

ИНГИБИРОВАНИЕ ПРОЛИФЕРАЦИИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА ДВУЦЕПОЧНЫМИ РНК, НАПРАВЛЕННЫМИ НА мРНК ОНКОГЕНОВ СЕМЕЙСТВА *MYC*

Т.О. Кабилова, Е.Л. Черноловская*

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск,
e-mail: elena_ch@niboch.nsc.ru

Создание регуляторов экспрессии генов на основе дцРНК, действующих по механизму РНК-интерференции или активирующих иммунный ответ, открывает новые возможности для получения широкого спектра высокоэффективных терапевтических препаратов. В данном обзоре обсуждается использование двуцепочечных РНК для подавления экспрессии генов семейства *myc*, гиперэкспрессия которых является причиной возникновения ряда опухолей, и влияние такого подавления на пролиферацию раковых клеток различного происхождения.

Гены семейства *myc* как терапевтическая мишень

Гены семейства *myc* (*c-myc*, *N-myc* и *L-myc*) участвуют в контроле клеточной пролиферации, дифференцировки и канцерогенеза. Ген *c-myc* рассматривается как перспективная терапевтическая мишень, поскольку его повышенная экспрессия наблюдается во многих типах опухолей человека (DePinho *et al.*, 1991). Имеются данные, что она напрямую связана с активацией пролиферации клеток и с их злокачественной трансформацией. Таким образом, подавление функции генов *myc* должно оказывать влияние на рост опухолей, характеризующихся целым рядом генетических аномалий, таких, как амплификации, хромосомные транслокации, вирусные inserции и мутации в кодирующих и регуляторных районах, которые приводят к усилению экспрессии генов (Nesbit *et al.*, 1999). Амплификация генов *myc* была обнаружена в ряде опухолей, таких, как рак груди, рак легких, нейроblastомы, но наиболее часто гиперэкспрессия генов *myc* не сопровождается амплификацией (Sabichi, Birger, 1996). Одной из частых причин усиления экспрессии генов *myc* являются мутации в промоторном районе, которые приводят к нарушению регуляции его

экспрессии (Grand *et al.*, 2004). Другим механизмом усиления экспрессии является стабилизация *myc* мРНК за счет изменения последовательности в 3'- или 5'-нетранслируемом районе (Bernasconi *et al.*, 2000). Нарушения регуляции экспрессии генов *myc* (*N-myc* и/или *c-myc*) играют ключевую роль в развитии нейроblastом, неоплазии, наиболее часто встречающейся у детей. Эти опухоли часто обладают устойчивостью к альфа-интерферону и ретиноевой кислоте (Lippman *et al.*, 1993; Reynolds *et al.*, 2000), которые ингибируют пролиферацию и индуцируют дифференцировку. Было показано, что индукция дифференцировки в клетках нейроblastомы человека с помощью 12-О-тетрадеканойлфорбол-13-ацетата (ТРА) сопровождается быстрой временной активацией экспрессии гена *c-fos* и снижением уровня мРНК гена *c-myc* (Hammerling *et al.*, 1987). Идентификация специфических ингибиторов генов *myc* является важным этапом разработки препаратов для лечения лекарственноустойчивых нейроblastом. Антисмысловые олигонуклеотиды, направленные против генов *c-myc* (Pastorino *et al.*, 2001) и *N-myc* (Galderisi *et al.*, 1999), исследовались в качестве антипролиферативных агентов, однако достигнутые умеренные уровни ингибирования при высоких концентрациях олигонуклеотидов

и побочные эффекты нуклеазоустойчивых аналогов олигонуклеотидов делают проблематичным их использование в медицине.

Интерферирующие РНК – специфические ингибиторы экспрессии генов

Интерферирующие РНК являются перспективными агентами для направленного подавления экспрессии генов (Fire *et al.*, 1998; Meister *et al.*, 2004). При попадании дцРНК в клетку происходит ее ферментативное фрагментирование с образованием дуплексов длиной 21–25 п. н. с выступающими 2–3 нуклеотидами на 3'-концах, которые в составе белкового комплекса RISC (RNA-induced silencing complex, РНК-зависимый ингибирующий комплекс) связываются с комплементарной им РНК-мишенью и вызывают ее направленную деградацию (Hammond *et al.*, 2005). В клетках млекопитающих механизм специфической деградации РНК может быть запущен, если использовать не протяженные дцРНК, а короткие синтетические дуплексы, имитирующие фрагменты РНК, получающиеся в ходе ее фрагментации ферментом Dicer–siРНК (small interfering RNA, малые интерферирующие РНК) (Elbashir *et al.*, 2001).

Используют две основные стратегии получения siРНК: а) создание плазмидных или вирусных конструкций, экспрессирующих siРНК или шпилечные shРНК (small hairpin RNA, малые шпилечные РНК) в клетках; б) химический или ферментативный синтез siРНК *in vitro*. Использование плазмидных конструкций, кодирующих siРНК или shРНК, обеспечивает стабильную внутриклеточную экспрессию интерферирующих РНК, вызывающую более продолжительное ингибирование экспрессии РНК-мишени по сравнению с экзогенными siРНК (Amarzguioui *et al.*, 2005). Применение лентивирусных или аденовирусных векторов позволяет эффективно доставлять конструкции в клетки (Poliseno *et al.*, 2004), однако вопросы безопасности их применения еще не решены (Stevenson, 2004).

С помощью химического синтеза можно получить siРНК любой последовательности и в больших количествах, в том числе siРНК,

содержащие различные химические модификации (Amarzguioui *et al.*, 2003; Braasch *et al.*, 2003), повышающие устойчивость siРНК к рибонуклеазам и увеличивающие эффективность и длительность ее действия. Ферментативный синтез с помощью *in vitro*-транскрипции с Т7 РНК-полимеразой на коротких ДНК-матрицах (Donze, Picard, 2002; Sohail *et al.*, 2003) позволяет быстро получить в условиях любой лаборатории препарат siРНК стандартного качества.

Существует несколько путей ферментативного синтеза siРНК с помощью *in vitro*-транскрипции с Т7 РНК-полимеразой. Наиболее простой способ получения siРНК (Donze, Picard, 2002), основан на транскрипции на коротких ДНК-матрицах, содержащих только последовательность Т7 промотора и кодирующую часть. Недостатком этого метода являются ограничения при выборе последовательности siРНК: так как для эффективной транскрипции каждая из цепей siРНК должна начинаться с 5'-G, то выбираемая последовательность мРНК-мишени должна удовлетворять следующему требованию 5'-G-N₁₇-C-3'. С другой стороны, по литературным данным (Hohjoh, 2004; Ui-Tei *et al.*, 2004), для эффективной РНК-интерференции необходимо, чтобы дуплекс со стороны 5'-конца антисмысловой цепи был более легкоплавким для включения преимущественно антисмысловой цепи в комплекс RISC, что еще более усложняет выбор последовательности siРНК. Следует отметить, что в результате транскрипции с Т7 РНК-полимеразой образующиеся РНК содержат 5'-концевой трифосфат, что приводит к индукции неспецифического интерферонового ответа при введении таких РНК в клетку (Kim *et al.*, 2004), поэтому для достижения специфического ингибирующего эффекта необходимо его удаление. В схеме синтеза, предложенной фирмой Ambion (<http://www.ambion.com/techlib/tn/103/2.html>), после Т7-промотора вводится 8-нуклеотидная G-богатая лидерная последовательность 5'-GAGACAGG-3', наличие которой снимает ограничения при выборе последовательности siРНК, обеспечивает высокую эффективность транскрипции, независимо от последовательности транскрибируемой цепи. При обработке РНК-дуплексов РНКазой Т1 происходит отщеп-

ление 5'-лидерной последовательности и удаление 5'-трифосфата с образованием siРНК.

Ингибирование экспрессии генов *тус* с помощью siРНК

Эффективное подавление экспрессии гена *с-тус* в клетках карциномы легкого человека А549, гепатомы HepG2 и аденокарциномы молочной железы MCF-7 было достигнуто с помощью векторов, экспрессирующих siРНК или shРНК (Hosono *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005). Показано, что под действием аденовирусного вектора, экспрессирующего siРНК, направленную к последовательности в третьем экзоне мРНК гена *с-тус* в клетках А549 и HepG2, существенно снижается уровень белка *с-МУС* (Hosono *et al.*, 2004). В другом исследовании показано, что трансфекция с помощью липофектамина в клетки MCF-7-плазмиды, экспрессирующей shРНК, направленную к 3'-нетранслируемому району мРНК гена *с-тус*, также снижает уровень экспрессии белка и ингибирует рост раковых клеток *in vitro* и *in vivo* (Wang *et al.*, 2005). Использование плазмидных или вирусных векторов для экспрессии интерферирующих РНК *in vivo* связано с опасностью неконтролируемого встраивания фрагментов ДНК векторов в геном (Stevenson *et al.*, 2004), поэтому из соображений биобезопасности использование синтетических siРНК для подавления экспрессии терапевтически значимых генов является предпочтительным.

Успешное подавление экспрессии гена *с-тус* с помощью siРНК в клетках человека – GT38, HeLa и MCF-7 – было достигнуто несколькими группами исследователей (Demeterco *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2005). Показано, что подавление экспрессии гена *с-тус* с помощью siРНК, направленной к 3'-нетранслируемому району мРНК этого гена в клетках GT38, инфицированных вирусом Эпштейна-Барра (EBV), не влияет на пролиферацию этих клеток, однако блокирует реактивацию вируса, индуцированную форболовым эфиром (Gao *et al.*, 2004). В другой работе (Shen *et al.*, 2005) авторы использовали поли-2'-О-(2,4-динитрофенил)-модифицированную 21-звенную

антисмысловую РНК (поли-ДНФ-РНК), комплементарную району AUG-кодона мРНК гена *с-тус* для подавления экспрессии этого гена *in vitro* и *in vivo*. Поли-ДНФ-РНК-аналог был использован для увеличения нуклеазоустойчивости РНК и облегчения ее захвата клетками (Chen *et al.*, 2004). Известно, что антисмысловые одноцепочечные РНК могут действовать по механизму РНК-интерференции в том случае, если химические модификации в составе такой РНК обеспечивают ее устойчивость к действию рибонуклеаз (Aronin, 2006). Экспериментальные данные, полученные *in vitro*, показали, что трансфекция клеток MCF-7 с помощью олигофектамина 100 нМ поли-ДНФ-РНК не только снижает уровень мРНК и белка *с-МУС*, но и ингибирует рост раковых клеток. Результаты, полученные *in vivo*, подтверждают эффективность действия ДНФ-модифицированных РНК как ингибиторов опухолевого роста, тогда как немодифицированные siРНК без использования специальных средств направленной доставки в клетки оказались в этой системе неактивны.

Эффективное и специфичное ингибирование экспрессии гена *с-тус* было достигнуто с помощью siРНК siEx3, направленной к участку 3-го экзона *с-тус* мРНК (Kabilova *et al.*, 2006a, b). Под действием siEx3 в концентрации 75–150 нМ уровень мРНК гена *с-тус* снижался на 65–90 % (рис. 1а), уровень белка МУС на 60–85 % в клетках карциномы человека KB-3-1.

В клетках нейробластомы SK-N-MC эффективность действия этой siРНК была несколько ниже: трансфекция клеток siEx3 в концентрации 150 нМ вызывала только 60 %-ое снижение уровня мРНК-мишени и 50 %-ое снижение уровня белка МУС. Разные типы нейробластом характеризуются гиперэкспрессией разных генов семейства *тус*. Для создания siРНК, ингибирующей экспрессию генов *с-тус* и *N-тус*, последовательности генов выравнивали, и высокомолекулярный район второго экзона был выбран в качестве мишени для siEx2. Эксперименты показали, что под действием siEx2 происходит снижение экспрессии гена *с-тус* в клетках KB-3-1 и гена *N-тус* в клетках IMR-32 (Kabilova *et al.*, 2006b) до 15–25 % от уровня экспрессии в контрольных клетках (рис. 1б).

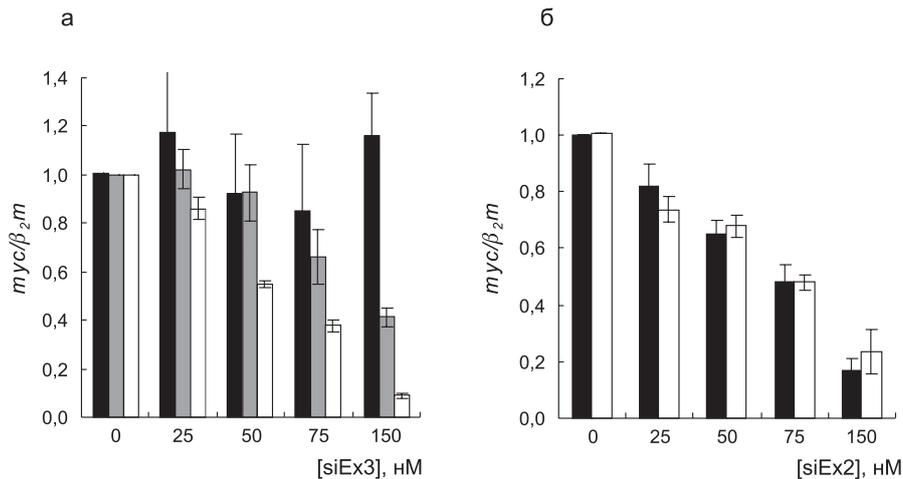


Рис. 1. Ингибирование экспрессии гена *c-myc* в клетках KB-3-1 (белые столбцы) и SK-N-MC (серые столбцы), а также гена *N-myc* в клетках IMR-32 (черные столбцы) с помощью siРНК siEx3 (а) и siEx2 (б).

Уровень мРНК генов *c-* и *N-myc* определяли с помощью RT-PCR через 72 часа после трансфекции клеток увеличивающимися концентрациями siРНК (25–150 нМ) с помощью олигофектамина. В качестве внутреннего стандарта использовали мРНК β_2 -микроглобулина (β_2m). Соотношение $musc/\beta_2m$ в контроле принимали за 1, стандартное отклонение определяли по результатам трех независимых экспериментов.

Одной из причин разной эффективности действия siРНК в клетках KB-3-1 и SK-N-MC может быть различная эффективность трансфекции, однако анализ накопления флуоресцентно меченой siРНК с помощью микроскопии показал, что и спонтанное накопление и трансфекция приводят к накоплению в клетках SK-N-MC большего количества siРНК, чем в клетках KB-3-1 и IMR-32 (Kabilova *et al.*, 2006a). Другой причиной различной эффективности могут быть разные уровни активности механизма РНК интерференции, связанные либо с уровнями экспрессии генов, кодирующих компоненты RISC, либо со способностью клеток восстанавливать уровень мРНК за счет усиления транскрипции (Amy, Bartholomew, 1987).

Эффективное подавление экспрессии гена *c-myc* наблюдается, как правило, в присутствии относительно высоких, выше 100 нМ, концентраций siРНК (Demeterco *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2005; Kabilova *et al.*, 2006a). В исследовании с использованием аденовирусного вектора (Hosono *et al.*, 2004), экспрессирующего шпилечную РНК, значительное подавление экспрессии гена *c-myc* было достигнуто только при концентрации 3 тыс. вирусных частиц на клетку. При более низкой

концентрации – 1 тыс. вирусных частиц/клетку, наблюдалось только незначительное снижение уровня экспрессии. Необходимость использования относительно высоких концентраций siРНК или вирусных частиц, их экспрессирующих, практически во всех работах по подавлению экспрессии гена *c-myc* могла быть связана с коротким временем полужизни как мРНК этого гена (0,5–1 час для разных линий клеток), так и самого MYC-белка (20–50 минут) и, как следствие, быстрым их обменом, который обеспечивается высоким уровнем транскрипции гена *c-myc* (Dani *et al.*, 1984; Hann, Eisenman, 1984; Ramsay *et al.*, 1984).

Антипролиферативное действие siРНК

Наши данные показывают, что под действием siРНК в концентрации 150 нМ наиболее низкий уровень мРНК гена *c-myc* в клетках KB-3-1 (5–10 % от исходного) наблюдается через 48–96 часов после трансфекции; через 5 дней после трансфекции уровень этой мРНК начинает возрастать и достигает исходного значения к 12 суткам. В экспериментах на клетках MCF-7 с использованием экспрессирующего вектора Вонг с соавторами (Wang *et al.*, 2005)

наблюдали снижение уровня белка MYC на 5-й день после трансфекции вектора, при этом исходный уровень восстанавливался через 12 дней после трансфекции. Таким образом, длительность ингибирующего действия siРНК сравнима с длительностью ингибирующего действия плазмидного вектора, экспрессирующего shРНК в делящихся клетках, где снижение ингибирующего действия происходит за счет снижения копийности и даже полной потери плазмиды после серии клеточных делений. Данные, полученные несколькими группами исследователей (Bazarov *et al.*, 2001; Jain *et al.*, 2002), свидетельствуют о том, что даже непродолжительное ингибирование экспрессии гена *c-myc* может вызвать устойчивую потерю клетками опухолевого фенотипа, причем даже после реактивации экспрессии этого гена в культуре клеток скорость пролиферации не восстанавливается и число живых клеток остается существенно более низким, чем в контроле. В некоторых опухолях временное выключение экспрессии гена *c-myc* не только блокирует их пролиферацию, но и индуцирует необратимую дифференцировку клеток, сопровождающуюся потерей ракового фенотипа, как, например, это было показано для эндокринных клеток (Demeterco *et al.*, 2002).

Наши результаты показывают (табл. 1) (Kabilova *et al.*, 2004, 2006a), что степень снижения уровня мРНК гена *c-myc* под действием siРНК напрямую коррелирует со снижением скорости их пролиферации: скорость роста клеток SK-N-MC снижается в 2,5 раза, а деление клеток KB-3-1 полностью блокируется под действием siРНК в концентрации 150 нМ. Ингибирование экспрессии генов *c-myc* и *N-myc* под действием siEx2 в 2,5–3 раза снижает скорость роста тех клеток, где наблюдается их гиперэкспрессия. Такое ингибирование пролиферации является терапевтически значимым и строго специфическим относительно последовательности siРНК: siРНК, не имеющие гомологии с последовательностью генов человека, не влияют на экспрессию генов и рост клеток, кроме того, siРНК, направленная к последовательности гена *c-myc*, не оказывает влияния на экспрессию гена *N-myc* и пролиферацию клеток нейробластомы IMR-32, характеризующейся повышенным уровнем экспрессии гена *N-myc*. С одной стороны, ингибирование клеточного роста под действием анти-*c-myc*-siРНК было продемонстрировано на клетках MCF-7 (Shen *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005) и HeLa (Demeterco *et al.*, 2002). С другой стороны, подавление экспрессии гена *c-myc* в клетках GT38, инфицированных вирусом Эп-

Таблица 1

Ингибирование пролиферации клеток карциномы KB-3-1 и нейробластом SK-N-MC, IMR-32 под действием двуцепочечных РНК

Препараты* siРНК и дцРНК	Мишень	Степень ингибирования пролиферации**		
		KB-3-1	SK-N-MC	IMR-32
siРНК-Ex3	1452–1470 н. <i>c-myc</i> мРНК	>10	2	не влияет
siРНК-Ex2	697–715 н. <i>c-myc</i> мРНК и 302–320 н. <i>N-myc</i> мРНК с двумя заменами	3	не определено	2,3
siРНК-Scr	некомплементарный контроль	не влияет	не влияет	не влияет
siРНК-I	первый интрон гена <i>mdr1</i>	>10	5,3	1,6
дцРНК-dsMyc	1159–1631 н. <i>c-myc</i> мРНК	9,5	не определено	не определено
полиI:полиC	высокополимерная дцРНК	5,5	не определено	не определено

* Данные приведены для концентрации siРНК 150 нМ, дцРНК 0,5 мкг/мл; ** степень ингибирования пролиферации – отношение числа живых клеток в контроле к числу живых клеток, обработанных исследуемыми препаратами через 120 часов после трансфекции.

штейна-Барра, не влияет на их пролиферацию, что может быть связано как с особенностями клеточной линии, так и с влиянием на пролиферацию вирусной инфекции (Gao *et al.*, 2004).

Двухцепочечные РНК – индукторы интерферона

Клетки млекопитающих реагируют на введение протяженных дцРНК индукцией неспецифического интерферонового ответа (Bernstein *et al.*, 2001), однако недавно было обнаружено, что даже короткие siРНК в зависимости от последовательности могут вызывать целый ряд эффектов, не связанных с подавлением экспрессии гена–мишени (Judge *et al.*, 2005; Sioud, 2005). Эти эффекты могут быть связаны как с влиянием на экспрессию генов, в состав которых входят последовательности, частично гомологичные последовательности siРНК, так и с эффектами, связанными с индукцией интерферонового ответа как путем активации PKR (РНК-зависимой протеинкиназы), так и путем связывания с рецепторами, распознающими двухцепочечную РНК–TLR3 (Toll-подобные рецепторы 3-го типа).

В случае специфического действия на определенные РНК, индукция интерферонового ответа является нежелательным побочным эффектом, однако сама по себе она имеет большое терапевтическое значение. Интерферогенная активность препаратов длинных двухцепочечных РНК интенсивно исследуется в связи с попытками создать на их основе терапевтические препараты для лечения вирусных и опухолевых заболеваний. Известен целый ряд индукторов интерферона, которые применяются в терапии как иммуномодулирующие, противовирусные и антипролиферативные препараты. Среди таких препаратов есть основанные на дцРНК: препарат полиI:полиC (Ampligen) и дцРНК из вирусоподобных частиц киллерных штаммов дрожжей (препарат ридостин). Разные опухолевые клеточные линии по-разному реагируют на действие интерферонов, вызванная ими блокировка клеточного роста может приводить к дифференцировке клеток или к апоптозу (Higuchi *et al.*, 1991; Shang *et al.*, 1998).

Известно, что интерфероны способны специфически регулировать экспрессию генов,

контролирующих клеточный цикл (Kimchi, 1992). Одной из основных мишеней действия интерферона являются гены *мус*-семейства (*c-мус* и *N-мус*). Снижение уровня *c-мус*-РНК под действием интерферона показано как для линий гемопоэтических клеток (Einat *et al.*, 1985) так и для эпителиальных клеток (Yarden, Kimichi, 1986). Показано, что уменьшение уровня *c-мус*-мРНК происходит за счет интерферон-зависимого ингибирования связывания факторов транскрипции с участками промотора гена *c-мус* (Kimchi, 1992). В свою очередь, гиперэкспрессия гена *c-мус* уменьшает антипролиферативное действие интерферона, как это происходит в случае наличия мутаций в промоторе гена, препятствующих его регуляции под действием интерферона (Sangfelt *et al.*, 2000). Экспрессия гена *c-мус* является ключевым моментом в биологии таких опухолей, как нейробластомы. Его гиперэкспрессия является причиной агрессивного развития опухолевого процесса, тогда как интерферон-индуцированное ингибирование приводит к дифференцировке опухолевых клеток и прекращению прогрессии опухоли (Wada *et al.*, 1997). В настоящее время уже доказана важная роль иммунотерапии в онкологии после операций, однако применение препаратов интерферона ограничено такими факторами, как их пирогенность, аллергенность, опасность возникновения аутоиммунных процессов и необходимость многократного введения суточной дозы (Новиков и др., 1999). Этих недостатков лишены индукторы эндогенного интерферона, одним из которых является дцРНК. Можно ожидать, что дцРНК, гомологичные мРНК «нежелательных» генов, ответственных за опухолевый рост, могут стать эффективными ингибиторами опухолевой прогрессии, действуя сразу на двух уровнях регуляции.

Эксперименты показали, что длинная двухцепочечная РНК, последовательность которой гомологична третьему экзону мРНК гена *c-мус*, ингибирует пролиферацию клеток карциномы KB-3-1 и нейробластомы SK-N-MC (табл. 1) и снижает уровень мРНК интерферон-чувствительных генов *c-мус* и *beta-actin*, причем эффективность ингибирования существенно

выше, чем в случае использования синтетического индуктора интерферона полиI:полиC (Kabilova *et al.*, 2006b). Полученная авторами обзором siРНК-I, последовательность которой гомологична последовательности первого интрона гена *mdr1*, способна эффективно ингибировать как экспрессию гена *c-myc*, так и пролиферацию клеток KB-3-1, причем эффективность ее действия значительно выше, чем у направленной на мРНК гена *c-myc* siРНК-Ех3, несмотря на то что последовательность siРНК-I не имеет существенной гомологии с иммуностимулирующими последовательностями, обнаруженными в siРНК ранее (Judge *et al.*, 2005; Sioud *et al.*, 2005). Исследование профиля экспрессии генов-маркеров интерферонного ответа показало, что данная siРНК обладает сильными интерферон-индуцирующими свойствами (Kabilova *et al.*, 2006b). В отличие от клеток KB-3-1 в клетках IMR-32 эта siРНК не вызывает ингибирования экспрессии гена *N-myc* и только в полтора раза снижает скорость клеточного деления (табл. 1). Такая нечувствительность к ее действию объясняется тем, что нейробластома IMR-32 устойчива к действию трансретиноевой кислоты и альфа-интерферона – препаратов, которые применяются в терапии нейробластом – за счет повреждения элемента, отвечающего за регуляцию под действием интерферона в составе промотора гена *N-myc* (Hemmi *et al.*, 1995). Умеренное ингибирование пролиферации этой клеточной линии, по-видимому, происходит по независимому от *N-myc* механизму за счет ингибирования экспрессии других интерферон-чувствительных генов. Примечательно, что siРНК, действующие по механизму РНК-интерференции и снижающие экспрессию генов, ответственных за пролиферацию раковых клеток, оказываются эффективными даже в случае лекарственноустойчивых опухолей, таких, как данная нейробластома.

Заключение

Результаты исследований свидетельствуют о том, что двуцепочечные РНК, как действующие по механизму РНК-интерференции, так и активирующие иммунный ответ, могут стать

основой препаратов для терапии онкологических заболеваний. Ряд препаратов на основе siРНК уже проходят клинические испытания, которые позволят выявить как терапевтический потенциал этих препаратов, так и возможные побочные эффекты. Несмотря на большой прогресс в понимании механизмов действия двуцепочечных РНК на клетку, для перехода их из категории эффективного инструмента биомедицинских исследований в категорию лекарственных препаратов требует решения целый спектр вопросов, таких, как обеспечение направленной и эффективной доставки в органы и ткани организма, предотвращение неспецифических эффектов и безопасное дозирование препарата для предотвращения нежелательного снижения уровня экспрессии гена-мишени в здоровых тканях.

Литература

- Новиков В.И., Карандашов В.И., Сидорович И.Г. Иммуноterapia при злокачественных новообразованиях. М.: Медицина, 1999. 135 с.
- Amarzguioui M., Holen T., Babaie E., Prydz H. Tolerance for mutations and chemical modifications in a siRNA // *Nucl. Acids Res.* 2003. V. 31. № 2. P. 589–595.
- Amarzguioui M., Rossi J.J., Kim D. Approaches for chemically synthesized siRNA and vector-mediated RNAi // *FEBS Lett.* 2005. V. 579. № 26. P. 5974–5981.
- Amy C.M., Bartholomew J.C. Regulation of *N-myc* transcript stability in human neuroblastoma and retinoblastoma cells // *Cancer Res.* 1987. V. 47. № 23. P. 6310–6314.
- Aronin N. Target selectivity in mRNA silencing // *Gene Ther.* 2006. V. 13. № 6. P. 509–516.
- Bazarov A.V., Adachi S., Li S.F. *et al.* A modest reduction in *c-myc* expression has minimal effects on cell growth and apoptosis but dramatically reduces susceptibility to *ras* and *raf* transformation // *Cancer Res.* 2001. V. 61. № 3. P. 1178–1186.
- Bernasconi N.L., Wormhoudt T.A., Laird-Offringa I.A. Post-transcriptional deregulation of *myc* genes in lung cancer cell lines // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2000. V. 23. № 4. P. 560–565.
- Bernstein E., Caudy A.A., Hammond S.M., Hannon G.J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference // *Nature.* 2001. V. 409. № 6818. P. 363–366.
- Braasch D.A., Jensen S., Liu Y. *et al.* RNA interference

- in mammalian cells by chemically-modified RNA // *Biochemistry* 2003. V. 42. № 26. P. 7967–7975.
- Chen X., Shen L., Wang J.H. Poly-2-DNP-RNAs with enhanced efficacy for inhibiting cancer cell growth // *Oligonucleotides*. 2004. V. 14. № 2. P. 90–99.
- Dani C., Blanchard J.M., Piechaczyk M. *et al.* Extreme instability of *myc* mRNA in normal and transformed human cells // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1984. V. 81. № 22. P. 7046–7050.
- Demeterco C., Itkin-Ansari P., Tyrberg B. *et al.* *c-Myc* controls proliferation versus differentiation in human pancreatic endocrine cells // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002. V. 87. № 7. P. 3475–3485.
- DePinho R.A., Schreiber-Agus N., Alt F.W. *myc* family oncogenes in the development of normal and neoplastic cells // *Adv. Cancer Res.* 1991. V. 57. P. 1–46.
- Donze O., Picard D. RNA interference in mammalian cells using siRNAs synthesized with T7 RNA polymerase // *Nucl. Acids Res.* 2002. V. 30. № 10. P. e46.
- Einat M., Resnitzky D., Kimchi A. Close link between reduction of *c-myc* expression by interferon and, G0/G1 arrest // *Nature*. 1985. V. 313. № 6003. P. 597–600.
- Elbashir S.M., Harborth J., Lendeckel W. *et al.* Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA-interference in cultured mammalian cells // *Nature*. 2001. V. 411. № 6836. P. 494–498.
- Fire A., Xu S., Montgomery M.K. *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* // *Nature*. 1998. V. 391. № 6669. P. 806–811.
- Galderisi U., Di Bernardo G., Cipollaro M. *et al.* Differentiation and apoptosis of neuroblastoma cells: role of *N-myc* gene product // *J. Cell. Biochem.* 1999. V. 73. № 1. P. 97–105.
- Gao X., Wang H., Sairenji T. Inhibition of Epstein-Barr virus (EBV) reactivation by short interfering RNAs targeting p38 mitogen-activated protein kinase or *c-myc* in EBV-positive epithelial cells // *J. Virol.* 2004. V. 78. № 21. P. 11798–11806.
- Grand C.L., Powell T.J., Nagle R.B. *et al.* Mutations in the G-quadruplex silencer element and their relationship to c-MYC overexpression, NM23 repression, and therapeutic rescue // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2004. V. 101. № 16. P. 6140–6145.
- Hammerling U., Bjelfman C., Pahlman S. Different regulation of *N-* and *c-myc* expression during phorbol ester-induced maturation of human SH-SY5Y neuroblastoma cells // *Oncogene*. 1987. V. 2. № 1. P. 73–77.
- Hammond S.M. Dicing and slicing the core machinery of the RNA interference pathway // *FEBS Lett.* 2005. V. 579. № 26. P. 5822–5829.
- Hann S.R., Eisenman R.N. Proteins encoded by the human *c-myc* oncogene: differential expression in neoplastic cells // *Mol. Cell Biol.* 1984. V. 4. № 11. P. 2486–2497.
- Hemmi H., Yamada K., Yoon U. *et al.* Coexpression of the *myc* gene family members in human neuroblastoma cell lines // *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1995. V. 36. № 6. P. 1135–1141.
- Higuchi T., Hannigan G.E., Malkin D. *et al.* Enhancement by retinoic acid and dibutyl cyclic adenosine 3':5'-monophosphate of the differentiation and gene expression of human neuroblastoma cells induced by interferon // *Cancer Res.* 1991. V. 51. № 15. P. 3958–3964.
- Hohjoh H. Enhancement of RNAi activity by improved siRNA duplexes // *FEBS Lett.* 2004. V. 557. № 1/3. P. 193–198.
- Hosono T., Mizuguchi H., Katayama K. *et al.* Adenovirus vector-mediated doxycycline-inducible RNA interference // *Human Gene Ther.* 2004. V. 15. № 8. P. 813–819.
- Jain M., Arvanitis C., Chu K. *et al.* Sustained loss of a neoplastic phenotype by brief inactivation of MYC // *Science*. 2002. V. 297. P. 102–104.
- Judge A.D., Sood V., Shaw J.R. *et al.* Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA // *Nat. Biotechnol.* 2005. V. 23. № 4. P. 457–462.
- Kabilova T.O., Chernolovskaya E.L., Vladimirova A.V., Vlassov V.V. Silencing of *c-myc* expression in tumor cells by siRNA // *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2004. V. 23. № 6/7. P. 867–872.
- Kabilova T.O., Chernolovskaya E.L., Vladimirova A.V., Vlassov V.V. Inhibition of human carcinoma and neuroblastoma cell proliferation by anti *c-myc* siRNA // *Oligonucleotides*. 2006a. V. 16. № 1. P. 14–24.
- Kabilova T.O., Chernolovskaya E.L., Vladimirova A.V., Vlassov V.V. Arrest of cancer cells proliferation by dsRNAs // *Annals NY Acad. Sci.* 2006b. (In press).
- Kim D., Longo M., Han Y. *et al.* Interferon induction by siRNAs and ssRNAs synthesized by phage polymerase // *Nature Biotechnol.* 2004. V. 22. № 3. P. 321–325.
- Kimchi A. Cytokine triggered molecular pathways that control cell cycle arrest // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 50. № 1. P. 1–9.
- Lippman S.M., Glisson B.S., Kavanagh J.J. *et al.* Retinoic acid and interferon combination studies in human cancer // *Eur. J. Cancer*. 1993. V. 5. P. S9–13.
- Meister G., Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA // *Nature*. 2004. V. 431. № 7006. P. 343–349.
- Nesbit C.E., Tersak J.M., Prochownik E.V. MYC oncogenes and human neoplastic disease // *Oncogene*.

1999. V. 18. № 19. P. 3004–3016.
- Pastorino F., Stuart D., Ponzoni M., Allen T.M. Targeted delivery of antisense oligonucleotides in cancer // *J. Control Release*. 2001. V. 74. № 1/3. P. 69–75.
- Poliseno L., Mercatanti A., Citti L., Rainaldi G. RNA-based drugs: from RNA interference to short interfering RNAs // *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2004. V. 5. № 4. P. 361–368.
- Ramsay G., Evan G.I., Bishop J.M. The protein encoded by the human proto-oncogene *c-myc* // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1984. V. 81. № 24. 7742–7746.
- Reynolds C.P., Wang Y., Melton L.J. *et al.* Retinoic-acid-resistant neuroblastoma cell lines show altered MYC regulation and high sensitivity to fenretinide // *Med. Pediatr. Oncol.* 2000. V. 35. № 6. P. 597–602.
- Sabichi A.L., Birrer M.J. Regulation of nuclear oncogenes expressed in lung cancer cell lines // *J. Cell. Biochem. Suppl.* 1996. V. 24. P. 218–227.
- Sangfelt O., Erickson S., Grander D. Mechanisms of interferon-induced cell cycle arrest // *Front Biosci.* 2000. V. 5. P. 479–487.
- Shang Y., Baumrucker C.R., Green M.H. *c-Myc* is a major mediator of the synergistic growth inhibitory effects of retinoic acid and interferon in breast cancer cells // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. № 46. P. 30608–30613.
- Shen L., Zhang C., Ambrus J.L., Wang J.H. Silencing of human *c-myc* oncogene expression by poly-DNP-RNA // *Oligonucleotides*. 2005. V. 15. № 1. P. 23–35.
- Sioud M. Induction of inflammatory cytokines and interferon responses by double-stranded and single-stranded siRNAs is sequence-dependent and requires endosomal localization // *J. Mol. Biol.* 2005. V. 348. № 5. P. 1079–1090.
- Sohail M., Doran G., Riedemann J. *et al.* A simple and cost-effective method for producing small interfering RNAs with high efficacy // *Nucl. Acids Res.* 2003. V. 31. № 7. P. e38.
- Stevenson M. Therapeutic potential of RNA interference // *New Engl. J. Med.* 2004. V. 351. № 17. P. 1772–1777.
- Ui-Tei K., Naito Y., Takahashi F. *et al.* Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference // *Nucl. Acids Res.* 2004. V. 32. № 3. P. 936–948.
- Wada R.K., Pai D.S., Huang J. *et al.* Interferon-gamma and retinoic acid down-regulate *N-myc* in neuroblastoma through complementary mechanisms of action // *Cancer Lett.* 1997. V. 121. № 2. P. 181–188.
- Wang Y.H., Liu S., Zhang G. *et al.* Knockdown of *c-Myc* expression by RNAi inhibits MCF-7 breast tumor cells growth *in vitro* and *in vivo* // *Breast Cancer Res.* 2005. V. 7. № 7. P. R220–R228.
- Yarden A., Kimichi A. Tumor necrosis factor reduces *c-myc* expression and cooperates with interferon-gamma in HeLa cells // *Science*. 1986. V. 243. № 4782. P. 1419–1421.

INHIBITION OF CANCER CELLS PROLIFERATION BY DOUBLE STRANDED RNA, TARGETED TO mRNA OF MYC ONCOGENES

T.O. Kabilova, E.L. Chernolovskaya

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

Summary

dsRNA-based regulators of gene expression acting via RNA interference mechanism or as innate immunity response activators could serve as prototypes for the development of wide variety of highly effective therapeutics. In this review, the use of double stranded RNAs for silencing of *myc* genes, which are overexpressed/deregulated in most tumor cell types and the influence of *myc* gene silencing on proliferation of cancer cells of different origin are discussed.