

Явление РНК-интерференции в контексте актуальных проблем онкологии

РНК-интерференция – уникальный феномен, который был открыт сравнительно недавно и произвел революцию в молекулярной биологии. Это явление представляет собой естественный механизм подавления активности генов, который происходит на уровне синтеза кодируемых ими белков. Таким образом, существовавшая убежденность ученых в том, что контроль экспрессии генов осуществляется исключительно на уровне транскрипции, сменилась осознанием широких перспектив воздействия на уже синтезированные РНК.

К истории вопроса

Впервые явление РНК-интерференции наблюдали в селекции растений. Так, в 1990 г. была сделана попытка вывести новый сорт петунии с более интенсивной окраской лепестков путем введения в клетки растения конструкции, содержащей ген *chs*, кодирующий фермент, принимающий участие в синтезе фиолетового пигмента лепестков. Предполагалось, что дополнительная активность фермента приведет к синтезу большего количества фиолетового пигмента. Но результаты оказались парадоксальными (на тот момент): лепестки у трансгенных растений частично или полностью теряли свой цвет.

В 1994 г. другая исследовательская группа, заинтересованная данным явлением, обнаружила, что при отсутствии в цитоплазме клеток петунии матричной РНК (мРНК) транскрипция гена *chs* все же осуществляется. Было выдвинуто предположение, что деградиация мРНК была инициирована введением в клетку чужеродного генетического материала. Учитывая, что этот материал имел высокую степень сродства с изначальным генетическим материалом, процесс деструкции затрагивал как чужеродную, так и клеточную мРНК. В результате было сделано заключение о том, что супрессия гена *chs* может осуществляться на посттранскрипционном уровне. Впоследствии было обнаружено, что данный феномен выполняет протекторную функцию у растений, так как способствует уничтожению чужеродного генетического материала (например, вирусов).

Вначале ученые предполагали, что такое явление присуще только растениям, а перспективы его использования ограничены селекцией сельскохозяйственных культур. Однако в 1998 г. американские исследователи Крейг Мелло (Craig C. Mello) и Эндрю Файер (Andrew Z. Fire) доказали наличие подобных процессов и у животных.

! Явление посттранскрипционной супрессии генов было названо РНК-интерференцией и ныне рассматривается как перспективное направление для изучения в экспериментальной онкологии, а открывшие его ученые в 2006 г. стали лауреатами Нобелевской премии.

Исследователями было показано, что РНК-интерференция играет значимую защитную роль в жизни различных организмов. Данный феномен участвует в противовирусной защите, задействован в регуляции экспрессии функциональных генов, способствует стабилизации хроматина. Пусковым сигналом для РНК-интерференции служит появление в цитоплазме двухцепочной РНК (дцРНК) экзогенного или эндогенного происхождения. В первом случае речь идет о малой интерферирующей РНК (small-interfering RNA), во втором – о микроРНК. В цитоплазме дцРНК нарезается на короткие фрагменты, которые, в свою очередь, образуют активный комплекс с адаптерными белками и каталитическим ферментом (RISC-комплекс). При появлении в цитоплазме клетки мРНК с последовательностью, комплементарной к одной из цепей дцРНК в составе RISC-комплекса, происходит их связывание. В результате содержащаяся на этих участках информация теряется и не передается рибосомам. Это, в свою очередь, приводит к подавлению трансляции белка с мРНК, т. е. содержащаяся на этих участках информация теряется и не передается рибосомам. В отличие от действия малой интерферирующей РНК ингибирующее влияние микроРНК обусловлено собственным геномом клетки и является природным механизмом посттранскрипционной регуляции.

Участие микроРНК в процессах канцерогенеза

Сегодня известно, что мутации микроРНК в стволовых и соматических клетках могут играть ключевую роль в возникновении, прогрессировании и патофизиологии многих злокачественных новообразований.

Усиление опухолевого роста и метастазирования может сопровождаться аномальным повышением и/или снижением экспрессии различных кластеров микроРНК. Некоторые из этих процессов играют важную роль в онкогенезе; даже одни и те же микроРНК в клетках разных опухолей способны проявлять как онкогенные, так и супрессирующие свойства. Некоторые микроРНК могут функционировать как онкогены, инициаторы клеточной миграции, инвазии, метастазирования. В патологически измененных тканях часто обнаруживают сниженное количество ключевых микроРНК, вероятно, включенных в системы противораковой защиты. Например, к опухолевым супрессорам относят семейство микроРНК *let-7*. Мутации (делеции) генов, кодирующих микроРНК этого семейства, были выявлены в опухолевых клетках при раке легкого, яичника, грудной железы. Делеции генов микроРНК обнаруживали у больных хроническим лимфоцитарным лейкозом; онкогенные микроРНК выявляли в малигнизированных клетках гемопоэтического ряда и в клетках рака желудка.

Технологии, основанные на явлении РНК-интерференции, все чаще применяют в молекулярной биологии и экспериментальной онкологии.

! В разных странах профиль экспрессии микроРНК все чаще используют для оценки прогноза течения онкологического заболевания. Кроме того, профиль экспрессии микроРНК предложен в качестве маркера для диагностики некоторых новообразований.

Например, кластерный анализ профилей экспрессии микроРНК в опухолях позволяет определить ее происхождение (эпителий, кроветворная ткань, соединительная ткань) и классифицировать разные опухоли одной ткани с неидентичными механизмами трансформации.

Изучение противоопухолевого действия малых РНК

В экспериментальной онкологии метод РНК-интерференции сегодня применяется для выявления функций определенных генов, участвующих в процессах канцерогенеза. Кроме того, многими исследовательскими группами проводится изучение эффективности терапии на основе ингибирования онкоассоциированных аллелей.

Особое терапевтическое значение может иметь ингибирование РНК-интерференции, направленной на блокирование трансляции с мРНК онкогенов. Например, некоторыми исследовательскими группами был достигнут значительный уровень ингибирования мутантных генов *gas*. Согласно статистическим данным, мутации гена *gas* обнаружены в 20–25% опухолей человека, а при некоторых типах опухолей частота таких мутаций достигает 90%.

Большой интерес представляет исследование, посвященное изучению эффективности микроРНК по отношению к мутантной форме гена *k-ras* на примере культуры клеток карциномы поджелудочной железы (CAPAN-1). После введения микроРНК в опухолевые клетки было отмечено значительное снижение синтеза мутантного белка K-RAS. Действие РНК-интерференции проявлялось и в виде уменьшения пролиферативной способности опухолевых клеток.

Также были получены убедительные результаты эффективности явления РНК-интерференции в экспериментах *in vivo*. Так, у атимических мышей, которым прививали опухолевые клетки линии CAPAN-1, терапевтическое использование малых РНК приводило к отсутствию туморогенеза (притом что в контрольной группе появление опухолей регистрировали у всех животных). Таким образом, результаты исследования убедительно продемонстрировали перспективы возможного терапевтического действия РНК-интерференции. Сегодня подобные испытания проводят и на других моделях

перевивных злокачественных новообразований: например, на линии опухолевых клеток при раке грудной железы (MCF-7). Явление РНК-интерференции приводило к значительному снижению пролиферативного потенциала в клеточной культуре MCF-7, а также к резкому увеличению количества клеток, направленных на апоптоз. При перевивании культуры MCF-7 мышам линии Nude при использовании РНК-интерференции выявлено значительное ингибирование опухолевого роста, уменьшение размера и степени некротизации злокачественных новообразований. Противоопухолевое действие РНК-интерференции показано и на примере гена рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), задействованного в процессе развития новообразований: в исследованиях обнаружено как значительное торможение роста перевивных опухолей у животных, так и снижение экспрессии EGFR на опухолевых клетках.

! Эффективность терапевтического воздействия РНК-интерференции во многом зависит от метода доставки малых интерферирующих РНК к опухолевой ткани. В связи с этим многие исследовательские группы занимаются поиском оптимальных путей их доставки. В качестве таргетных носителей могут использоваться катионные липосомы, антитела, поликатионные пептиды, адено- и ретровирусы и др.

В контексте интенсивного использования нанотехнологий в медицине изучается эффективность терапии с применением малых интерферирующих РНК, связанных с наночастицами. При этом была использована комбинация из нескольких РНК, способных спровоцировать ингибирование ряда генов, гиперэкспрессия которых характерна для многих злокачественных новообразований. В экспериментах выявлено подавление активности всех указанных генов, что было подтверждено методом иммуногистохимии. У подопытных животных, получавших терапию наночастицами, отмечено торможение роста опухолей на 30% по сравнению с контрольной группой.

В качестве носителей малых интерферирующих РНК изучались также липосомы. В исследовании использовалась малая интерферирующая РНК, комплементарная последовательность мРНК гена, кодирующего рецептор EphA2, гиперэкспрессия которого выявляется в 75% случаев рака яичников. В экспериментах на животных обнаружено значительное ингибирование роста опухолей после двухнедельного введения липосомального препарата. Интересно, что при применении указанного препарата в комбинации с паклитакселом ингибирование роста новообразований достигалось в 82% случаев. Во всех перечисленных исследованиях показано, что оптимизация доставки препаратов малых интерферирующих РНК к опухоли имеет большое значение.

Сегодня начато активное изучение терапевтического действия коротких молекул РНК. В частности, одно из ранних клинических испытаний (исследование I фазы с увеличением доз) посвящено изучению медицинского препарата на основе малой интерферирующей РНК, комплементарной к мРНК гена HIF-1 α . Следует отметить, что гиперэкспрессия HIF-1 α наблюдается в большинстве злокачественных опухолей, что потенциально обуславливает широкие возможности для использования данного препарата в лечении онкологических заболеваний. И хотя на сегодняшний день исследование еще не завершено, уже получены свидетельства о наличии дозозависимой цитотоксичности изучаемого препарата у пациентов с саркомами.

Очевидно, что явление РНК-интерференции подтверждает сложность процессов регулирования передачи генетической информации. Сегодня все больше исследователей разных стран мира изучают это явление, накапливаются данные о роли РНК-интерференции в развитии злокачественных новообразований. И хотя терапевтическое применение малых интерферирующих РНК находится на уровне ранних клинических испытаний, полученные результаты указывают на перспективность их использования в медицинской практике и позволяют с оптимизмом смотреть в будущее.

Подготовил **Анатолий Мамчур**

Список литературы находится в редакции.