р-гликопротеин, относящийся к семейству ABC транспортеров, активация которого связана с возникновением множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) некоторых раковых клеток. В настоящем обзоре рассмотрены работы авторов и других исследователей, посвященные обращению фенотипа МЛУ с помощью siРНК.

Несмотря на безусловные успехи современной противоопухолевой химиотерапии, проблема повышения эффективности лечения онкологических больных по-прежнему остается актуальной. Современные противоопухолевые препараты, а также их комбинации, используемые в схемах полихимиотерапии, характеризуются высокой токсичностью. Однако помимо высокой токсичности цитостатиков, которая ограничивает проведение адекватной химиотерапии, серьезным препятствием в достижении желаемого эффекта терапии является лекарственная устойчивость опухолей (Gottesman *et al.*, 2002).

Один из наиболее распространенных типов устойчивости – множественная лекарственная устойчивость (МЛУ), когда появление устойчивости к одному из цитостатиков сопровождается невосприимчивостью клеток опухоли к другим лекарствам, отличающимся по структуре и механизму действия. Лекарственная устойчивость опухолевых клеток обеспечивается несколькими механизмами, включающими в себя, например, участие транспортных белков, функционирующих за счет энергии АТФ (ABC-транспортеры, АТР-binding cassette (ABC

transporters). К семейству этих белков относятся: белок Р-гликопротеин (P-gp) (Gottesman *et al.*, 2002), MRP (белок, ассоциированный с множественной лекарственной устойчивостью) (Cole *et al.*, 1992; Kruh *et al.*, 2003), а также LRP и BCRP (белки, ассоциированные с устойчивостью рака легкого и рака молочной железы соответственно) (Doyle *et al.*, 1998; Doyle, Ross, 2003; Kitazono *et al.*, 1999; Miyake *et al.*, 1999). К другим механизмам лекарственной устойчивости относятся изменения в метаболической системе и системе детоксикации в раковых клетках, нарушение активности топоизомераз и др. (Desoize *et al.*, 2000; Gottesman *et al.*, 2002). Механизмы МЛУ хорошо изучены, однако основным и наиболее часто встречающимся является Р-gp-опосредованный механизм обратного транспорта цитостатиков из опухолевых клеток, что приводит к снижению их внутриклеточной концентрации и, как результат, к уменьшению или отмене эффекта противоопухолевой терапии. Этот механизм основан на активации гена *mdr1*, кодирующего трансмембранный белок Р-gp, который относится к семейству ABC-транспортеров (Gottesman *et al.*, 2002; Ambudkar *et al.*, 2003).

К настоящему времени известен ряд соединений, которые способны ингибировать активность Р-гр и вследствие этого увеличивать внутриклеточную концентрацию химиопрепаратов и их биологическое действие на Р-гр-экспрессирующие раковые клетки как *in vitro*, так и *in vivo*. Препараты первого поколения, к числу которых относятся верапамил, циклоспорин А и резерпин, эффективны только в высоких дозах и очень токсичны. Ко второму и третьему поколению Р-гр-ингибиторов относятся PSC388 (Valspodar), GF120918, VX-710 и другие, находящиеся на различных стадиях клинических испытаний (Tan *et al.*, 2000). Ряд новых препаратов находится на стадии разработки (Fu *et al.*, 2002, 2004; Chen *et al.*, 2004a, b). К сожалению, эффективность этих соединений сложно поддается оценке вследствие сильного побочного действия, следовательно, необходимо разрабатывать более эффективную и специфическую стратегию для преодоления Р-гр-опосредованного фенотипа МЛУ. В качестве такой направленной стратегии для подавления экспрессии Р-гр может выступать использование ген-направленных соединений, адресованных к мРНК гена *mdr1* и снижающих ее уровень, таких, как антисмысловые олигонуклеотиды (Ramachandran *et al.*, 2003) и рибозимы (Nagata *et al.*, 2002).

Наиболее эффективным подходом к подавлению экспрессии генов является технология, основанная на РНК-интерференции (РНКи). РНКи – это процесс, при котором введение экзогенной двуцепочечной РНК (дцРНК) в клетку приводит к специфической деградациии гомологичной ей мРНК и подавлению экспрессии соответствующего гена. РНКи наблюдается у многих организмов – от насекомых и растений до млекопитающих (Elbashir *et al.*, 2001b). Молекулярный механизм РНКи включает в себя процессинг дцРНК под действием РНКазы III-подобной эндонуклеазы, называемой Dicer, на малые интерферирующие РНК длиной 21–23 нт (siРНК, small interfering RNA), которые затем в составе белкового комплекса RISC (RNA-induced silencing complex, РНК-зависимый ингибирующий комплекс) осуществляют деградацию мРНК мишени (Meister *et al.*,

2004). Специфическое подавление экспрессии гена может быть достигнуто с помощью химически синтезированных siРНК или siРНК, полученных ферментативно *in vitro*, а также с помощью shРНК (short hairpin RNA, короткие шпилечные РНК), экспрессирующихся в клетке с ДНК матриц, полученных с помощью ПЦР или с использованием ДНК векторов (Hannon *et al.*, 2004).

В настоящем обзоре рассмотрены работы авторов и других исследователей, посвященные обращению фенотипа МЛУ с помощью малых интерферирующих РНК.

Определение уровня подавления экспрессии гена *mdr1* под действием siРНК

Р-гр-зависимая МЛУ представляет собой сложную мишень для избирательной регуляции экспрессии генов, поскольку *mdr1* относится к числу многокопийных генов. Его экспрессия активируется в ответ на внешнее воздействие, при этом мРНК и белок характеризуются высокой стабильностью (длительным периодом полужизни). Подобные характеристики предусматривают определенный набор методов, необходимых для тестирования изменений в функционировании этого гена. Экспрессию гена можно оценивать по изменению количества мРНК и белка (с помощью методов количественного ОТ-ПЦР анализа, Нозерн-блота, Вестерн-блота), а также с помощью функциональных тестов, которые позволяют судить о приобретении или о преодолении Р-гр-опосредованной МЛУ: это изменение чувствительности клеток к цитостатикам и скорость выброса родамина из клеток (родаминовый эффлюкс).

В работе (Nieth *et al.*, 2003) с помощью ПЦР анализа в реальном времени было показано, что за 48 часов с момента трансфекции siРНК в клетки EPG85-257RDB (линия клеток рака желудка) и EPP85-181RDB (линия клеток рака поджелудочной железы) количество мРНК гена *mdr1* в них уменьшается до 10–25 % от исходного уровня. В клетках линии EPG85-257RDB уровень мРНК падал до минимального через сутки после трансфекции, а далее постепенно возрастал и через 7 суток достигал исходного

значения. В экспериментах с линией EPP85-181RDB уровень мРНК сохранялся минимальным в течение 3 суток, после чего постепенно возрастал и достигал исходного значения только к 10 суткам.

Подавление экспрессии гена *mdr1* с помощью siРНК, как правило, подтверждают путем определения количества продукта этого гена – белка Р-гр методом Вестерн-блот анализа. Наибольшее снижение уровня Р-гр обычно наблюдается через 3 суток (Nieth *et al.*, 2003; Peng *et al.*, 2004; Логашенко и др., 2005). Однако степень снижения и используемые концентрации siРНК сильно различаются. Так, в работе (Peng *et al.*, 2004) максимальный уровень подавления экспрессии Р-гр составлял 60 % при концентрации siРНК 200 нМ, а в работе (Логашенко и др., 2005) максимальный уровень подавления экспрессии Р-гр составлял 80 % при концентрации siРНК 20 нМ. Однако ни в одной из работ не удалось достичь полного подавления экспрессии, что, вероятнее всего, связано с тем, что время жизни Р-гр составляет 42–72 час. (в зависимости от клеточной линии) (Richert *et al.*, 1988; Aleman *et al.*, 2003), а также из-за кратковременного действия siРНК, связанного с ее разрушением в клетках (Tuschl, 2002; Wilda *et al.*, 2002).

Данные об активности Р-гр можно получить, используя функциональные тесты, одним из которых является восстановление чувствительности Р-гр экспрессирующих линий клеток к действию цитостатиков. В работе Nieth *et al.*, (2003) при обработке клеток siРНК в концентрации 100 нМ максимальное обращение фенотипа МЛУ составляло 87–89 % для линии клеток EPP85-181RDB и 48–58 % для линии клеток EPG85-257RDB. Такие различия в достигнутых уровнях подавления МЛУ могут быть связаны как с особенностями различных клеточных линий, так и с различной эффективностью трансфекции. В работе Wu *et al.*, (2003) было исследовано влияние siРНК на экспрессию гена *mdr1* в клетках линий MCF-7/BC19, MCF-7/AdrR и A2780Dx5 и показано лишь частичное восстановление чувствительности клеток к цитостатикам. В работе Peng *et al.*, (2004) для оценки уровня лекарственной устойчивости

и ее обращения использовали метод определения накопления DNR (даунорубин) (Den Boer *et al.*, 1999). Оказалось, что siРНК не восстанавливает чувствительность клеток линии K562/A02 до уровня материнской линии клеток K562, не обладающей фенотипом множественной лекарственной устойчивости (максимальное обращение фенотипа составляло 60 %).

Практически полное восстановление чувствительности клеток к цитостатикам было достигнуто авторами обзора (Логашенко и др., 2005). Инкубация клеток линии KB-8-5 (клетки обладают фенотипом множественной лекарственной устойчивости), обработанных siРНК, в течение 96–120 час. в среде с винбластинем вызывала концентрационно-зависимую гибель клеток. Существенное снижение количества живых клеток происходило уже при концентрации siРНК 20 нМ (50 % живых клеток через 96 час.), а при повышении концентрации siРНК до 100 нМ количество живых клеток снижалось до 30 % от исходного. При увеличении времени инкубации клеток в присутствии винбластина до 120 час. наблюдалась гибель всех клеток.

Mdr1-опосредованный фенотип МЛУ характеризуется эффективным транспортом цитотоксических препаратов из клетки, осуществляемым Р-гр. Одним из способов тестирования обращения фенотипа МЛУ является определение накопления родамина-123 в клетке, так как этот краситель является субстратом Р-гр (Christians *et al.*, 1993). Клетки, в которых содержится активный Р-гр, выводят из цитоплазмы родамин-123 в межклеточное пространство, и наоборот при подавлении экспрессии гена *mdr1* и отсутствии Р-гр родамин-123 накапливается в цитоплазме. Данные (Логашенко и др., 2005), полученные с помощью люминесцентного микроскопа и обработанные с помощью программы MetaMorph Imaging Software демонстрируют, что клетки резистентной линии KB-8-5 накапливают в 4,5 раза меньше красителя, чем клетки родительской линии KB-3-1, чувствительной к антибиотикам. Обработка клеток KB-8-5 siРНК в концентрации 20 нМ эффективно блокирует транспорт красителя из клеток и обращает фенотип МЛУ, о чем свидетельствует накопление родамина-

123 в этих клетках. Полученные количественные данные свидетельствуют о том, что после обработки резистентных клеток KB-8-5 siРНК они начинают накапливать краситель с той же эффективностью, что и клетки линии KB-3-1, не подвергнутые действию цитостатиков. Таким образом, под действием siРНК происходит эффективное подавление Р-гр-опосредованного транспорта веществ из клеток.

Влияние участка связывания siРНК на эффективность подавления экспрессии гена

Одной из главных проблем, касающихся siРНК, является выбор последовательности мишени (Naito *et al.*, 2004). Имеются различные данные о том, зависит ли эффективность РНК-интерференции от структуры РНК-мишени и/или способности интерферирующего

дц-олигорибонуклеотида образовывать с мишенью комплементарный комплекс; влияют ли на эффективность интерференции такие факторы, как сохранность siРНК в средах и сыворотках, эффективность образования RISC-комплекса с siРНК различной последовательности.

Влияние участка связывания siРНК с мРНК на эффективность подавления экспрессии гена *mdr1* человека было исследовано в работе Логащенко и др. (2005) на примере анализа пяти siРНК (табл. 1), адресованных к различным областям мРНК гена *mdr1*.

Показано, что siРНК менее чувствительна ко вторичной структуре мРНК-мишени по сравнению с антисмысловыми олигонуклеотидами. siРНК U, адресованная к нетранслируемой области мРНК гена *mdr1*, не оказывала никакого влияния на жизнеспособность клеток в присутствии винбластина даже при длительной

Таблица 1

siРНК, использованные для подавления экспрессии гена *mdr1* (GenBank № M14758)

Обозначение siРНК (si) и антисмыслового олигонуклеотида (ас)	Последовательность	Участок комплементарности	Функциональный участок в MDR1 мРНК	Эффективность подавления	
				si*, %	ас**, %
В	5' -UUCCAAGGAGCGCGAGGUCGG-3' 3' -GCAAG GUUCCUCGCGUCCAG -5'	403-423	AUG-кодон	50	40
Е	5' -AUCAUCCAUGGGGCUGGACUU-3' 3' -GGUAGU AGGUACCCCGACCUG -5'	598-618	кодирующая область	70	90
Д	5' -GGCUUGACAAGUUGUAUAUGG-3' 3' -AACCGAA CGUUCACAUAUA -5'	557-577	кодирующая область	55	0
М	5' -CUUCCGAACCGUUGUUUCUUU-3' 3' -UUGAAGGCUUGGCAACAAAGA-5'	3133-3143	кодирующая область	60	не использовали
U	5' -UGCAGACUUAAUAGUGGUGUU-3' 3' -UUACGUCUGAAUUAUACCCAC-5'	4141-4161	3' UTR район	0	не использовали
I	5' -GUGUCAGGCUUUCAGAUUUC-3' 3' -UUCACAGUCCGAAAGUCUAAA-5'		область интрона	0	не использовали

* За эффективность подавления принимали снижение количества живых клеток через 96 час. после трансфекции 100 нМ siРНК. ** За эффективность подавления принимали снижение уровня экспрессии мРНК гена *mdr1* через 24 час. после инкубации с 50 мкМ антисмысловым олигонуклеотидом (Kostenko *et al.*, 2002). Жирным шрифтом выделена последовательность, соответствующая последовательности антисмыслового олигонуклеотида.

(до 120 час.) инкубации, так же как и контрольная siРНК I. Остальные исследованные siРНК (siРНК E, siРНК D, siРНК B и siРНК M) восстанавливали чувствительность к винбластину лекарственноустойчивой линии раковых клеток человека, причем восстановление чувствительности происходило со сходной эффективностью для всех четырех siРНК, в то время как эффективность действия антисмысловых олигонуклеотидов, исследованных в работе Костенко с соавт. (2002), направленных к тем же участкам, что и siРНК, существенно отличается (табл. 1). Эти результаты свидетельствуют в пользу того, что технология подавления экспрессии генов с помощью siРНК является менее требовательной к выбору последовательности мишени в составе мРНК и гибридизационным свойствам используемых дц-олигорибонуклеотидов по сравнению с «антисмысловым» подходом.

В работе Nieth *et al.* (2003) были использованы siMDR-A и siMDR-B (гомологичные последовательностям мРНК гена *mdr1* 503-523 нт и 3050-3070 нт соответственно). Причем, siMDR-A, как и siРНК M из работы Логашенко и др. (2005) была выбрана согласно рекомендациям (Elbashir *et al.*, 2001a; Harborth *et al.*, 2001). siMDR-B была гомологична легко доступному сайту расщепления рибозимом (Holm *et al.*, 1994, 1995). Эффективность действия этих siРНК сравнивалась с эффективностью действия антисмысловых олигонуклеотидов той же последовательности – асА и асВ. Было показано, что обе siРНК подавляли экспрессию гена *mdr1* и обращали фенотип лекарственной устойчивости клеток (обращение устойчивости на 58–90 % в случае siMDR-B и 48–87 % в случае siMDR-A для разных клеточных линий), при этом асА не оказывал никакого действия, а асВ эффективно подавлял экспрессию гена *mdr1* и обращал фенотип лекарственной устойчивости. Скорее всего, вторичная структура мРНК-мишени не существенна для ее расщепления под действием siРНК. Различия в действии исследованных siРНК, по всей видимости, обуславливаются ее термодинамическими параметрами, определяющими ассиметричное включение антисмысловой цепи siРНК в состав комплекса RISC (Aronin, 2006), так как показано (Khvorova *et*

al., 2003), что siРНК, характеризующиеся меньшей термостабильностью дуплекса со стороны 5'-конца антисмысловой цепи, обладают большей эффективностью действия.

Влияние химических модификаций siРНК на эффективность действия

Одной из основных проблем использования siРНК для подавления экспрессии терапевтически значимых генов является недостаточная длительность эффекта интерференции, которая связана с деградацией siРНК под действием клеточных рибонуклеаз. Как правило, после однократной трансфекции клеток siРНК снижение концентрации мРНК-мишени в клетке наблюдается в течение 2–4 суток, а затем уровень этой мРНК постепенно восстанавливается (Holen *et al.*, 2002; Tuschl, 2002; Tuschl, Borkhardt, 2002). Внесение химических модификаций, направленных на увеличение устойчивости рибоолигонуклеотидов к действию рибонуклеаз, может существенно увеличить стабильность siРНК в клетке и, следовательно, увеличить длительность вызываемого ею эффекта и улучшить фармакокинетические свойства siРНК *in vivo*. Кроме того, определенные химические модификации могут облегчить проникновение siРНК в клетки различных видов. Сравнение эффективности действия химически модифицированных siРНК позволило установить факторы, обеспечивающие активность препаратов: 1) для сохранения биологической активности модифицированный олигорибонуклеотид должен сохранять А-форму спирали и структуру большой бороздки (Parrish *et al.*, 2000); 2) наличие 2'-ОН не является обязательным для проявления активности (Chiu, Rana, 2003); 3) 5'-конец антисмысловой цепи дуплекса не должен быть модифицирован (Chiu, Rana, 2003).

В работах Логашенко и др. (2005, 2006) для защиты от рибонуклеаз рибонуклеотиды siРНК E заменяли 2'-О-метилированными аналогами, а для защиты от действия 3'-экзонуклеаз 3'-концы siРНК E были модифицированы путем введения 3'-3' инвертированной связи (рис. 1).

Было показано, что замена всех рибонуклеотидов siРНК 2'-О-метилированными аналогами

(siРНК Em) существенно замедляет деградацию siРНК, а введение в siРНК 3'-3' инверсии не приводит к увеличению их нуклеазоустойчивости. Изучение характера расщепления siРНК в среде с сывороткой позволяет сделать вывод о том, что деградация siРНК происходит под действием эндо-, а не экзонуклеаз. Следует отметить, что в siРНК E основными нуклеазочувствительными сайтами оказались UpG и CpA мотивы (рис. 2), фосфодиэфирные связи, в которых с наибольшей скоростью расщепляются рибонуклеазами семейства РНКазы А (Findlay *et al.*, 1961).

Также было показано, что модификация siРНК может приводить к изменению характера расщепления. Так, при замене всех звеньев в смысловой цепи siРНК на 2'-О-метилированные аналоги наблюдается исчезновение в антисмысловой цепи нуклеазочувствительных сайтов C⁷pA⁸, U⁹pG¹⁰ (рис. 2), что, возможно, связано с неспособностью эндорибонуклеаз эффективно связываться с дуплексом, а также «плавить» цепи с образованием одноцепочечных участков, а для дуплекса siРНК Ei, содержащего частичную модификацию (3'-3'-инверсию и два 2'-О-метильные звенья в 3'-выступающих концах)

Обозначение siРНК	Последовательность
E	5'-AUCAUCCAUGGGGCGUGACUU-3' 3'-GGUAGUAGGUACCCCGACCUG-5'
Ei	5'-AUCAUCCAUGGGGCGUGACU ^m U ^m Tinv-3' 3'-TinvG ^m G ^m UAGUAGGUACCCCGACCUG-5'
Em	5'-A ^m U ^m C ^m A ^m U ^m C ^m A ^m U ^m G ^m G ^m G ^m G ^m C ^m U ^m G ^m G ^m A ^m C ^m U ^m U ^m -3' 3'-G ^m G ^m U ^m A ^m G ^m U ^m A ^m G ^m G ^m U ^m A ^m C ^m C ^m C ^m G ^m A ^m C ^m C ^m U ^m G ^m -5'

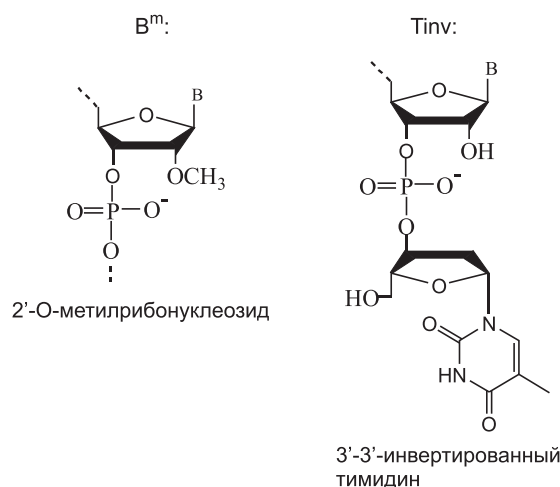


Рис. 1. Последовательности siРНК, использованных для подавления экспрессии гена *mdr1*, и использованные химические модификации.

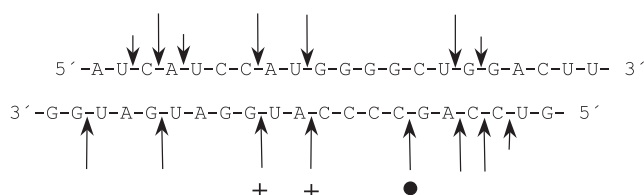


Рис. 2. Суммарная схема распределения нуклеазочувствительных сайтов siРНК E и ее модифицированных аналогов. Стрелками указаны расщепляемые связи, величина стрелок отражает интенсивность расщепления конкретной связи; + – сайты, не подвергавшиеся расщеплению в составе siРНК Em; ● – сайт, подвергавшийся расщеплению только в составе siРНК Ei.

был выявлен дополнительный сайт расщепления G⁶pC⁷ (рис. 2). Этот же дуплекс обладал наибольшей биологической активностью, несмотря на то, что время его полужизни меньше по сравнению с немодифицированным.

Эти данные согласуются с данными, полученными в работах (Elbashir *et al.*, 2001a, b, c; Hoken *et al.*, 2002), в которых было показано, что включение модификаций в 3'-выступающие концы не снижает биологической активности siРНК. Таким образом, эффективность действия исследованных siРНК определяется не только временем их жизни в культуральной среде.

В клинической практике даже двукратное или трехкратное уменьшение устойчивости раковых клеток к действию препарата уже является достаточным для повышения эффективности противораковой терапии. Таким образом, даже временный эффект от применения анти-*mdr1* siРНК может оказаться эффективным для обращения лекарственной устойчивости при лечении раковых больных. Полученные в работе Логашенко и др. (2005) результаты показывают, что временное подавление экспрессии гена *mdr1* обеспечивает накопление химиопрепаратов в клетках в концентрации, необходимой для их гибели. Исследование кинетики снижения количества живых клеток KB-8-5 после трансфекции различными siРНК и винбластина показало, что уже однократная обработка клеток siРНК E_i приводила к гибели всех клеток в течение 5 суток даже при концентрации винбластина в 30 раз ниже ранее переносимой.

Продолжительность ингибирующего действия siРНК исследовали путем определения количества продукта этого гена – белка Р-гр в клетках, обработанных siРНК E и siРНК E_i. Поскольку под действием этих siРНК в присутствии винбластина количество клеток снижалось к 5-м суткам практически до нуля, для определения уровня Р-гр клетки инкубировали с siРНК в среде, не содержащей цитостатик. Оказалось, что в этих условиях количество Р-гр снижается даже в клетках, не обработанных siРНК, что говорит о восстановлении клетками нормального фенотипа в отсутствие цитостатика. Однако под воздействием siРНК на 4-е сутки (время, когда

наблюдается гибель клеток в среде с винбластином) количество Р-гр в клетках, трансфицированных siРНК E и siРНК E_i, было в два раза ниже, чем в контрольных клетках. Сопоставление этих данных с данными МТТ анализа показывает, что гибель клеток в присутствии ранее переносимых и даже сниженных концентраций винбластина, наблюдаемая после обработки siРНК, коррелирует со снижением уровня Р-гр. Таким образом, наблюдаемое снижение уровня Р-гр в раковых клетках можно рассматривать как терапевтически значимое.

Проведенные исследования показали, что эффективное биологическое действие siРНК не всегда напрямую коррелирует с ее нуклеазоустойчивостью. Синтезированный в (Логашенко и др., 2005) химически модифицированный дуплекс E_i, несмотря на относительно низкую нуклеазоустойчивость, уже после однократного введения вызывает длительное (до 5 суток) снижение уровня экспрессии гена *mdr1* и эффективно обращает фенотип множественной лекарственной устойчивости, что позволяет рассматривать его в качестве основы терапевтических препаратов для комбинированной химиотерапии раковых заболеваний.

Заключение

Разработанные anti-*mdr1* siРНК эффективно ингибируют экспрессию *mdr1* мРНК и обращают фенотип Р-гр-опосредованной лекарственной устойчивости раковых клеток. Полученные данные показывают, что siРНК могут рассматриваться как основа терапевтических препаратов для повышения эффективности химиотерапии раковых заболеваний, так как их использование имеет несколько очевидных преимуществ. Во-первых, высокая специфичность действия, способная обеспечить аллель-специфичное подавление экспрессии гена, которая была продемонстрирована при подавлении экспрессии генов, ответственных за возникновение некоторых раковых и неврологических заболеваний (Brummelkamp *et al.*, 2002; Ding *et al.*, 2003; Gonzalez-Alegre *et al.*, 2003; Miller *et al.*, 2003). Во-вторых, эффективность действия siРНК значительно выше, чем у антисмы-

словых олигонуклеотидов (Achenbach *et al.*, 2003). И, в-третьих, поиск эффективных мишеней для РНКи менее затруднителен, чем в случае антисмысловых олигонуклеотидов (Grunweller *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2003) и рибозимов (Scherer *et al.*, 2003).

Однако для успешного применения siРНК в клинической практике необходимо разработать более эффективные методы доставки, способные увеличить время жизни siРНК *in vivo* и повысить эффективность проникновения в клетки. Чтобы облегчить проникновение siРНК в клетку через липопротеиновые рецепторы, в большом количестве присутствующие на поверхности клеточной мембраны, было предложено (Soutschek *et al.*, 2004) присоединить холестерин к 3'-концу антисмысловой цепи. Недавно был предложен метод доставки siРНК с помощью белковых векторов, состоящих из специальных антител и siРНК-связывающего домена, представленного протамином (F105-P) (Song *et al.*, 2005). Было показано, что такой белковый вектор, образуя комплекс с siРНК, способен осуществлять селективную доставку siРНК в клетки, экспрессирующие поверхностные белки, опознающиеся антителом. Такая высокоспецифическая доставка позволяет снизить используемую концентрацию siРНК и, как следствие, потенциальные побочные эффекты в здоровых тканях организма.

Работа выполнена при финансовой поддержке программ фундаментальных исследований РАН «Фундаментальные науки – медицине», «Молекулярная клеточная биология»; интеграционных проектов СО РАН № 20, № 5.10.

Литература

- Логашенко Е.Б., Владимирова А.В., Волков А.А. и др. Подавление экспрессии гена *MDR1* с помощью химически модифицированных аналогов siРНК // Изв. РАН. Сер. химич. 2005. Вып. 5. P. 1260–1267.
- Логашенко Е.Б., Владимирова А.В., Зенков А.Н. и др. Обращение фенотипа множественной лекарственной устойчивости с помощью малых интерферирующих РНК // Изв. РАН. Сер. химич. 2006 (в печати).
- Achenbach T.V., Brunner B., Heermeier K. Oligonucleotide-based knockdown technologies: antisense versus RNA interference // *Chembiochem*. 2003. V. 4. № 10. P. 928–935.
- Aleman C., Annereau J.P., Liang X.J. *et al.* P-glycoprotein, expressed in multidrug resistant cells, is not responsible for alterations in membrane fluidity or membrane potential // *Cancer Res*. 2003. V. 63. № 12. P. 3084–3091.
- Ambudkar S.V., Kimchi-Sarfaty C., Sauna Z.E., Gottesman M.M. P-glycoprotein: from genomics to mechanism // *Oncogene*. 2003. V. 22. № 47. P. 7468–7485.
- Aronin N. Target selectivity in mRNA silencing // *Gene Ther*. 2006. V. 13. № 6. P. 509–516.
- Brummelkamp T.R., Bernards R., Agami R. Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference // *Cancer Cell*. 2002. V. 2. № 3. P. 243–247.
- Chen L.M., Liang Y.J., Ruan J.W. *et al.* Reversal of P-gp mediated multidrug resistance *in vitro* and *in vivo* by FG020318 // *J. Pharm. Pharmacol*. 2004a. V. 56. № 8. P. 1061–1066.
- Chen L.M., Wu X.P., Ruan J.W. *et al.* Screening novel, potent multidrug-resistant modulators from imidazole derivatives // *Oncol. Res*. 2004b. V. 14. № 7/8. P. 355–362.
- Chiu Y.L., Rana T.M. siRNA function in RNAi: a chemical modification analysis // *RNA*. 2003. V. 9. № 9. P. 1034–1048.
- Christians U., Spiekermann K., Bader A. *et al.* Cyclosporine metabolite pattern in blood from patients with acute GVHD after BMT // *Bone Marrow Transplant*. 1993. V. 12. № 1. P. 27–33.
- Cole S.P., Bhardwaj G., Gerlach J.H. *et al.* Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line // *Science*. 1992. V. 258. № 5088. P. 1650–1654.
- Den Boer M.L., Pieters R., Kazemier K.M. *et al.* Relationship between the intracellular daunorubicin concentration, expression of major vault protein/lung resistance protein and resistance to anthracyclines in childhood acute lymphoblastic leukemia // *Leukemia*. 1999. V. 13. № 12. P. 2023–2030.
- Desoize B., Jardillier J. Multicellular resistance: a paradigm for clinical resistance? // *Crit. Rev. Oncol. Hematol*. 2000. V. 36. № 2/3. P. 193–207.
- Ding H., Schwarz D. S., Keene A. *et al.* Selective silencing by RNAi of a dominant allele that causes amyotrophic lateral sclerosis // *Aging Cell*. 2003. V. 2. № 4. P. 209–217.
- Doyle L.A., Yang W., Abruzzo L.V. *et al.* A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998. V. 95. № 26. P. 15665–15670.
- Doyle L.A., Ross D.D. Multidrug resistance mediated

- by the breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2) // *Oncogene*. 2003. V. 22. № 47. P. 7340–7358.
- Elbashir S.M., Harborth J., Lendeckel W. *et al.* Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells // *Nature*. 2001a. V. 411. № 6836. P. 494–498.
- Elbashir S.M., Lendeckel W., Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs // *Genes Dev*. 2001b. V. 15. № 2. P. 188–200.
- Elbashir S.M., Martinez J., Patkaniowska A. *et al.* Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate // *The EMBO J*. 2001c. V. 20. № 23. P. 6877–6888.
- Findlay D., Herries D.G., Mathias A.P. *et al.* The active site and mechanism of action of bovine pancreatic ribonuclease // *Nature*. 1961. V. 190. P. 781–784.
- Fu L., Liang Y., Deng L. *et al.* Characterization of tetrandrine, a potent inhibitor of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance // *Cancer Chemother. Pharmacol*. 2004. V. 53. № 4. P. 349–356.
- Fu L.W., Zhang Y.M., Liang Y.J. *et al.* The multidrug resistance of tumour cells was reversed by tetrandrine *in vitro* and in xenografts derived from human breast adenocarcinoma MCF-7/adr cells // *Eur. J. Cancer*. 2002. V. 38. № 3. P. 418–426.
- Gonzalez-Alegre P., Miller V.M., Davidson B.L., Paulson H.L. Toward therapy for DYT1 dystonia: allele-specific silencing of mutant TorsinA // *Ann. Neurol*. 2003. V. 53. № 6. P. 781–787.
- Gottesman M.M., Fojo T., Bates S.E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters // *Nat. Rev. Cancer*. 2002. V. 2. № 1. P. 48–58.
- Grunweller A., Wyszko E., Bieber B. *et al.* Comparison of different antisense strategies in mammalian cells using locked nucleic acids, 2'-O-methyl RNA, phosphorothioates and small interfering RNA // *Nucl. Acids Res*. 2003. V. 31. № 12. P. 3185–3193.
- Hannon G.J., Rossi J.J. Unlocking the potential of the human genome with RNA interference // *Nature*. 2004. V. 431. № 7006. P. 371–378.
- Harborth J., Elbashir S. M., Bechert K. *et al.* Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs // *J. Cell Sci*. 2001. V. 114. № 24. P. 4557–4565.
- Holen T., Amarzguioui M., Wiiger M.T. *et al.* Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger tissue factor // *Nucl. Acids Res*. 2002. V. 30. № 8. P. 1757–1766.
- Holm P.S., Scanlon K.J., Dietel M. Reversion of multidrug resistance in the P-glycoprotein-positive human pancreatic cell line (EPP85-181RDB) by introduction of a hammerhead ribozyme // *Br. J. Cancer*. 1994. V. 70. № 2. P. 239–243.
- Holm P.S., Dietel M., Krupp G. Similar cleavage efficiencies of an oligoribonucleotide substrate and an *mdr1* mRNA segment by a hammerhead ribozyme // *Gene*. 1995. V. 167. № 1/2. P. 221–225.
- Khvorova A., Reynolds A., Jayasena S.D. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias // *Cell*. 2003. V. 115. № 2. P. 209–216.
- Kitazono M., Sumizawa T., Takebayashi Y. *et al.* Multidrug resistance and the lung resistance-related protein in human colon carcinoma SW-620 cells // *J. Natl Cancer Inst*. 1999. V. 91. № 19. P. 1647–1653.
- Kostenko E.V., Laktionov P.P., Vlassov V.V., Zenkova M.A. Downregulation of PGY1/MDR1 mRNA level in human KB cells by antisense oligonucleotide conjugates. RNA accessibility *in vitro* and intracellular antisense activity // *Biochem. Biophys. Acta*. 2002. V. 1576. № 1/2. P. 143–147.
- Kruh G.D., Belinsky M.G. The MRP family of drug efflux pumps // *Oncogene*. 2003. V. 22. № 47. P. 7537–7552.
- Meister G., Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA // *Nature*. 2004. V. 431. № 7006. P. 343–349.
- Miller V.M., Xia H., Marrs G.L. *et al.* Allele-specific silencing of dominant disease genes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003. V. 100. № 12. P. 7195–7200.
- Miyake K., Mickley L., Litman T. *et al.* Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes // *Cancer Res*. 1999. V. 59. № 1. P. 8–13.
- Nagata J., Kijima H., Hatanaka H. *et al.* Reversal of drug resistance using hammerhead ribozymes against multidrug resistance-associated protein and multidrug resistance 1 gene // *Int. J. Oncol*. 2002. V. 21. № 5. P. 1021–1026.
- Naito Y., Yamada T., Ui-Tei K. *et al.* siDirect: highly effective, target-specific siRNA design software for mammalian RNA interference // *Nucl. Acids Res*. 2004. V. 32. № Web Server issue. P. W124–129.
- Nieth C., Priebisch A., Stege A., Lage H. Modulation of the classical multidrug resistance (MDR) phenotype by RNA interference (RNAi) // *FEBS Lett*. 2003. V. 545. № 2/3. P. 144–150.
- Parrish S., Fleenor J., Xu S. *et al.* Functional anatomy of a dsRNA trigger: differential requirement for the two trigger strands in RNA interference // *Mol. Cell*. 2000. V. 6. № 5. P. 1077–1087.
- Peng Z., Xiao Z., Wang Y. *et al.* Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance with small interference RNA (siRNA) in leukemia cells // *Cancer Gene Ther*. 2004. V. 11. № 11. P. 707–712.
- Ramachandran C., Wellham L.L. Effect of MDR1 phosphorothioate antisense oligodeoxynucleotides in multidrug-resistant human tumor cell lines and

- xenografts // *Anticancer Res.* 2003. V. 23. № 3B. P. 2681–2690.
- Richert N.D., Aldwin L., Nitecki D. *et al.* Stability and covalent modification of P-glycoprotein in multidrug-resistant KB cells // *Biochemistry.* 1988. V. 27. № 20. P. 7607–7613.
- Scherer L.J., Rossi J.J. Approaches for the sequence-specific knockdown of mRNA // *Nat. Biotechnol.* 2003. V. 21. № 12. P. 1457–1465.
- Song E., Zhu P., Lee S. K. *et al.* Antibody mediated *in vivo* delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors // *Nat. Biotechnol.* 2005. V. 23. № 6. P. 709–717.
- Soutschek J., Akinc A., Bramlage B. *et al.* Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs // *Nature.* 2004. V. 432. № 7014. P. 173–178.
- Tan B., Piwnicka-Worms D., Ratner L. Multidrug resistance transporters and modulation // *Curr. Opin. Oncol.* 2000. V. 12. № 5. P. 450–458.
- Tuschl T. Expanding small RNA interference // *Nat. Biotechnol.* 2002. V. 20. № 5. P. 446–448.
- Tuschl T., Borkhardt A. Small interfering RNAs: a revolutionary tool for the analysis of gene function and gene therapy // *Mol. Interv.* 2002. V. 2. № 3. P. 158–167.
- Wilda M., Fuchs U., Wossmann W., Borkhardt A. Killing of leukemic cells with a BCR/ABL fusion gene by RNA interference (RNAi) // *Oncogene.* 2002. V. 21. № 37. P. 5716–5724.
- Wu H., Hait W.N., Yang J.M. Small interfering RNA-induced suppression of MDR1 (P-glycoprotein) restores sensitivity to multidrug-resistant cancer cells // *Cancer Res.* 2003. V. 63. № 7. P. 1515–1519.
- Xu Y., Zhang H.Y., Thormeyer D. *et al.* Effective small interfering RNAs and phosphorothioate antisense DNAs have different preferences for target sites in the luciferase mRNAs // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003. V. 306. № 3. P. 712–717.

THE REVERSE OF MULTIDRUG RESISTANCE (MDR) PHENOTYPE OF CANCER CELLS BY siRNA

E.B. Logashenko, A.A. Volkov, E.L. Chernolovskaya, M.A. Zenkova, V.V. Vlassov

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: evg_log@niboch.nsc.ru

Summary

Small interfering RNAs (siRNAs) are powerful tools for specifically silencing gene expression. Nevertheless, their efficiency can be limited when targeting genes, characterized by mRNAs and proteins with unusually long half-life. One of such genes is *mdr1* which expresses P-glycoprotein – the transmembrane protein and a member of the ATP-binding cassette transporter superfamily. Its overexpression is the main cause of multiple drug resistance (MDR) of some cancer cells. Here we review the research works of authors and other scientists considering the reversing of MDR phenotype.