

УДК 577.21;579.23

МОДУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ АКТИВИРОВАННОГО ОНКОГЕНА *c-kit* С ПОМОЩЬЮ РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИИ

© 2011 г. П. В. Спирин¹, Н. А. Никитенко¹, Т. Д. Лебедев¹, П. М. Рубцов¹,
С. Stocking², В. С. Прасолов^{1*}

¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук,
Москва, 119991

²Heinrich-Pette-Institute for Experimental Virology and Immunology, Hamburg, D-20251 Germany

Поступила в редакцию 30.03.2011 г.

Принята к печати 22.06.2011 г.

Гиперэкспрессию онкогена *c-kit* в злокачественных клетках обнаруживают у 80% больных острым миелоидным лейкозом (ОМЛ). В настоящей работе сконструированы трансгенные модельные клетки, которые экспрессируют активированный онкоген *c-kit* человека, внесенный путем ретровирусной трансдукции. Последовательности малых интерферирующих РНК (siРНК), эффективно подавляющих экспрессию онкогена *c-kit*, синтезировали, беря за основу некоторые фрагменты последовательностей соответствующих мРНК этого гена. Сконструированы лентивирусные векторы, направляющие синтез шпилечных РНК (shРНК) – предшественников siРНК, которые стабильно подавляют экспрессию онкогена *c-kit* как в модельных клетках, так и в перевиваемых клетках линии Kasumi-1, полученных от больного с острым миелоидным лейкозом.

Ключевые слова: РНК-интерференция, малые интерферирующие siРНК, малые шпилечные shРНК, лентивирусные векторы, регуляция экспрессии генов, посттранскрипционная регуляция экспрессии, острый миелоидный лейкоз (ОМЛ).

MODULATION OF ACTIVATED ONCOGENE *c-kit* EXPRESSION WITH RNA-INTERFERENCE, by P. V. Spirin¹, N. A. Nikitenko¹, T. D. Lebedev, P. M. Rubtsov¹, C. Stocking², V. S. Prassolov^{1*} (¹Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia, *e-mail: prassolov@eimb.ru; ²Heinrich-Pette-Institute for Experimental Virology and Immunology, Hamburg, D-20251 Germany). Hyperexpression of oncogene *c-kit* is found in 80% patients with acute myeloid leukemia (AML). The transgenic model cell line expressing the oncogene *c-kit* was obtained by transduction with recombinant retrovirus. We have designed small interfering RNAs (siRNA) efficiently suppressing the expression of activated oncogene *c-kit*. Further small hairpin RNAs (shRNA) targeting *c-kit* mRNA were designed and expressed in lentiviral vectors. We report a stable reduction in *c-kit* expression following the introduction of shRNAs into model cells as well as Kasumi-1 cells from the patient with AML.

Keywords: RNA-interference, small interfering siRNA, small hairpin shRNA, lentiviral vectors, regulation of gene expression, posttranscriptional regulation of expression, acute myeloid leukemia (AML).

Злокачественное перерождение клеток, обусловленное структурно-функциональными изменениями различных генов, в том числе — активацией протоонкогенов, лежит в основе целого ряда онкологических заболеваний [1]. В настоящее время общепринято представление о том, что этот процесс многостадийный и начинается с активации, по крайней мере, двух онкогенов, что и является ключевым этапом для дальнейшей активации цело-

го каскада протоонкогенов, ведущей к опухолевой трансформации стволовой кроветворной клетки (СКК) [2]. Это происходит на ранних этапах кроветворения, в результате чего трансформированная клетка теряет способность к контролируемой пролиферации и дифференцировке. Значительная доля трудоспособного населения Земли страдает от различных форм злокачественных заболеваний, в том числе, лейкозов [3].

Принятые сокращения: ОМЛ — острый миелоидный лейкоз; СКК — стволовая кроветворная клетка; FAB — Франко-Американо-Британская классификация лейкозов; siРНК — малая интерферирующая РНК; shРНК — малая шпилечная интерферирующая РНК.

* Эл. почта: prassolov@eimb.ru

В настоящее время установлены лишь некоторые из онкогенов, участвующие в канцерогенезе у большинства видов опухолей. Это ограничивает возможности поиска и выбора подходов для лечения, и в частности, поиска терапевтических генов-мишеней и их белковых продуктов [4, 5].

В случае острых миелоидных лейкозов человека с высокой частотой выявляются мутации генов, ответственных за пролиферацию и дифференцировку клеток крови. К их числу относят мутации гена *c-kit*, расположенного на четвертой хромосоме и кодирующего рецепторный тирозинкиназный белок КИТ. Мутации гена *c-kit* у пациентов при остром миелоидном лейкозе (ОМЛ) встречаются не более чем в 5% случаев, при этом примерно в 20% случаев их выявляют у больных, имеющих транслокацию t(8;21), которая приводит к синтезу химерного онкобелка AML1-ETO [6, 7].

Важно отметить, что гиперэкспрессия продукта гена *c-kit* — рецепторной тирозинкиназы КИТ, в том числе, и его немутантной формы, наблюдается более чем у 80% пациентов с ОМЛ [8]. Нарушение нормальной экспрессии *c-kit* обуславливает усиление пролиферативных свойств клеток и их выживаемости. Онкобелок AML1-ETO влияет на функции факторов транскрипции или компонентов коактиваторных комплексов, нарушая дифференцировку и апоптоз клеток. Предполагается, что сочетание этих процессов может быть причиной злокачественного перерождения гемопоэтических клеток-предшественников, приводящей к развитию ОМЛ [2, 9].

Перспективным современным подходом к исследованию функциональной активности генов, в том числе, и активированных онкогенов, является РНК-интерференция, основанная на подавлении экспрессии генов на посттранскрипционном уровне при помощи коротких дуплексов siРНК (small interfering RNA, малые интерферирующие РНК) длиной 21–23 н. с выступающими двумя–тремя нуклеотидами на 3'-концах [10, 11]. В настоящее время этот подход используется для исследования функциональных свойств генов. В ряде работ показана принципиальная возможность использования синтетических siРНК для подавления экспрессии самых разных генов-мишеней, в том числе, и активированных онкогенов [11–14]. Однако, несмотря на положительные результаты, полученные с помощью синтетических siРНК, все еще остро стоят вопросы, связанные с повышением их стабильности *in vitro* и *in vivo*, а также с повышением эффективности их доставки в клетки мишени [11, 15, 16]. Для увеличения стабильности в синтетические siРНК вносят специфические химические модификации [17, 18].

Эффективен метод введения интерферирующих РНК в клетки с использованием рекомбинантных ретро- и лентивирусных векторов, на-

правляющих в трансдуцированных клетках синтез шпилечных РНК (shРНК) — предшественников малых интерферирующих РНК. siРНК образуются из shРНК под действием клеточного белка Дайсера (Dicer), обладающего рибонуклеазной активностью [11, 19]. Показано, что шпилечные конструкции могут быть успешно применены для подавления экспрессии генов, участвующих в развитии вирусных инфекций, и некоторых активированных онкогенов [20, 21]. Можно применить этот подход также для подавления экспрессии онкогенов, выявляемых при острых миелоидных лейкозах, которые, как полагают, являются ключевыми факторами развития ОМЛ.

В настоящей работе приведены результаты двух подходов к угнетению активированного онкогена человека *c-kit* с использованием новых синтетических siРНК и shРНК, экспрессия которых направляется рекомбинантными лентивирусными векторами.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Структура и синтез siРНК. siРНК получали путем гибридизации в буфере Р (100 мМ ацетат калия, 30 мМ HEPES-КОН, рН 7.4, 2 мМ ацетат магния) антисмысловой и смысловой цепей, которые синтезированы в ЛХРНК ИХБФМ СО РАН с использованием твердофазного фосфитамидного метода на автоматическом синтезаторе ASM-102U (“Биоссет”, Россия). Синтезированы следующие siРНК длиной 21 п.н.: siРНК КИТ-1, гомологичная фрагменту пятого экзона мРНК *c-kit* (смысловая цепь 5'-CGGUGACUCAAUUAUGAAUU-3', антисмысловая цепь 5'-UUCAUAAUUGAAGUCACCGUG-3') и siРНК КИТ-2, гомологичная фрагменту девятого экзона мРНК *c-kit* (смысловая цепь 5'-CGGUUGAAUGUAAGCCUUAUU-3', антисмысловая цепь 5'-UAAGCCUUAACAUAACCGUG-3'). В качестве отрицательного контроля использовали siРНК siScr, которая не гомологична известным последовательностям мРНК генов мыши, крысы и человека (смысловая цепь 5'-CAAGUCUCGUAUGUAGUGGUU-3', антисмысловая цепь 5'-CCACUACAACGAGACUUGUU-3').

Клеточные линии. Использовали перевиваемые клетки почки эмбриона человека HEK293, перевиваемые фибробласты эмбриона мыши линии SC1 и клетки линии перевиваемых миелобластов человека Kasumi-1, несущие активированный онкоген *AML1-ETO* и *c-kit(N822K)*. Линия Kasumi-1 получена из клеток периферической крови больного ОМЛ (M2 по номенклатуре FAB) после неудачной трансплантации костного мозга [22]. Клетки линии SC1 и HEK 293 выращивали на среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота, 4 мМ L-глутамин, 1 мМ пируват натрия, стрептомицин и пени-

циллин в концентрации 100 мкг/мл и 100 ед/мл соответственно, рН 8.2–8.3, при температуре 37°C в атмосфере 5% CO₂. Клетки линии Kasumi-1 выращивали на среде RPMI 1640, содержащей 20% эмбриональной сыворотки, 4 мМ L-глутамин, стрептомицин и пенициллин в концентрации 100 мкг/мл и 100 ед/мл соответственно, рН 6.8–7.0, при температуре 37°C в атмосфере 5% CO₂.

Получение модельной клеточной линии. Модельные клетки, в которых осуществляется экспрессия активированного онкогена *c-kit* (*N822K*) человека при трансдукции клеток SC1 ретровирусным вектором, несущим экспрессирующую кассету “промотор-активированный онкоген (*c-kit*) – IRES – маркерный ген”.

Для создания рекомбинантных ретровирусных векторов, несущих эти кассеты, использовали стандартные методы генной инженерии [23]. Эти рекомбинантные ДНК вводили методом кальций-фосфатной трансфекции совместно с плазмидами, направляющими синтез всех ретровирусных белков, необходимых для создания инфекционных ретровирусных частиц в клетках почки эмбриона человека линии HEK293. Инфекционные вирусные частицы собирали через 24–72 ч с интервалом 12 ч. Титрование проводили на незараженных фибробластах мыши линии SC1. В дальнейшей работе использовали сборы с титрами в пределах 5×10^5 – 5×10^6 .

Трансфекция siРНК. Клетки выращивали на среде DMEM, содержащей 10% сыворотки эмбрионов крупного рогатого скота, 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 1 мМ пируват натрия, при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Клетки в фазе экспоненциального роста высевали на 24-луночные планшеты, по 10⁵ кл./лун., за сутки до опыта и трансфицировали siРНК в концентрации от 50 до 200 нМ, используя в качестве трансфектанта Lipofectamine 2000 (“Invitrogen”, США) в соответствии с протоколом производителя. Уровни флуоресценции определяли через 72 ч после трансфекции с помощью проточного цитофлуориметра. Клетки, обработанные только трансфицирующим реагентом, использовали в качестве контрольных.

Уровень экспрессии активированных онкогенов оценивали при помощи метода ОТ-ПЦР и метода проточной цитофлуориметрии. Суммарную РНК из клеточных культур выделяли с помощью тризола (“Invitrogen”) согласно протоколу производителя. РНК использовали для построения первых цепей кДНК с помощью набора ImProm-IITM Reverse Transcriptase (“Promega”).

Для определения в полученной суммарной кДНК нуклеотидных последовательностей исследуемых генов применяли метод ПЦР с праймерами, специфичными к гену *c-kit*: смысловая последовательность – 5'-TATTGTTGCTATGGTGATC-3';

антисмысловая – 5'-CAGCAAGTCTTCATTATGT-3'. Уровень экспрессии гена β-актина мыши (*β-actin*), определяли, используя праймеры: смысловой – 5'-TGTTACCAACTGGGACGACA-3'; антисмысловой – 5'-TTTGATGTCACGCACGATTT-3', а гена β-актина человека (*ACTB*) – с использованием праймеров: смысловой – 5'-TCCGCAAAGACCTGTACGCC-3'; антисмысловой – 5'-TCCAACCGACTGCTGCACC-3'.

Продукты ПЦР анализировали путем электрофореза в 1.5%-ном геле агарозы. Результаты обрабатывали, используя программное обеспечение Gel-Pro Analyzer 4.0, получали значения максимальной оптической плотности (maxOD) каждой полосы, которые нормализовали к оптической плотности полосы, содержащей продукт амплификации кДНК β-актина.

Уровень флуоресценции клеток измеряли на проточном цитофлуориметре Epics 4XL Beckman Coulter (США). Результаты анализировали при помощи программного обеспечения WinMDI, версия 2.8.

Получение лентивирусных вирионов и введение шпилечных конструкций – предшественников siРНК в модельные клетки. Для получения лентивирусных вирионов, несущих в своем геноме shРНК-шпильку, ДНК рекомбинантных лентивирусных векторов, сконструированных на основе лентивирусного вектора pLSLP (любезно предоставленного П.М. Чумаковым) [24], котрансфицировали в клетки линии HEK293 с упаковывающими плазмидами с помощью реагента липофектамина (Lipofectamin 2000, “Invitrogen”) согласно протоколу производителя. Вирусные стоки собирали в течение трех дней и использовали для заражения трансгенных клеток, несущих активированный онкоген *c-kit*, как описано ранее [12]. Через 48 ч после заражения клетки помещали в селективную среду с антибиотиком пуромицином (10 мкг/мл). Селекцию продолжали еще пять дней после гибели клеток, не содержащих ген устойчивости к пуромицину (всего 10 дней).

Последовательности ДНК, кодирующие анти-С-КИТ shРНК, и SCR shРНК клонированные в лентивирусный вектор:

КИТ-1-смысловая: 5'-p-gatccgCGGTGACTTCAATTATGAActtctgtcaTTCATAATTGAAGTCACCGTGtttttg-3';

КИТ-1-антисмысловая: 5'-p-aattcaaaaaCACGGTACTTCAATTATGAAatgacagg aagTTCATAATTGAAGTCACCGcg-3';

КИТ-2-смысловая: 5'-p-gatccgCGGTTGAATGTAAGGCTTActtctgtcaTAA GCCTTACATTCAACCGTGtttttg-3';

КИТ-2-антисмысловая: 5'-p-aattcaaaaaCACGGTTGAATGTAAGGCTTAtgacagg aagTAAGCCTTACATTCAACCGcg-3';

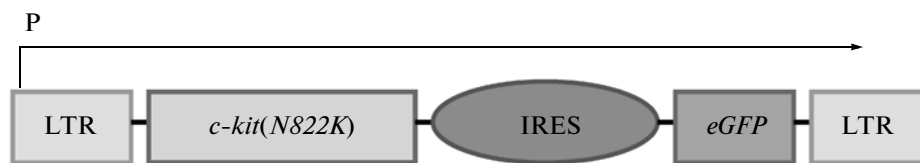


Рис. 1. Схема экспрессирующей кассеты “промотор-целевой ген (*c-kit(N822K)*) – IRES – маркерный ген (*eGFP*)”.

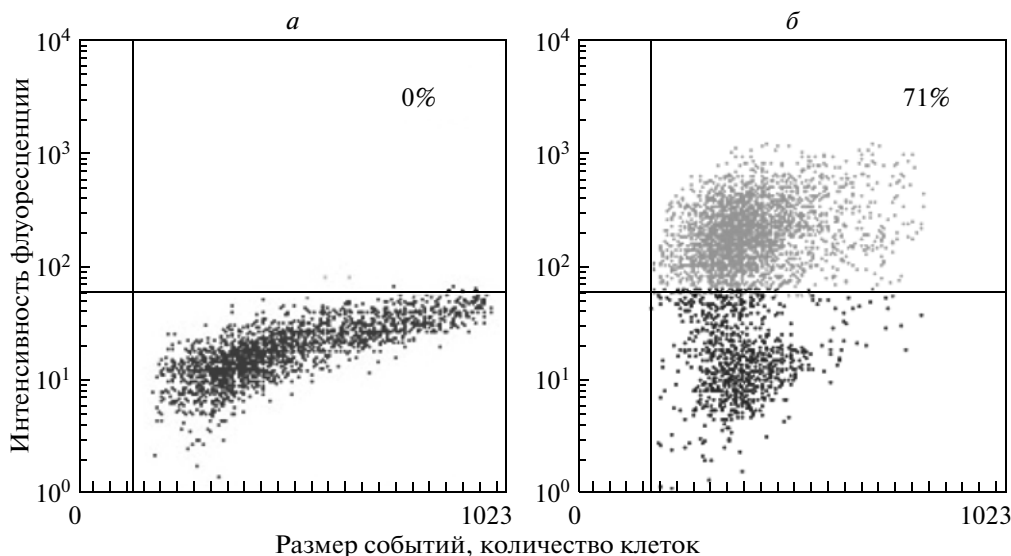


Рис. 2. Гистограммы эффективности экспрессии маркерного гена *eGFP* и внесенного онкогена в клеточных линиях, трансдуцированных рекомбинантным ретровирусным вектором, содержащим ген *c-kit(N822K)*. а – Отсутствие флуоресценции при анализе не трансдуцированных фибробластов линии SC-1. б – Процент флуоресцирующих фибробластов линии SC1 после трансдукции ретровирусным вектором, направляющим синтез мутантного КИТ (флуоресценция наблюдается у 71% всей популяции клеток).

SCR-смысловая: 5'-p-gatccgCAAGTCTCGTATGTAGTGGcttctgtcaCCA
CTACATACGAGACTTGtttttg-3';

SCR-антисмысловая: 5'-p-aattcaaaaaCAAGTCTCGTATGTAGTGGtgacaggaa
gCCTACTACATACGAGACTTGcg-3'.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение линии модельных клеток, несущих в составе своего генома экспрессирующую кассету, которая направляет синтез мутантного гена *c-kit (N822K)*

Для определения функциональной активности синтетических siРНК и лентивирусных векторов, направляющих в клетках синтез shРНК, прежде всего необходимо получить линии переживаемых клеток, экспрессирующие активированные онкогены, которые с высокой частотой обнаруживаются в злокачественных клетках больных с ОМЛ. В качестве целевого гена использовали онкоген *c-kit(N822K)*, активированный в результате точечной мутации, при которой в кодируемом

белке аминокислота аспарагин заменяется на лизин в 822-ом положении. Ретровирусный вектор, несущий экспрессирующую кассету с онкогеном *c-kit(N822K)*, использовали для получения инфекционных ретровирусных частиц (рис. 1).

Для получения вирусных стоков использовали стандартную процедуру; клетками-продуцентами рекомбинантного вируса служили фибробласты почки эмбриона человека НЕК 293 [12]. Титр рекомбинантных вирусных частиц составлял 7×10^5 – 7×10^6 GTU/мл. Эти вирусные частицы использовали для трансдукции клеток-мишеней SC-1 (фибробластов мыши).

Для получения гомогенной клеточной популяции трансдуцированные клетки дважды подвергали сортировке с помощью клеточного сортера FACS Aria (“Becton-Dickinson”, США).

Эффективность экспрессии внесенных генов оценивали, используя метод проточной цитофлуориметрии (по флуоресценции *eGFP*) и ОТ-ПЦР. Результаты оценки эффективности трансдукции и последующей экспрессии трансгенов с помощью цитофлуориметрии приведены на рис. 2,

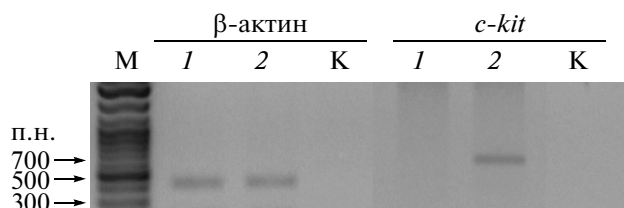


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов ОТ-ПЦР, характеризующая уровень экспрессии внесенного онкогена *c-kit* в исходных и трансдуцированных клетках SC1. М – маркеры в п.н.; 1 – SC1 (не трансдуцированные); 2 – SC1-*c-kit*(N822K); К – вода (отрицательный контроль).



Рис. 4. Схема сплайсированной мРНК *c-kit*. Представлены области, кодирующие Ig-домены и тирозинкиназные домены, разделенные трансмембранным доменом (ТМ). siРНК KIT1 и siРНК KIT2 – участки локализации мишеней siРНК в онкогене *c-kit*.

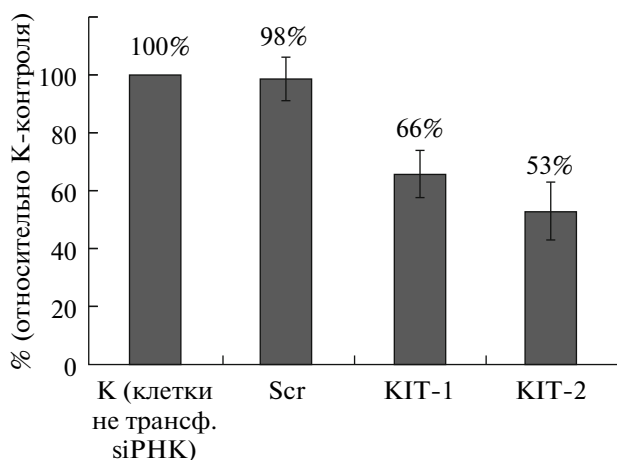


Рис. 5. Гистограмма количества флуоресцирующих клеток, в процентах относительно контроля, в популяции трансгенных эмбриональных фибробластов мыши, несущих активированный онкоген *c-kit*(N822K) через 48 ч после трансфекции siРНК, комплементарных к разным участкам мРНК онкогена. По оси абсцисс слева направо: К – контрольный образец – популяция клеток, не трансфицированных siРНК; Scr – клетки, трансфицированные siРНК-SCR; KIT-1 – siРНК KIT-1; KIT-2 – siРНК KIT-2.

они соответствуют результатам анализа продуктов ОТ-ПЦР с помощью электрофореза в 1.5%-ном агарозном геле (рис. 3). Количество транс-

генных клеток, несущих активированный онкоген, в популяции составило 71%. Результаты показывают, что активированный трансгенный *c-kit* присутствует в геноме модельной клеточной линии, которая получена в результате трансдукции линии фибробластов мыши SC1 рекомбинантным ретровирусным вектором, содержащим этот онкоген, и отсутствует в исходных клетках SC1 эндогенного *c-kit*.

Эти результаты свидетельствуют о том, что в модельных трансгенных клетках экспрессия внесенного онкогена и маркерного гена *eGFP* в составе кассеты “промотор – *c-kit* – IRES – *eGFP*” высоко эффективна.

В ходе выполнения работы показано, что экспрессия внесенных трансгенов стабильна, поскольку уровень экспрессии маркерного гена *eGFP* остается постоянным в течение трех месяцев и составляет не менее 70% от контроля ($p < 0.05$). Уровень экспрессии оценивали относительно не-трансдуцированных клеток линии SC1.

Подавление экспрессии активированного гена *c-kit* под действием синтетических siРНК

Структура экспрессирующей кассеты “промотор – целевой ген (онкоген) – IRES – ген *eGFP*” позволяет быстро определять эффективность интерферирующего действия как синтетических siРНК, так и лентивирусных векторов, направляющих синтез shРНК – предшественников соответствующих siРНК. Деградация общей для обоих генов мРНК в результате действия интерферирующих РНК, комплементарных последовательностям мРНК онкогена, приводит к прекращению образования в клетке как онкобелка, так и зеленого флуоресцирующего белка, что количественно можно оценить, используя проточный цитофлуориметр. Мишени в составе мРНК активированных онкогенов выбирали таким образом, что siРНК-KIT1 была гомологична фрагменту пятого экзона мРНК *c-kit*, а siРНК-KIT2 – фрагменту девятого экзона мРНК *c-kit*. Последовательности siРНК подбирали при помощи программного обеспечения WinMDI, версия 2.8. [17]. Схема, показывающая, к каким участкам мРНК онкогена направлены siРНК-олигонуклеотиды, приведена на рис. 4.

Опыт ставили следующим образом. Синтетические siРНК трансфицировали в клетки, экспрессирующие онкоген. Через 48 ч клетки снимали, отмывали в однократном фосфатно-солевом буфере и анализировали на цитофлуориметре Eric 4XL. Данные обрабатывали при помощи программы WinMDI 2.8. На рис. 5 представлена диаграмма, обобщающая результаты опытов с каждым из вариантов siРНК. Представлена зависимость количества флуоресцирующих клеток от трансфи-

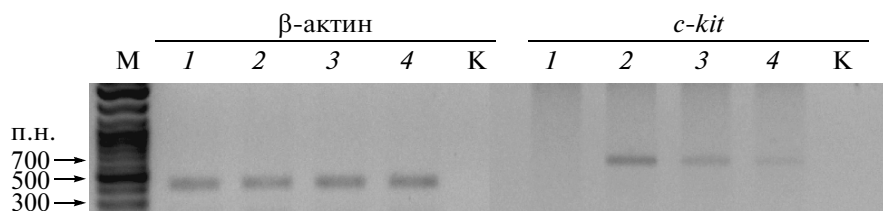


Рис. 6. Электрофореграмма продуктов ОТ-ПЦР, характеризующая уровень экспрессии *c-kit* в исходных и модельных клетках после трансфекции siРНК. 1 – SC1, не несущие *c-kit*; 2 – siРНК (Scr) – контроль (+); 3 – siРНК КИТ-1; 4 – siРНК КИТ-2; К – Контроль (-) (H2O). Слева (М) указаны размеры продукта ПЦР в п.н.

цированной в них siРНК в процентах к контрольным клеткам, не трансфицированным siРНК. Результаты воспроизводились в независимых опытах ($p < 0.05$).

Исследование биологической активности siРНК показало (рис. 5), что уже через 48 ч после трансфекции количество клеток, экспрессирующих репортерный зеленый флуоресцентный белок, сокращается в 1.6 и 2 раза при использовании siРНК КИТ-1 и siРНК-КИТ-2 в концентрации 200 нМ соответственно. При этом контрольная siРНК-Scr, не имеющая гомологии с мРНК человека, мыши и крысы, не оказывает влияния на экспрессию онкогена в модельных клетках. Концентрационная зависимость действия ингибиторов показывает, что максимальный эффект наблюдается при использовании siРНК в концентрации 150–200 нМ, однако уже при концентрации 50 нМ наблюдается достаточно существенное угнетение, уровень которого составляет около 70–80% от максимального. Следует отметить, что уменьшение количества флуоресцирующих клеток менее эффективно, чем подавление экспрессии гена на уровне мРНК, вероятно, за счет того, что зеленый флуоресцентный белок достаточно стабилен (время его жизни составляет около 72 ч).

Результаты, полученные методом проточной цитофлуориметрии, согласуются с результатами, полученными методом ОТ-ПЦР. На рис. 6 представлены электрофореграммы разделения продуктов ОТ-ПЦР суммарной РНК, выделенной из клеток через 48 ч после трансфекции siРНК.

Нами показано, что после добавления синтетической siРНК только в части популяции клеток линии, экспрессирующей *c-kit*(N822K), наблюдается снижение флуоресценции до фонового уровня самофлуоресценции клеток, в то время как в другой части популяции флуоресценция не снижается. Наиболее вероятной причиной может являться то, что трансфекция недостаточно эффективна, и в результате siРНК попадает не во все клетки популяции в достаточной для проявления биологической активности концентрации.

Следует отметить, что трансфекция клеток siРНК КИТ-2, комплементарной участку девятого экзона онкогена, приводит к более значительно-

му снижению количества флуоресцирующих клеток в популяции, чем в случае трансфекции siРНК КИТ-1 комплементарной участку пятого экзона мРНК *c-kit*. Это может быть связано с целым рядом факторов, самым существенным из которых является, возможно, меньшая доступность участка мРНК-мишени siРНК КИТ-1. Известно, что вторичная структура мРНК-мишени или связанные с ней белки могут затруднять доступ для siРНК [11].

Подавление экспрессии гена *c-kit* с помощью лентивирусного вектора, направляющего синтез шпилечной РНК (shРНК)

Результаты, полученные при трансфекции модельных клеток, которые несут активированный онкоген *c-kit*, siРНК-дуплексами, направленными к разным участкам его мРНК, использовали при конструировании лентивирусных векторов, несущих в своем составе shРНК шпилечные структуры – предшественницы siРНК. Лентивирусные векторы могут обеспечить интеграцию последовательности, кодирующей shРНК, в геном клетки-хозяина, в результате чего может быть обеспечено долговременное подавление экспрессии гена-мишени. Выбор нами лентивирусного вектора обусловлен также его способностью трансдуцировать широкий спектр клеток, в том числе, неделящиеся клетки крови, что делает его использование перспективным для изучения последствий выключения онкогенов на восстановление нормального кроветворения.

Для этого, на основе последовательностей siРНК, подавляющих экспрессию онкогена и гена *eGFP*, сконструировали лентивирусные векторы, РНК-геном которых содержит shРНК-шпильки. Основой для таких генетических конструкций послужил лентивирусный вектор pLSLP [23], в который вводили последовательность ДНК, кодирующую shРНК-шпильку – предшественник siРНК, комплементарный участку пятого или девятого экзона сплайсированной мРНК *c-kit*.

Клонирование проводили с помощью стандартных методов геной инженерии. На рис. 7 представлена схема конструирования лентивирус-

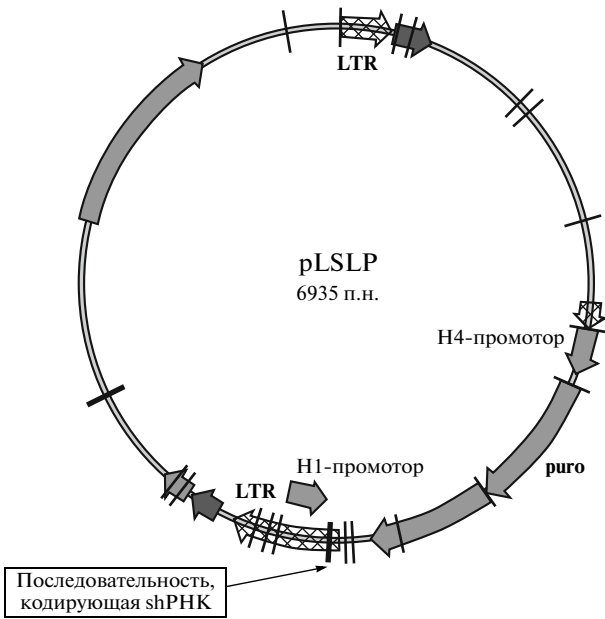


Рис. 7. Схема конструкции лентивирусных векторов, несущих шпилечные структуры, специфичные в отношении участков *c-kit*. В качестве последовательностей, кодирующих shRNA, использовали последовательности ДНК, кодирующие анти-*c-kit*-shRNA, и SCR shRNA.

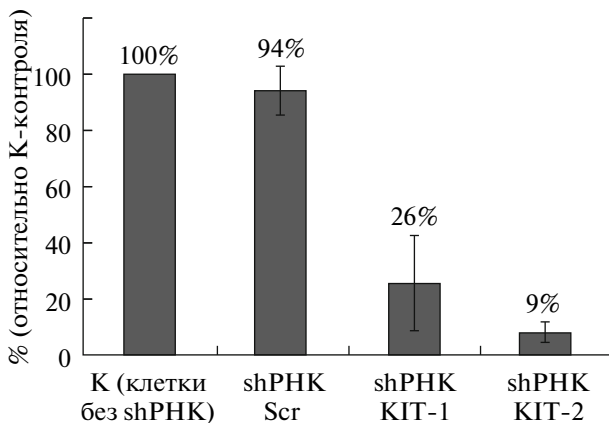


Рис. 8. Гистограмма, характеризующая долю светящихся клеток в популяции относительно контроля ("SC1-*c-kit*(N822K)"). По оси абсцисс слева направо: исходная линия SC1-*c-kit*(N822K), экспрессирующая онкоген *c-kit*; линия SC1-*c-kit*(N822K), трансдуцированная shRNA-SCR; sh линия SC1-*c-kit*(N822K), трансдуцированная shRNA-KIT-1; линия SC1-*c-kit*(N822K), трансдуцированная shRNA-KIT-2.

ных векторов "pLSLP-C-KIT-1-shRNA" и "pLSLP-C-KIT-2-shRNA", несущих шпилечные структуры, специфичные в отношении участков мРНК *c-kit*. В качестве контроля, иллюстрирующего отсутствие неспецифического действия shRNA, использовали вектор "pLSLP-SCR-shRNA", несущий шпилечную структуру, которая не имеет гомологии с генами мыши, крысы и человека.

С помощью лентивирусной трансдукции конструкции вводили в геном модельных клеток, содержащих активированный онкоген *c-kit*.

Наличие в векторных конструкциях, наряду с shRNA, гена устойчивости к пуromицину позволяет получать популяцию (массовую культуру) клеток, в которых экспрессия онкогена полностью подавлена. На рис. 8 приведены результаты анализа таких популяций, полученные методом проточной цитофлуориметрии в ходе трех независимых опытов ($p < 0.05$). Показано, что трансдукция модельных клеток, в которых экспрессируется маркерный ген *eGFP* и мутантный ген *c-kit*(N822K), лентивирусными векторами, направляющими экспрессию shRNA-KIT-1 или shRNA-KIT-2, приводит к снижению количества флуоресцирующих клеток в 4 и 11 раз соответственно.

Результаты, полученные методом проточной цитофлуориметрии, согласуются с результатами, полученными методом ОТ-ПЦР. На рис. 9 представлена электрофореграмма разделения продуктов ОТ-ПЦР суммарной РНК, выделенной из клеток после их трансдукции shRNA-экспрессирующими лентивирусными векторными частицами. Данные трех независимых опытов ($p < 0.05$) обрабатывали при помощи программы Gel-Pro Analyzer 4.0. Показано, что shRNA-KIT-1 снижает экспрессию мРНК онкогена в 3.5 раза, а shRNA-KIT-2 – в 10 раз.

Подавление экспрессии онкогена *c-kit* в клетках, которые содержат интегрированный лентивирусный провирус, направляющий экспрессию шпилечной структуры – предшественника siRNA, комплементарного участку мРНК онкогена *c-kit*, носит долговременный характер. Уровень подавления онкогена в этих клетках не изменяется в течение 3 мес. и составляет не менее 95% по сравнению с контролем (рис. 10). За начальную точку отсчета в этой серии опытов принят момент заражения модельных клеток, которые экспрессируют онкоген, shRNA-экспрессирующими лентивирусными частицами. Измерения проводили через 6, 10, 30, 60, и 90 дн после трансдукции. Представлены усредненные данные трех независимых опытов. Результаты сравнивали с контролем – модельной клеточной линией, которая экспрессирует онкоген *c-kit*, но не трансдуцирована лентивирусными векторами, несущими шпилечные структуры. Эти данные свидетельствуют о том, что лентивирусный провирус стабильно интегрирован в геном клеток-мишеней и сохраняет высокую транскрипционную активность.

При введении последовательностей, направляющих синтез shRNA-KIT-1 и shRNA-KIT-2, в клетки линии перевиваемых миелобластов Kasumi-1 показано, что уровень экспрессии эндогенного *c-kit* снижается в 2 и в 3 раза соответственно

по сравнению с контролем. В качестве контроля использовали клетки Kasumi-1, трансдуцированные лентивирусным вектором, который несет последовательность shPHK-Scr, не имеющую гомологии с мРНК человека и мыши. Уровень экспрессии анализировали при помощи метода ОТ-ПЦР. На рис. 11 представлена электрофореграмма разделения продуктов ОТ-ПЦР, характеризующая уровень экспрессии мРНК онкогена *c-kit* в клетках линии Kasumi-1 после их трансдукции рекомбинантными лентивирусными векторами, кодирующими shPHK (“pLSLP-KIT-1-shPHK”, “pLSLP-KIT-2-shPHK” и “pLSLP-Scr-shPHK”). Количество продукта оценивали при помощи программы Gel-Pro Analyzer 4.0. Значения, полученные для каждого образца, нормировали по гену “домашнего хозяйства” – β-актину (*ACTB*). На гистограмме (рис. 12) представлены средние значения, полученные из трех независимых опытов ($p < 0.05$).

Таким образом, нами впервые разработан подход для эффективного подавления экспрессии активированного гена *c-kit* на посттранскрипционном уровне с помощью РНК-интерференции. Этот подход основан на удачном опыте применения этого принципа для модуляции экспрессии различных генов, в том числе, и активированных онкогенов [12].

Нами использованы оригинальные siPHK, лентивирусные векторы и модельные клеточные линии. Для определения функциональной активности синтетических siPHK и лентивирусных векторов, направляющих в клетках синтез shPHK, в нашей лаборатории создана модельная линия клеток, геном которых содержит экспрессирующую кассету “промотор – целевой ген – IRES – *eGFP*”. В качестве целевого гена использовали последовательность онкогена *c-kit*. Такая система позволяет быстро определять эффективность действия интерферирующих РНК (как синтетических siPHK, так и лентивирусных векторов, направляющих синтез shPHK). Мы показали, что с использованием синтетических siPHK можно получить двукратное подавление экспрессии целевого онкогена *c-kit*.

Данные, полученные в опытах с синтетическими siPHK, позволили подобрать структуру и синтезировать последовательности ДНК, кодирующих shPHK. Эти последовательности клонировали в лентивирусном рекомбинантном векторе LSLP. С помощью лентивирусных векторных частиц данные последовательности вносили в онкоген-экспрессирующие модельные клетки. Благодаря этому, в них осуществляется постоянный внутриклеточный синтез shPHK. Анализ популяций трансдуцированных онкоген-экспрессирующих модельных клеток показал десятикратное снижение экспрессии целевого он-

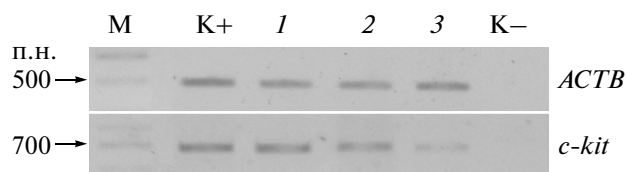


Рис. 9. Электрофореграмма продуктов ОТ-ПЦР в исходных и трансдуцированных клетках SC1. М – маркеры в п.н.; K+ – SC1-c-kit(N822K); 1 – SC1-c-kit(N822K), трансдуцированные shPHK-SCR; 2 – трансдуцированные shPHK-KIT-1; 3 – трансдуцированные shPHK-KIT-2; K- – вода (отрицательный контроль).

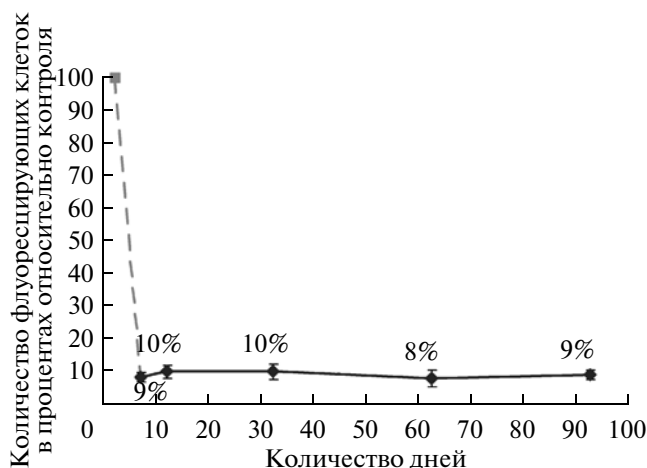


Рис. 10. График зависимости количества флуоресцирующих клеток в популяции модельных клеток SC1-C-KIT, трансдуцированных лентивирусным вектором, направляющим синтез shPHK-KIT-2, в процентах относительно контроля, в течение трех месяцев после трансдукции.

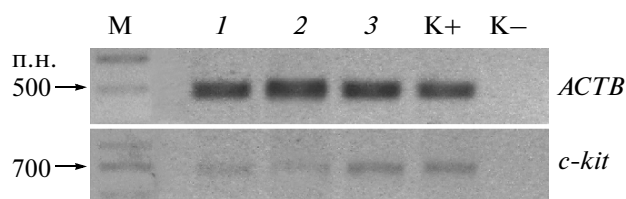


Рис. 11. Электрофореграмма продуктов ОТ-ПЦР в исходных и трансдуцированных клетках линии Kasumi-1. М – маркеры в п.н.; 1 – клеточная линия Kasumi-1, трансдуцированная вектором, несущим shPHK-KIT-1; 2 – несущим shPHK-KIT-2; 3 – несущим shScr; K+ – не трансдуцированная клеточная линия Kasumi-1; K- – вода (отрицательный контроль), ACTB – экспрессия гена β-актина человека, *c-kit* – экспрессия гена *c-kit*.

когена. Необходимо добавить, что подавление экспрессии онкогена, опосредованное shPHK-экспрессирующими лентивирусными частицами, в модельных клетках стабильно и не зависит от

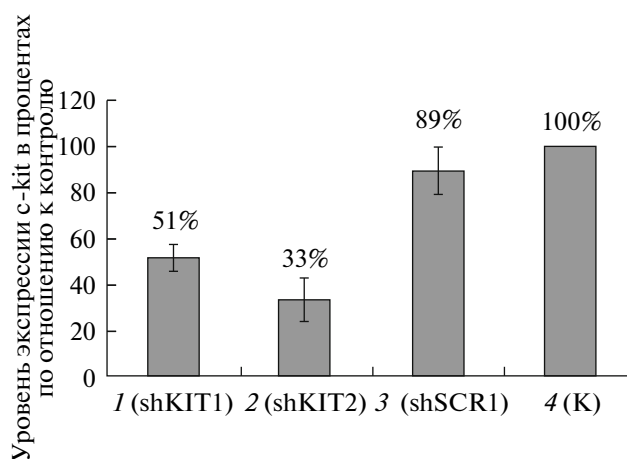


Рис. 12. Гистограмма, характеризующая снижение уровня экспрессии мРНК гена *c-kit* при трансдукции клеток векторами, направляющими синтез shРНК против данного онкогена. По оси абсцисс слева направо: 1 – уровень экспрессии онкогена в клетках линии Kasumi-1, трансдуцированных вектором, несущим shРНК-KIT-1; 2 – несущим shРНК-KIT-2; 3 – экспрессия онкогена *c-kit* в клетках линии Kasumi-1 (не трансдуцированные лентивирусным вектором, уровень экспрессии принят за 100%); 4 – уровень экспрессии онкогена в клетках линии Kasumi-1, трансдуцированных вектором, несущим shРНК-SCR.

времени. Существенно, что в рамках исследования показана высокая эффективность этих векторов при подавлении экспрессии онкогена *c-kit* в клетках линии Kasumi-1, полученных от больного ОМЛ.

Гиперэкспрессия продукта *c-kit*, рецепторной тирозинкиназы КИТ, наблюдается более чем у 80% пациентов с ОМЛ [8], а также при многих других онкологических заболеваниях [25, 26]. Поэтому разработка эффективных подходов для модуляции экспрессии *c-kit*, основанных, в том числе, на принципе РНК-интерференции, представляется крайне важной как для фундаментальных исследований механизмов злокачественной трансформации, так и для прикладных работ, нацеленных на разработку новых подходов для борьбы с онкологическими заболеваниями, к которым относятся и острый миелоидный лейкоз.

Работа получила финансовую поддержку программы фундаментальных исследований Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология”, программы фундаментальных исследований Президиума РАН № 27 “Основы фундаментальных исследований нанотехнологий и наноматериалов”, Министерства образования и науки РФ (Госконтракт № 16.512.12.2001) и Российского фонда фундаментальных исследований (08-04-00547).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Weinberg R.A. 2007. The biology of cancer. *Garland Science, Taylor and Francis Group, LLC*. 1–795.
- Wang Y.Y., Zhou G.B., Yin T., et al. 2005. AML1-ETO and C-KIT mutation/overexpression in t(8;21) leukemia: implication in stepwise leukemogenesis and response to Gleevec. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **102**, 1104–1109.
- Jemal A., Siegel R., Ward E., Hao Y., Xu J., Thun M.J. 2009. Cancer statistics. *Ca Cancer J. Clin.* **59**, 225–249.
- Grimwade D., Walker H., Oliver F., Wheatley K., Harrison C., Harrison G., Rees J., Hann I., Stevens R., Burnett A., Goldstone A. 1998. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The medical research council adult and children’s leukaemia working parties. *Blood*. **92**, 2322–2333.
- Bennett J.M., Catovsky D., Daniel M.T., Flandrin G., Galton D.A., Gralnick H.R., Sultan C. 1976. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br. J. Haematol.* **33**, 451–458.
- Gilliland D.G. 1998. Molecular genetics of human leukemia. *Leukemia*. **12**(Suppl 1), S7–12.
- Frankfurt O., Licht J.D., Tallman M.S. 2007. Molecular characterization of acute myeloid leukemia and its impact on treatment. *Curr. Opin. Oncol.* **19**, 635–649.
- Ikeda H., Kanakura Y., Tamaki T., Kuriu A., Kitayama H., Ishikawa J., Kanayama Y., Yonezawa T., Tarui S., Griffin J.D. 1991. Expression and functional role of the proto-oncogene *c-kit* in acute myeloblastic leukemia cells. *Blood*. **78**, 2962–2968.
- Баскаран Д., Спиринов П.В., Прасолов В.С. 2010. Активированные лейкозные онкогены, определяющие злокачественное перерождение кроветворных клеток. *Молекуляр. биология*. **44**, 418–430.
- Bantounas I., Phylactoul L.A., Uney J.B. 2004. RNA interference and the use of small interfering RNA to study gene function in mammalian systems. *J. Mol. Endocrinol.* **33**, 545–557.
- Вильгельм А.Э., Чумаков С.П., Прасолов В.С. 2006. Интерференция РНК: биология и перспек-

- тивы применения в биомедицине и биотехнологии. *Молекуляр. биология.* **40**, 387–403.
12. Спиринов П.В., Баскаран Д., Орлова Н.Н. и соавт. 2010. Подавление экспрессии лейкозных онкогенов *AML1-ETO* и *RUNX1(K83N)* с помощью РНК-интерференции. *Молекуляр. биология.* **44**, 876–888.
 13. Elbashir S.M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K., Tuschl T. 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature.* **411**, 494–498.
 14. Caplen N.J., Parrish S., Imani F., Fire A., Morgan R.A. 2001. Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**, 9742–9747.
 15. Fang Z.H., Dong C.L., Chen Z., Zhou B., Liu N., Lan H.F., Liang L., Liao W.B., Zhang L., Han Z.C. 2009. Transcriptional regulation of survivin by c-Myc in BCR/ABL-transformed cells: implications in anti-leukaemic strategy. *J. Cell Mol. Med.* **13**, 2039–2052.
 16. Thomas M., Greil J., Heidenreich O. 2006. Targeting leukemic fusion proteins with small interfering RNAs: recent advances and therapeutic potentials. *Acta Pharmacol. Sin. Mar.* **27**, 273–281.
 17. Nechipurenko O., Rossi L., Moore B. 2007. Comparison of approaches for rational siRNA design leading to a new efficient and transparent method. *Nucl. Acids Res.* **35**, 1–10.
 18. Volkov A.A., Kruglova N.S., Meschaninova M.I., Venyaminova A.G., Zenkova M.A., Vlassov V.V., Chernolovskaya E.L. 2009. Selective protection of nuclease-sensitive sites in siRNA prolongs silencing effect. *Oligonucleotides.* **19**, 191–202.
 19. Fagard M., Vaucheret H. 2000. Systemic silencing signals. *Plant Mol. Biol.* **43**, 285–293.
 20. Singer O., Verma I.M. 2008. Applications of lentiviral vectors for shRNA delivery and transgenesis. *Curr. Gene. Ther.* **8**, 483–488.
 21. Manjunath N., Wu H., Subramanya S., Shankar P. 2009. Lentiviral delivery of short hairpin RNAs. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **61**, 732–745.
 22. Larizza L., Magnani I., Beghini A. 2005. The Kasumi-1 cell line: a t(8;21)-kit mutant model for acute myeloid leukemia. *Leuk. Lymphoma.* **46**, 247–255.
 23. Schwieger M., Löhler J., Friel J., Scheller M., Horak I., Stocking C. 2002. AML1-ETO Inhibits maturation of multiple lymphohematopoietic lineages and induces myeloblast transformation in synergy with ICSBP deficiency. *J. Exp. Med.* **196**, 1227–1240.
 24. Kravchenko J.E., Ilyinskaya G.V., Komarov P.G., Agapova L.S., Kochetkov D.V., Strom E., Frolova E.I., Kovriga I., Gudkov A.V., Feinstein E., Chumakov P.M. 2008. Small-molecule RETRA suppresses mutant p53-bearing cancer cells through a p73-dependent salvage pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105**, 6302–6307.
 25. Huo L., Sugimura J., Tretiakova M.S., Patton K.T., Gupta R., Popov B., Laskin W.B., Yeldandi A., Teh B.T., Yang X.J. 2005. *C-kit* expression in renal oncocytomas and chromophobe renal cell carcinomas. *Hum. Pathol.* **36**, 262–268.
 26. Stec R., Grala B., Maczewski M., Bodnar L., Szczylik C. 2009. Chromophobe renal cell cancer – review of the literature and potential methods of treating metastatic disease. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **28**, 1–6.